

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2022.05.002

· 基础研究 ·

D-甲硫氨酸通过降低环二鸟苷酸清除牙龈卟啉单胞菌生物膜

谢丽丽¹, 张慧彦^{2,3}, 王子璇^{2,3}, 李碧榕^{2,3}, 李珍^{2,3}, 孟维艳²

1. 吉林大学口腔医院老年口腔科, 吉林 长春(130021); 2. 吉林大学口腔医院口腔种植科, 吉林 长春(130021); 3. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室, 吉林 长春(130021)

【摘要】 目的 探讨D-甲硫氨酸(D-methionine, D-Met)通过调控环二鸟苷酸(cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP)清除牙龈卟啉单胞菌生物膜的作用机制。方法 通过细胞活性、最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)实验确定D-Met的有效浓度。分别在牙龈卟啉单胞菌生物膜形成抑制实验和成熟生物膜裂解实验中加入不同浓度的D-Met, 检测生物膜生物量、胞外多糖量、生物膜形态、细胞膜完整性以及c-di-GMP的含量变化。结果 D-Met < 40 mmol/L为生物安全浓度。在生物膜形成抑制和成熟生物膜裂解实验中, D-Met ≥ 20 mmol/L降低了生物膜生物量和胞外多糖量。扫描电镜结果显示, D-Met ≥ 20 mmol/L时, 细胞外基质和细菌密度显著降低。透射电镜结果表明, 35 mmol/L D-Met在生物膜形成过程中导致了细胞膜破裂, 并增加了成熟生物膜裂解时细胞膜的通透性。C-di-GMP水平随着D-Met浓度的增加而降低, 呈浓度依赖性。结论 D-Met ≥ 20 mmol/L可通过抑制c-di-GMP水平清除牙龈卟啉单胞菌生物膜。

【关键词】 生物膜; 牙龈卟啉单胞菌; D-甲硫氨酸; 环二鸟苷酸; 牙周炎; 种植体周围炎; 胞外多糖; 细胞膜; 高效液相色谱

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2022)05-0314-07

【引用著录格式】 谢丽丽, 张慧彦, 王子璇, 等. D-甲硫氨酸通过降低环二鸟苷酸清除牙龈卟啉单胞菌生物膜[J]. 口腔疾病防治, 2022, 30(5): 314-320. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2022.05.002.

D-methionine eradicates *Porphyromonas gingivalis* biofilms by suppressing the cyclic di-GMP level XIE Lili¹, ZHANG Huiyan^{2,3}, WANG Zixuan^{2,3}, LI Birong^{2,3}, LI Zhen^{2,3}, MENG Weiyan². 1. Department of Oral Geriatrics, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Dental Implantology, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 3. Jilin Provincial Key Laboratory of Tooth Development and Bone Remodeling, Changchun 130021, China

Corresponding author: MENG Weiyan, Email: mengwy@jlu.edu.cn, Tel: 86-431-88796025

【Abstract】 Objective To investigate the mechanisms by which D-methionine (D-Met) eradicates *Porphyromonas gingivalis* biofilms by suppressing cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) levels. **Methods** Cell viability, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were measured to determine the effective concentrations of D-Met, which were subsequently used in the following experiments. During the *P. gingivalis* biofilm formation inhibition experiment and the mature biofilm disassembly experiment, biofilm biomass, exopolysaccharide (EPS), biofilm morphology, integrity of the cell membrane, and the level of c-di-GMP were determined. **Results** D-Met < 40 mmol/L was biocompatible. During the biofilm formation inhibition and mature biofilm disassembly experiments, D-Met ≥ 20 mmol/L decreased the biofilm biomass and the production of EPS. SEM analysis showed that the extracellular matrix and bacterial density were drastically reduced by D-Met ≥ 20 mmol/L. TEM detection showed that 35 mmol/L D-Met

【收稿日期】 2021-11-15; **【修回日期】** 2021-12-07

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81571007); 吉林省科技厅项目(20200404108YY)

【作者简介】 谢丽丽, 医师, 硕士, Email: dentistxll@163.com; 并列第一作者: 张慧彦, 医师, 硕士, Email: 731439742@qq.com

【通信作者】 孟维艳, 教授, 博士, Email: mengwy@jlu.edu.cn, Tel: 86-431-88796025



微信公众号

ruptured the cell membrane during biofilm formation and increased the permeability of the cell membrane in the disassembly phase of mature biofilms. C-di-GMP levels decreased with increasing concentrations of D-Met in a concentration-dependent manner. **Conclusion** D-Met ≥ 20 mmol/L could eradicate *P. gingivalis* biofilms by suppressing c-di-GMP levels.

【Key words】 biofilm; *Porphyromonas gingivalis*; D-Methionine; cyclic diguanosine monophosphate; periodontitis; peri-implantitis; exopolysaccharide; cell membrane; high performance liquid chromatography

J Prev Treat Stomatol Dis, 2022, 30(5): 314-320.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 81571007) and the Department of Science and Technology of Jilin Province (No. 20200404108YY).

牙周炎和种植体周围炎是天然牙和种植体脱落的主要原因,其始动因素主要为菌斑生物膜的堆积,致病菌包括牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、中间普氏菌等^[1]。牙龈卟啉单胞菌可释放多种毒力因子,如脂多糖、牙龈蛋白酶、肽聚糖、菌毛和凝血酶等,刺激宿主的先天免疫反应^[2]。另外牙龈卟啉单胞菌还可直接刺激其他类型细胞,显著上调细胞的炎症因子分泌,表现为典型的炎症状态^[3]。

自然界中细菌多数情况下以生物膜形式存在,附着于组织表面,并通过自分泌的细胞外基质,如胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)、蛋白质和环境DNA(e-DNA),将自身包裹其中,对抗环境压力^[4]。研究表明生物膜状态下牙龈卟啉单胞菌等致病菌的致病性大约是浮游状态下细菌的500倍^[5]。

特定D-氨基酸可抑制某些细菌生物膜的形成。例如,枯草芽孢杆菌可产生D-甲硫氨酸(D-Methionine, D-Met)、D-色氨酸、D-酪氨酸和D-亮氨酸的混合物,防止生物膜的过度形成^[6];25 mmol/L的D-Met可显著抑制与根管治疗后持续感染相关的粪肠球菌生物膜的形成^[7]。笔者课题组前期研究发现,与单种D-氨基酸相比,D-精氨酸、D-Met和D-组氨酸的联用增强了单种D-氨基酸对牙龈卟啉单胞菌生物膜的清除作用^[8]。另外,牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌、具核梭杆菌等在牙周组织中产生硫化物及蛋白代谢过程也与利用甲硫氨酸有关^[9]。但是,D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜影响的具体机制尚不清楚。本试验拟初步探讨D-Met通过影响环二鸟苷酸(cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP)清除牙龈卟啉单胞菌生物膜的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

主要材料与试剂:牙龈卟啉单胞菌 ATCC

33277(ATCC,美国);小鼠成纤维细胞L929(ATCC,美国);BHI培养基、DMEM高糖培养基(索莱宝,中国);c-di-GMP、D-Met(Sigma,美国);哥伦比亚血琼脂培养基(上海申启,中国);牛脑心浸液培养基(青岛海博,中国);胎牛血清(Thermo Fisher,美国);0.1%结晶紫(北京酷来博,中国);CCK-8试剂(Dojindo,日本);乙酸铵、100%甲醇(北京瑞康,中国);苯酚(上海研生,中国)。

主要仪器:恒温细胞培养箱(BB15,Thermo,美国);酶标检测仪(synergy HT,Bio-TEK,美国);低温离心机(5810R,Eppendorf,德国);扫描电子显微镜(S-4800,Hitachi,日本);透射电子显微镜((JEM 1400 PLUS,JEOL,美国);高效液相色谱仪(Waters 1525,Waters,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 D-Met对小鼠成纤维细胞L929增殖的影响 将D-Met以梯度浓度(5、10、15、20、25、30、35、40、45 mmol/L)溶解于细菌培养基中,使用0.22 μ m滤膜进行过滤灭菌。取100 μ L小鼠成纤维细胞(L929),复苏消化后用含10%胎牛血清的DMEM培养基配成细胞浓度为 5.0×10^4 个/mL,培养24 h后,实验组加入含不同浓度D-Met的培养基100 μ L,对照组加入等体积的DMEM培养基,每天更换培养基。分别在第1、3、5天,加入CCK-8试剂,避光37 $^{\circ}$ C孵育4 h。酶标仪检测450 nm吸光度值(optical density, OD),计算各组细胞的增殖活力。

1.2.2 D-Met对牙龈卟啉单胞菌细菌活性的影响 复苏牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277,于BHI液体培养基37 $^{\circ}$ C厌氧培养至对数生长期,将菌液浓度调整为 1.0×10^8 CFU/mL,接种于含不同浓度D-Met的BHI液体培养基,对照组为不含D-Met的BHI液体培养基,每4 h检测其吸光度值,持续至72 h,评估最小抑菌浓度(minimum inhibitory con-

centration, MIC);取高于MIC实验组孵育3 d,以菌落生长情况评估最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。

1.2.3 D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜生物量及胞外多糖的影响 ①生物膜形成抑制实验:细菌培养同上,对照组加入0 mmol/L D-Met,实验组加入不同浓度D-Met(5、10、15、20、25、30、35 mmol/L),37℃厌氧孵育3 d。以结晶紫染色法评估牙龈卟啉单胞菌生物膜形成过程中的生物量,即PBS冲洗3次,室温干燥20 min,加入37%多聚甲醛,固定15 min, PBS冲洗,加入0.1%结晶紫染液,室温20 min, PBS冲洗,加入乙醇(95%),20 min后转板,测定吸光度值(OD_{600});以苯酚-硫酸法(OD_{490})测定牙龈卟啉单胞菌生物膜形成过程中胞外多糖含量,采用无水葡萄糖绘制标准曲线。②成熟生物膜裂解实验:37℃厌氧孵育3 d形成成熟生物膜后,每组分别加入不同浓度D-Met(20、25、30、35 mmol/L),继续厌氧孵育3 d,以上述同样的方法测定牙龈卟啉单胞菌生物膜生物量及胞外多糖量。

1.2.4 扫描电镜观察牙龈卟啉单胞菌生物膜形态的变化 生物膜形成抑制及成熟生物膜裂解的实验过程及分组同上。PBS冲洗3次,2.5%戊二醛固定过夜(4℃)。乙醇梯度脱水(各10 min),烘干,喷金,采用扫描电镜观察生物膜形态。

1.2.5 牙龈卟啉单胞菌细胞膜完整性的变化 生物膜形成抑制及成熟生物膜裂解的实验过程同上,分组为对照组和35 mmol/L D-Met组。收集生物膜后置于离心机中,4 000 rpm离心10 min(4℃)。2.5%戊二醛固定1 h,1%四氧化锇固定1 h, PBS洗涤4次,乙醇梯度和丙酮脱水,树脂包裹后行切片,3%醋酸铀和柠檬酸铅对切片进行双染色。采用透射电镜观察生物膜中细胞膜完整性的变化。

1.2.6 D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜内c-di-GMP的影响 生物膜形成抑制及成熟生物膜裂解的实验过程同上,分组同1.2.4。c-di-GMP的提取:超声生物膜培养物10 s,获得混悬液,测定吸光度(OD_{600}),离心(16 000 g, 2 min, 4℃),弃上清液。PBS洗涤沉淀(16 000 g, 2 min, 4℃),弃上清液。沉淀物加入PBS,100℃下水浴5 min。加入冰乙醇使最终乙醇浓度为65%,萃取15 s。离心样本(16 000 g, 2 min, 4℃),保留上清液。使用剩余沉淀重复上述步骤2次,混合上清液。使用真空浓缩蒸发器干燥上清液,获得含有c-di-GMP的粉末状样品。c-di-GMP的检测:将c-di-GMP样品溶解于1 mL

无菌蒸馏水,使用Waters 1525高效液相色谱仪检测及分析c-di-GMP的含量,使用商品化c-di-GMP绘制标准曲线。

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件分析数据,采用方差分析(ANOVA)检验各组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,用Graphpad Prism7绘制曲线。

2 结果

2.1 D-Met对L929细胞增殖及牙龈卟啉单胞菌细菌活性的影响

在L929细胞增殖第1、3、5天,与对照组相比,5、10、15、20、25、30、35、40 mmol/L D-Met组细胞活力差异无统计学意义($P > 0.05$);45 mmol/L D-Met组吸光度值低于对照组(第1天: $P = 0.046$,第3天: $P < 0.001$,第5天: $P < 0.001$)(图1a)。各组牙龈卟啉单胞菌生长曲线在28~36 h时达到峰值,与对照组相比,当D-Met ≥ 35 mmol/L时,L929细胞的生长曲线平缓,无明显对数期,即35 mmol/L D-Met为MIC(图1b);在40 mmol/L D-Met组,琼脂板上无菌落生长,即40 mmol/L D-Met为MBC(图1c)。

2.2 D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜生物量及胞外多糖的影响

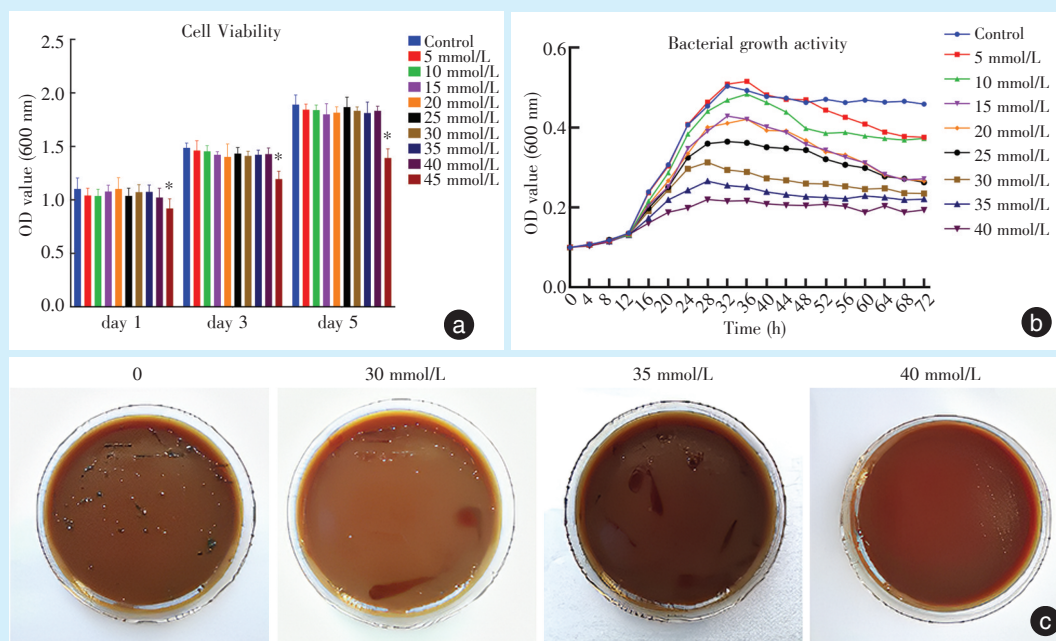
在生物膜形成抑制实验及成熟生物膜裂解实验中,D-Met ≥ 20 mmol/L时,生物膜生物量低于对照组(图2a-2b);图2c为标准葡萄糖曲线;D-Met ≥ 20 mmol/L时同样能抑制生物膜形成时胞外多糖的产生(图2d),以及促进成熟生物膜中胞外多糖的消散,呈浓度依赖性(图2e)。

2.3 D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜形态的影响

在生物膜形成抑制实验中,扫描电镜下可见,对照组的生物膜致密且多层,细胞外基质形成网状结构。20、25、30 mmol/L组中的细菌密度减低,细菌通过稀疏的细胞外基质连接,35 mmol/L组生物膜完整性彻底消失,细胞膜出现破裂(图3a)。在成熟生物膜裂解实验中,生物膜的密度随着D-Met浓度的增加呈下降趋势;尤其是35 mmol/L组细胞外基质完全缺失,细胞表面变得更光滑,没有可见的细胞外附属器(图3b)。

2.4 D-Met对牙龈卟啉单胞菌细胞膜完整性的影响

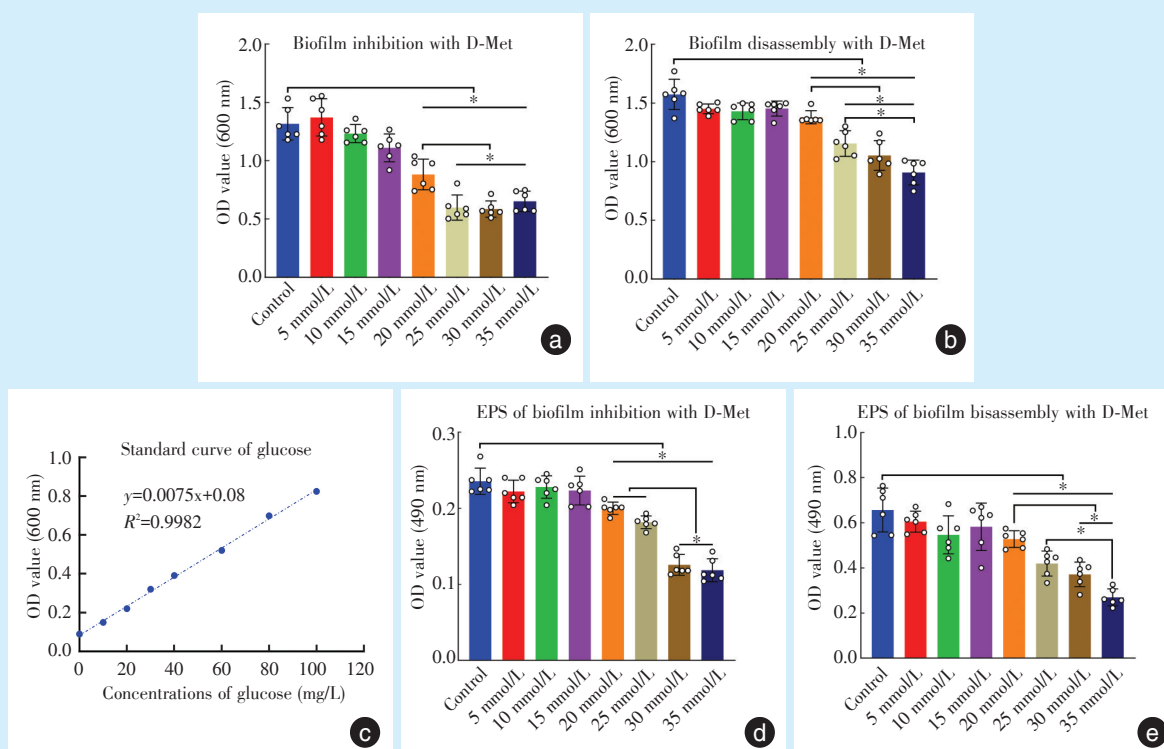
对照组中细胞的形状规则,细胞壁完整,细胞中染色颗粒稀少;相反,在生物膜形成抑制实验



a: cytotoxicity of the D-Met to L929 cells, measured at OD 450 nm; b: effects of D-Met on bacterial growth and MICs of *P. gingivalis*, measured at OD 600 nm; c: effects of D-Met on bacterial colonies growing on the BHI agar plate with D-Met. *: vs. control group, $P < 0.05$

Figure 1 Cytotoxicity of different concentrations of D-Met to L929 cells and *P. gingivalis*

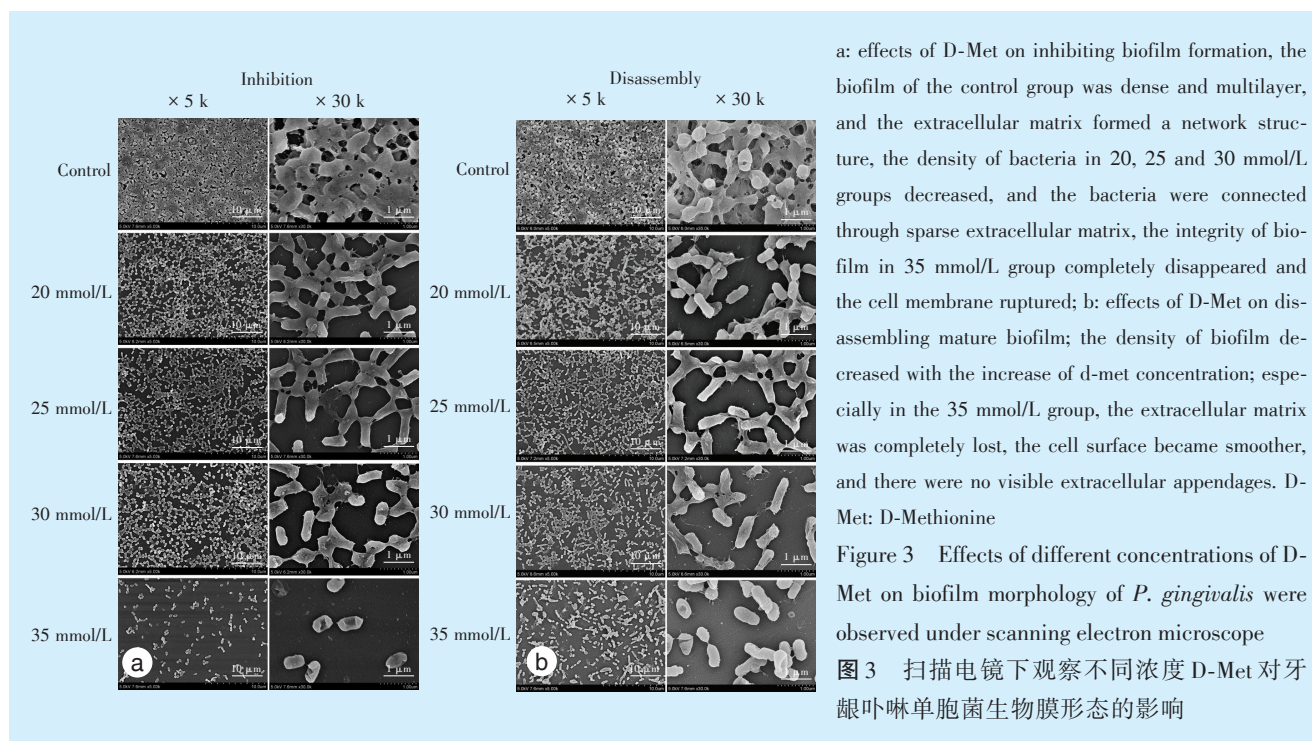
图1 不同浓度的D-Met对L929细胞及牙龈卟啉单胞菌的毒性作用



a: effects of D-Met on inhibiting biofilm formation; b: effects of D-Met on disassembling mature biofilm; c: standard curve of glucose; d: effects of D-Met on EPS production during biofilm formation; e: effects of D-Met on eradicating EPS in mature biofilm; * $P < 0.05$; EPS: exopolysaccharide; D-Met: D-Methionine

Figure 2 Effects of different concentrations of D-Met on inhibiting biofilm formation and disassembling mature biofilm of *P. gingivalis*

图2 不同浓度D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜形成的抑制作用和成熟生物膜的裂解作用



a: effects of D-Met on inhibiting biofilm formation, the biofilm of the control group was dense and multilayer, and the extracellular matrix formed a network structure, the density of bacteria in 20, 25 and 30 mmol/L groups decreased, and the bacteria were connected through sparse extracellular matrix, the integrity of biofilm in 35 mmol/L group completely disappeared and the cell membrane ruptured; b: effects of D-Met on disassembling mature biofilm; the density of biofilm decreased with the increase of d-met concentration; especially in the 35 mmol/L group, the extracellular matrix was completely lost, the cell surface became smoother, and there were no visible extracellular appendages. D-Met: D-Methionine

Figure 3 Effects of different concentrations of D-Met on biofilm morphology of *P. gingivalis* were observed under scanning electron microscope
图3 扫描电镜下观察不同浓度D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜形态的影响

中,35 mmol/L D-Met使细胞膜破裂,细胞中的内容物通过细胞膜上的裂孔溢出;而在成熟生物膜裂解实验中,35 mmol/L D-Met组中细胞内容物深染,大量细胞内染色颗粒表明膜通透性增加,大量染色剂渗入细胞内基质中,见图4。

2.5 D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜内c-di-GMP的影响

图5a为c-di-GMP的标准曲线;在生物膜形成抑制实验及成熟生物膜裂解实验中,与对照组相比,D-Met ≥ 20 mmol/L时可明显降低生物膜内c-di-GMP的含量($P < 0.05$),且呈浓度依赖性,见图5b-e。

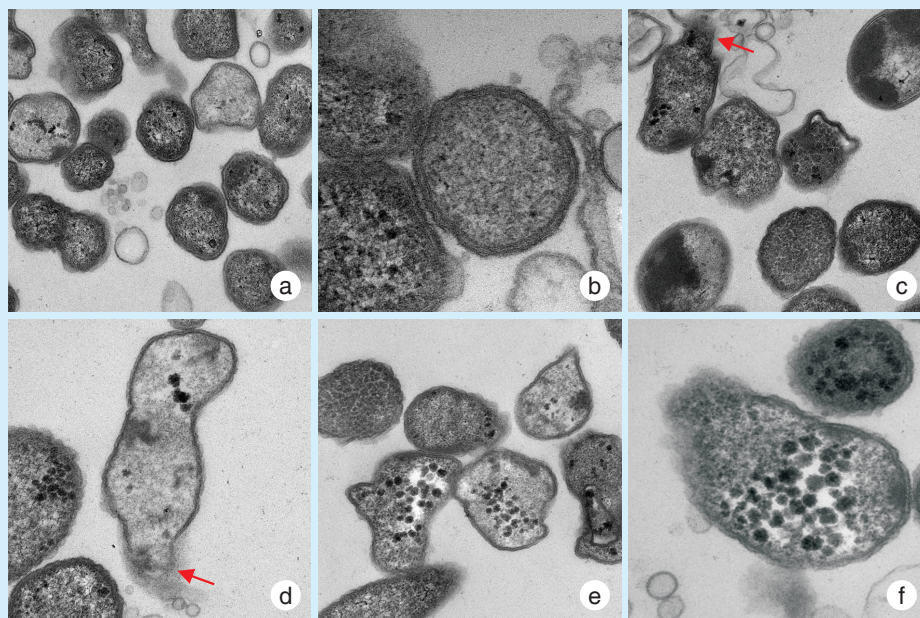
3 讨论

红色复合体是一群与牙周病显著相关的病原体,包括牙龈卟啉单胞菌、齿垢密螺旋体和福赛类杆菌^[10]。它们与宿主组织接触,介导大量炎症趋化因子、细胞因子释放,导致牙周/种植体周围结构破坏^[11]。由于细菌多数以生物膜的形式存在,细胞外基质对细菌的包裹作用以及细菌间的群体感应效应导致传统的抗菌药物往往无法有效对抗感染部位的生物膜^[12]。

作为细菌内源性的固有成分,D-氨基酸在对抗微生物生物膜方面与传统药物有本质的区别。D-氨基酸可由细菌自身产生,主动触发生物膜的分散,而分散的游离菌可定植到新的部位再次形成生物膜,以实现适应营养物质耗尽的不利环

境^[13]。因此,D-氨基酸不仅是细菌自身适应微环境改变的一种生存策略,也为生物膜的清除提供了一种新的思路。霍乱弧菌能够分泌大量的D-精氨酸,以调整生物膜及细菌细胞膜的完整性^[14]。Tong等^[15]研究发现,外源性加入40 mmol/L的D/L-半胱氨酸、天冬氨酸或谷氨酸均可显著抑制变异链球菌生物膜的形成。本实验中,D-Met浓度高于20 mmol/L显著抑制了牙龈卟啉单胞菌生物膜的形成并有效分散了成熟的生物膜,且最为显著的是,35 mmol/L D-Met完全消除了细胞膜外附属器的产生,提示D-Met可能通过特定机制影响了牙龈卟啉单胞菌的合成代谢。另外,D-Met的浓度高于20 mmol/L显著降低了生物膜中EPS的生物量。D-酪氨酸在低浓度时可促进铜绿卟啉单胞菌EPS的产生,而在高浓度时则导致EPS的减少^[16],与本实验结果相似。因此,EPS可能同样受到D-Met参与调控合成代谢的影响。

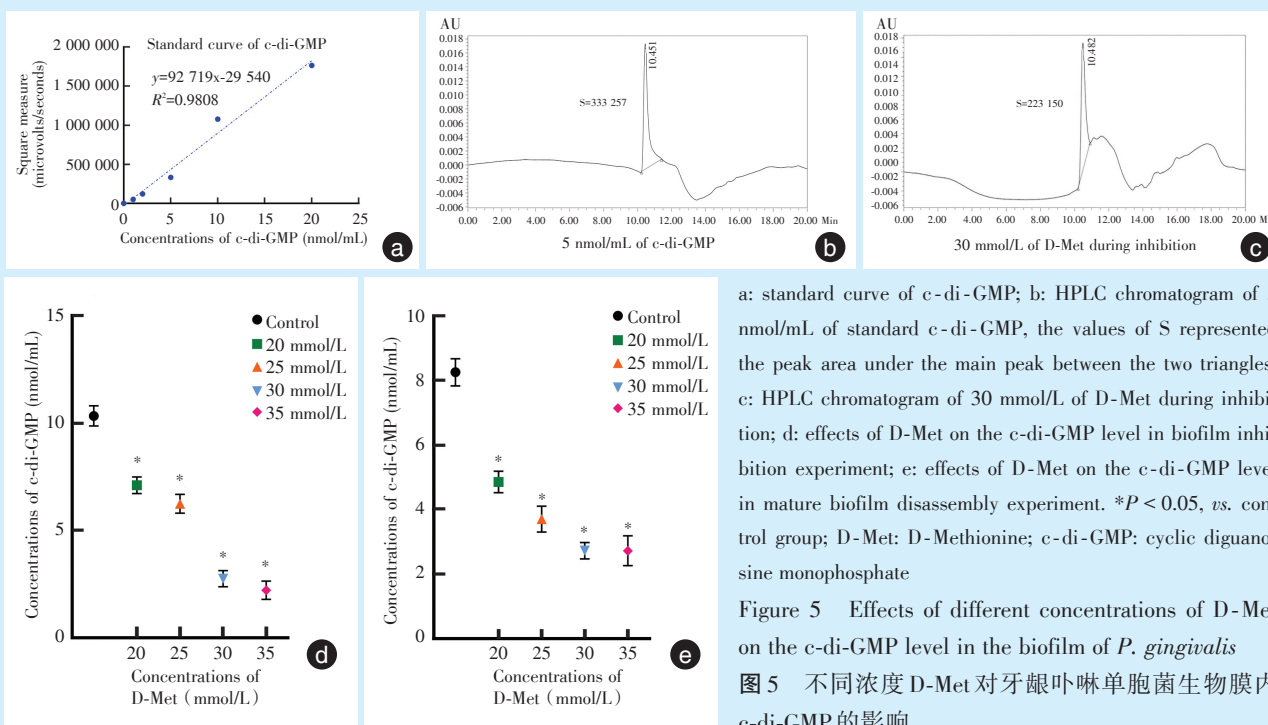
c-di-GMP作为第二信使,普遍存在于革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌中,是细菌生物代谢的关键调控因子,包括多糖及蛋白的生物合成、细菌运动性和毒力等^[17]。高浓度的c-di-GMP可以促进生物膜的形成,而低浓度的c-di-GMP可以抑制生物膜的形成^[18]。在费氏弧菌中, Ca^{2+} 可激活二肽基酸环化酶,从而促进合成c-di-GMP,导致细菌的运动性降低而纤维素的合成增加^[19]。c-di-GMP G-四联体诱导剂可诱导c-di-GMP形成四联体,从而干扰了c-



a: bacterial cells in the control group ($\times 50$ k); b: bacterial cells in the control group ($\times 100$ k); c: bacterial cells in 35 mmol/L of D-Met in mature biofilm disassembly experiment, the arrows indicated intracellular contents overflowing through the perforation on the cell membrane ($\times 50$ k); d: bacterial cells in 35 mmol/L of D-Met in biofilm inhibition experiment, the arrows indicated the intracellular contents overflowing through the perforation on the cell membrane ($\times 100$ k); e: bacterial cells in 35 mmol/L of D-Met in mature biofilm disassembly experiment, the massive intracellular staining ($\times 50$ k); f: bacterial cells in 35 mmol/L of D-Met in mature biofilm disassembly experiment, the massive intracellular staining ($\times 100$ k); D-Met: D-Methionine

Figure 4 Effects of D-Met on the integrity of cell membrane in biofilm was observed under transmission electron microscope

图4 透射电镜下观察D-Met对生物膜中细胞膜完整性的影响



a: standard curve of c-di-GMP; b: HPLC chromatogram of 5 nmol/mL of standard c-di-GMP, the values of S represented the peak area under the main peak between the two triangles; c: HPLC chromatogram of 30 mmol/L of D-Met during inhibition; d: effects of D-Met on the c-di-GMP level in biofilm inhibition experiment; e: effects of D-Met on the c-di-GMP level in mature biofilm disassembly experiment. * $P < 0.05$, vs. control group; D-Met: D-Methionine; c-di-GMP: cyclic diguano-sine monophosphate

Figure 5 Effects of different concentrations of D-Met on the c-di-GMP level in the biofilm of *P. gingivalis*

图5 不同浓度D-Met对牙龈卟啉单胞菌生物膜内c-di-GMP的影响

di-GMP 正常的生物功能,包括细菌运动和胞外多糖的分泌,导致生物膜形成受阻^[20]。与之相似,本实验中 D-Met 浓度高于 20 mmol/L 显著降低了牙龈卟啉单胞菌 c-di-GMP 的水平,尤其在 35 mmol/L 时,c-di-GMP 的表达水平下降至最低。综上,牙龈卟啉单胞菌生物膜生物量、EPS 产生、生物膜形态、细胞膜完整性均与 c-di-GMP 的变化趋势协同一致,基于此,笔者推测 D-Met 可能通过降低 c-di-GMP 水平抑制和分散牙龈卟啉单胞菌生物膜。

本研究通过生物膜及胞外多糖的生物量、生物膜及细胞膜的微观形态以及 c-di-GMP 的蛋白水平首次揭示了 D-Met 可能通过作用于 c-di-GMP 从而抑制和分散牙龈卟啉单胞菌生物膜的机理。但是 c-di-GMP 表达受抑制的分子机制以及其上游/下游信号通路仍需进一步验证。

【Author contributions】 Xie LL and Zhang HY performed the experiments and wrote the article. Wang ZX, Li BR and Li Z performed the experiments. Meng WY designed the study and revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Wong RL, Hiyari S, Yaghsezi A, et al. Comparing the healing potential of late-stage periodontitis and peri-implantitis[J]. J Oral Implantol, 2017, 43(6): 437-445. doi: 10.1563/aaad-joi-D-17-00157.
- [2] Zheng S, Yu S, Fan X, et al. *Porphyromonas gingivalis* survival skills: immune evasion[J]. J Periodontol Res, 2021, 56(6): 1007-1018. doi: 10.1111/jre.12915.
- [3] 蔡树玉, 林晓悦, 雷劲, 等. 不同 fimA 基因型牙龈卟啉单胞菌感染对人脐静脉内皮细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(6): 364-369. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.06.005.
Cai SY, Lin XY, Lei J, et al. Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection with different fimA genotypes on the secretion of IL-1 β , IL-6, and TNF- α by human umbilical vein endothelial cells[J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(6): 364-369. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.06.005.
- [4] Ruhul R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria[J]. Microbiol Res, 2021, 251: 126829. doi: 10.1016/j.micres.2021.126829.
- [5] Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, et al. Peri-implant infections of oral biofilm etiology[J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 830: 69-84. doi: 10.1007/978-3-319-11038-7_4.
- [6] Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, et al. D-amino acids trigger biofilm disassembly[J]. Science, 2010, 328(5978): 627-629. doi: 10.1126/science.1188628.
- [7] Zilm PS, Butnejski V, Rossi-Fedele G, et al. D-amino acids reduce *Enterococcus faecalis* biofilms *in vitro* and in the presence of antimicrobials used for root canal treatment[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170670. doi: 10.1371/journal.pone.0170670.
- [8] Zhang Z, Li B, Cai Q, et al. Synergistic effects of D-arginine, D-methionine and D-histidine against *Porphyromonas gingivalis* biofilms[J]. Biofouling, 2021, 37(2): 222-234. doi: 10.1080/08927014.2021.1893309.
- [9] Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR[J]. Clin Med Res, 2005, 3(3): 176-185. doi: 10.3121/cmr.3.3.176.
- [10] Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis[J]. Periodontol 2000, 2005, 38(38): 72-122. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x.
- [11] How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: an Overview of periodontopathic pathogen below the gum line[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 53. doi: 10.3389/fmicb.2016.00053.
- [12] Kasza K, Gurmani P, Hardie KR, et al. Challenges and solutions in polymer drug delivery for bacterial biofilm treatment: a tissue-by-tissue account[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 178: 113973. doi: 10.1016/j.addr.2021.113973.
- [13] Miyamoto T, Homma H. D-Amino acid metabolism in bacteria[J]. J Biochem, 2021, 170(1): 5-13. doi: 10.1093/jb/mvab043.
- [14] Alvarez L, Aliashkevich A, De Pedro MA, et al. Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity [J]. ISME J, 2018, 12(2): 438-450. doi: 10.1038/ismej.2017.176.
- [15] Tong Z, Zhang L, Ling J, et al. An *in vitro* study on the effect of free amino acids alone or in combination with nisin on biofilms as well as on planktonic bacteria of *Streptococcus mutans*[J]. Plos One, 2014, 9(6): e99513. doi: 10.1371/journal.pone.0099513.
- [16] Yu C, Li X, Zhang N, et al. Inhibition of biofilm formation by D-tyrosine: effect of bacterial type and D-tyrosine concentration[J]. Water Res, 2016, 92: 173-179. doi: 10.1016/j.watres.2016.01.037.
- [17] Collins AJ, Smith TJ, Sondermann H, et al. From input to output: the lap/c-di-GMP biofilm regulatory circuit[J]. Annu Rev Microbiol, 2020, 74: 607-631. doi: 10.1146/annurev-micro-011520-094214.
- [18] Hengge R. High-specificity local and global c-di-GMP signaling [J]. Trends Microbiol, 2021, 29(11): 993-1003. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.003.
- [19] Tischler AH, Vanek ME, Peterson N, et al. Calcium-responsive diguanylate cyclase CasA drives cellulose-dependent biofilm formation and inhibits motility in *Vibrio fischeri*[J]. mBio, 2021, 12(6): e0257321. doi: 10.1128/mBio.02573-21.
- [20] Xuan TF, Wang ZQ, Liu J, et al. Design and synthesis of novel c-di-GMP G-Quadruplex inducers as bacterial biofilm inhibitors[J]. J Med Chem, 2021, 64(15): 11074-11089. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00465.

(编辑 周春华, 韩倩倩)



官网