

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.05.004

• 基础研究 •

表没食子儿茶素没食子酸酯对牙龈卟啉单胞菌细菌毒力抑制作用的体外研究

齐霞¹, 孔令雪², 李淑娟¹, 马思婷¹, 齐雅丽¹, 赵蕾³

1. 河北医科大学口腔医学院·口腔医院牙周科, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔疾病临床医学研究中心, 河北 石家庄(050017); 2. 济南口腔医院牙周黏膜科, 山东 济南(250001); 3. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院牙周科, 四川 成都(610041)

【摘要】 目的 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)对牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)体外抑菌活性及EGCG对*P. gingivalis*诱导人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGFs)表达基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的抑制作用。**方法** 采用微量稀释法分析EGCG对*P. gingivalis*浮游菌和生物膜的抑制作用。扫描电镜检测EGCG作用下*P. gingivalis*生物膜微观结构的变化。特异性人工合成显色多肽底物评价EGCG对牙龈素精氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(arginine gingipain, Rgp)和赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(lysine gingipain, Kgp)蛋白水解活性的影响。*P. gingivalis*刺激HGFs,与EGCG共培养,ELISA检测MMP-1和MMP-2的蛋白分泌水平,qRT-PCR检测MMP-1及MMP-2 mRNA的表达。**结果** EGCG对*P. gingivalis*浮游菌的最低抑菌浓度为62.5 $\mu\text{g/mL}$,最低杀菌浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 。EGCG可抑制*P. gingivalis*生物膜形成,并对成熟生物膜具有清除作用,且抑制成熟生物膜的代谢活性。10 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ EGCG可有效抑制牙龈素的水解活性($P < 0.05$)。此外,50 $\mu\text{g/mL}$ EGCG对*P. gingivalis*刺激HGFs表达及分泌MMP-1、MMP-2均有抑制作用($P < 0.05$)。**结论** EGCG对*P. gingivalis*有抑菌作用,且可抑制HGFs表达MMPs。

【关键词】 表没食子儿茶素没食子酸酯; 牙龈卟啉单胞菌; 生物膜形成; 生物膜清除; 精氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶; 赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶; 抗菌; 抗炎; 牙龈成纤维细胞; 基质金属蛋白酶

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)05-0314-08

【引用著录格式】 齐霞,孔令雪,李淑娟,等.表没食子儿茶素没食子酸酯对牙龈卟啉单胞菌细菌毒力抑制作用的体外研究[J].口腔疾病防治,2021,29(5):314-321. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2021.05.004.

Inhibitory effects of epigallocatechin-3-gallate on the pathogenic properties of *P. gingivalis* in vitro QI Xia¹, KONG Lingxue², LI Shujuan¹, MA Siting¹, QI Yali¹, ZHAO Lei³. 1. Department of Periodontics, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Clinical Research Center for Oral Diseases, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Periodontics and Oral Mucosa, Jinan Stomatologic Hospital, Jinan 250001, China; 3. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China
Corresponding author: ZHAO Lei, Email: jollyzldoc@163.com, Tel: 86-28-85503489

【Abstract】 Objective To explore the antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on *P. gingivalis* and the inhibitory effects on matrix metalloproteinases (MMPs) production induced by *P. gingivalis*. **Methods** The an-



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【收稿日期】 2020-11-13; **【修回日期】** 2020-12-13

【基金项目】 河北省医学科学研究课题计划(20190096);河北省自然科学基金项目(H2019206541);河北省财政厅老年病防治项目(2017068877-2)

【作者简介】 齐霞,主治医师,硕士,Email: summyly@163.com

【通信作者】 赵蕾,主任医师,博士,Email: jollyzldoc@163.com, Tel: 86-28-85503489

timicrobial effect of EGCG against planktonic cultures and biofilms of *P. gingivalis* was evaluated using microplate dilution assays. The microstructural changes in biofilms were studied using scanning electron microscopy (SEM). The inhibitory effect of EGCG on arginine gingipain (Rgp) and lysine gingipain (Kgp) activity of *P. gingivalis* was evaluated using synthetic chromogenic peptides and fluorogenic substrates. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and qRT-PCR analysis were used to assess MMP-1 and MMP-2 mRNA expression and secretion by human gingival fibroblasts (HGFs) stimulated with *P. gingivalis* in the presence or absence of EGCG, respectively. **Results** The MIC and MBC of EGCG against *P. gingivalis* were 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$, respectively. EGCG can not only inhibit the biofilm formation of *P. gingivalis* but also has a scavenging effect on mature biofilms and can affect their viability. Additionally, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ of EGCG inhibited the proteinase activities of Rgp and Kgp, respectively ($P < 0.05$). Finally, the mRNA expression and secretion of MMP-1 and MMP-2 by HGFs stimulated by *P. gingivalis* were significantly inhibited by 50 $\mu\text{g/mL}$ of EGCG ($P < 0.05$). **Conclusion** EGCG exhibits antimicrobial effects against *P. gingivalis* and reduces the expression of MMPs by HGFs.

【Key words】 epigallocatechin-3-gallate; *Porphyromonas gingivalis*; biofilm formation; biofilm reduction; arginine gingipain; lysine gingipain; antibacterial; anti-inflammatory; gingival fibroblasts; matrix metalloproteinase
J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(5): 314-321.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Medical Science Research Project in Hebei Province (No. 20190096); Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2019206541); Senile Disease Prevention project of Hebei Provincial Department of Finance(No. 2017068877-2).

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)是牙周炎的主要致病菌。*P. gingivalis*参与形成龈下菌斑生物膜,通过改变生物膜的组成及负荷,引起菌群失调,与牙周疾病的发生发展及治疗失败相关^[1-3]。*P. gingivalis*可分泌牙龈素等毒力因子直接破坏牙周组织^[4],同时,还可入侵宿主细胞使其释放大量炎症因子,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs),导致牙周组织的继发性损伤^[5-7]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶儿茶酸中最主要成分,占其总重的59%。研究显示每天饮用1杯绿茶,可显著降低牙周病的发病率及严重程度^[8]。用*P. gingivalis*感染小鼠构建牙周炎动物模型,口腔内注射40 mg/kg的EGCG溶液4周发现,实验组牙周组织炎症显著减轻,且血液中上调的白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)表达水平显著降低^[9],提示EGCG可减轻*P. gingivalis*引起的牙周炎症,但其具体机制仍有待深入探究。本研究探讨EGCG对*P. gingivalis*生物膜、毒力因子的抑制作用及EGCG对*P. gingivalis*刺激的人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGFs)分泌MMPs的能力。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

EGCG(杭州禾田生物制品有限公司);*P. gin-*

givalis ATCC33277由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供;心脑浸出液培养基(brian heart infusion, BHI)(Oxiod, 英国);XTT试剂盒(Synchem, 美国);精氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(arginine gingipain, Rgp)特异性产色底物、赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(lysine gingipain, Kgp)特异性产色底物、二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)(Sigma, 美国);胎牛血清、DMEM培养基(Hyclone, 美国);Trizol(Invitrogen, 美国);人MMP-1、MMP-1 ELISA试剂盒(优尔生科技股份有限公司, 中国);RNA逆转录试剂盒、qRT-PCR试剂盒(TakaRa, 日本)。酶标仪(Thermo, 美国);扫描电镜(Inspect FEI, 荷兰);ABI7300荧光定量PCR仪(Applied Biosystems, 美国)。

1.2 EGCG对*P. gingivalis*浮游菌生长的影响

采用微量稀释法梯度稀释EGCG并加入96孔板中与 1×10^8 CFU/mL *P. gingivalis*菌悬液各100 μL 混合,使EGCG终浓度为1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9 $\mu\text{g/mL}$,于37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养24 h后,酶标仪 $A_{655\text{ nm}}$ 测吸光度值,确定最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)及最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。另设不含EGCG的空白对照组。每组设3个平行孔。

1.3 EGCG对*P. gingivalis*生物膜的影响

1.3.1 结晶紫染色法检测EGCG对*P. gingivalis*生

物膜形成的抑制作用 将 *P. gingivalis* 菌悬液 (100 μ L 每孔) 与不同浓度 EGCG (100 μ L 每孔) 37 $^{\circ}$ C 厌氧共培养 24 h, 另设阳性对照组 (100 μ L BHI 及 100 μ L *P. gingivalis* 菌悬液), 阴性对照组 (200 μ L BHI) 以及药物对照组 (100 μ L BHI 及 100 μ L 不同浓度 EGCG)。结晶紫染色, 酶标仪 $A_{550\text{ nm}}$ 测量吸光度值。药物最低生物膜抑制浓度 (minimum biofilm inhibition concentration, MBIC) 为与对照组相比, 抑制 50% 或 90% 生物膜形成的最低药物浓度, 即 MBIC₅₀ 和 MBIC₉₀^[10]。每组设 4 个平行孔, 实验重复 3 次。计算生物膜形成的相对形成率: 生物膜形成相对抑制率 = $1 - (\text{实验组 } A_{550\text{ nm}} - \text{药物组 } A_{550\text{ nm}}) / (\text{阳性对照组 } A_{550\text{ nm}} - \text{阴性对照组 } A_{550\text{ nm}}) \times 100\%$ 。

1.3.2 结晶紫染色法检测 EGCG 对 *P. gingivalis* 成熟生物膜的清除作用 *P. gingivalis* 菌悬液 200 μ L 培养 24 h, 形成成熟生物膜, PBS 洗去浮游菌后, 加入 200 μ L 微量液体稀释法梯度稀释后终浓度为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9 μ g/mL EGCG, 分别设置阳性对照组 (200 μ L *P. gingivalis* 菌悬液), 阴性对照组 (200 μ L BHI) 及药物对照组 (200 μ L 不同浓度 EGCG), 继续厌氧培养 24 h 后, 结晶紫染色, 测量 $A_{550\text{ nm}}$ 下的吸光度值。计算药物最低清除已形成生物膜清除浓度 (minimum biofilm reduction concentration, MBRC)^[11], 即 MBRC₅₀ 和 MBRC₉₀。成熟生物膜相对清除率 = $1 - (\text{实验组 } A_{550\text{ nm}} - \text{药物组 } A_{550\text{ nm}}) / (\text{阳性对照组 } A_{550\text{ nm}} - \text{阴性对照组 } A_{550\text{ nm}}) \times 100\%$ 。

1.3.3 XTT 法检测 EGCG 对 *P. gingivalis* 成熟生物膜活性的影响 在 *P. gingivalis* 成熟生物膜中加入不同浓度 EGCG, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24 h 后, 每孔加入 120 μ L XTT-甲萘醌混合溶液, 37 $^{\circ}$ C 黑暗培养 2 h, 测 $A_{490\text{ nm}}$ 下的吸光度值。计算成熟生物膜活性的最小抑菌浓度 (sessile minimal inhibitory concentration, SMIC)^[12], 即 SMIC₅₀ 和 SMIC₉₀, 固着状态细菌活性相对抑制率 = $1 - (\text{实验组 } A_{490\text{ nm}} - \text{药物组 } A_{490\text{ nm}}) / (\text{阳性对照组 } A_{490\text{ nm}} - \text{阴性对照组 } A_{490\text{ nm}}) \times 100\%$ 。

1.4 扫描电镜观察 EGCG 对 *P. gingivalis* 成熟生物膜的清除作用

在 24 孔板内放置无菌圆形玻片, EGCG 与 *P. gingivalis* 成熟生物膜共培养 24 h 后, 2.5% 戊二醛固定, 乙醇梯度脱水, 醋酸异戊酯液置换, 二氧化碳临界干燥, 离子溅射表面固定镀膜致材料表面成金黄色, 扫描电子显微镜 (scanning electron micros-

copy, SEM) 观察分析。

1.5 EGCG 抑制牙龈素的蛋白水解活性

收集 *P. gingivalis* 并稀释至 Rgp 组 *P. gingivalis* 浓度为 $A_{660\text{ nm}}=2$, Kgp 组为 $A_{660\text{ nm}}=1$, 4 $^{\circ}$ C 10 000 g 离心 10 min 后, 取上清液 100 μ L, 依次加入 50 μ L 终浓度为 0、10、50 μ g/mL EGCG, 25 μ L 0.04 mol/L DTT 及浓度为 0.016 mol/L Rgp 或 Kgp 特异性产色底物, 设无 *P. gingivalis* 的为阴性对照组, 将混合物 37 $^{\circ}$ C 暗培养, 分别于 15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、3 h、4 h 在酶标仪 $A_{490\text{ nm}}$ 测量吸光度值。

1.6 HGFs 的原代培养

采用酶消化联合组织块法培养人原代牙龈成纤维细胞^[7], 第 4~6 代用于实验。本研究已获四川大学华西口腔医院伦理委员会批准 (批准号: WCHSIRB-ST-2012-067)。

1.7 MTT 法测定 *P. gingivalis* 及 EGCG 对牙龈成纤维细胞的细胞毒性

收集对数生长期 HGFs 接种于 96 孔板, 并加入浓度为 1、10、50、100、250、500 μ g/mL EGCG 或感染复数为 50、100、200、250、500 的 *P. gingivalis*, 培养 24 h 后, 依次加入 20 μ L MTT 及 200 μ L DMSO, 测量并计算细胞存活率。另设不含 EGCG 的空白对照组及不含细胞的阴性对照组。

1.8 细胞培养及处理

接种 5×10^5 个/mL 的 HGFs 于 6 孔板, 培养 24 h; 同时, 加入 *P. gingivalis* (MOI 值为 200) 及终浓度为 50 μ g/mL 和 10 μ g/mL 的 EGCG。另设不含 *P. gingivalis* 或 EGCG 的对照组。37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 恒温细胞培养箱内共培养 24 h。11 000 g 离心 10 min 收集细胞上清液 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.9 ELISA 法检测 MMP-1 及 MMP-2 的蛋白分泌量

采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定总蛋白浓度, ELISA 试剂盒检测 HGFs 细胞培养上清液中 MMP-1 及 MMP-2 的含量。

1.10 qRT-PCR 分析 *P. gingivalis* 感染的 HGFs 中 MMP-1, MMP-2 mRNA 的表达

Trizol 法提取 HGFs 总 RNA, 分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度。Takara 试剂盒逆转录 RNA 为 cDNA, 进行 qRT-PCR 定量分析。引物序列见表 1。扩增条件: 预变性 (95 $^{\circ}$ C 30 s) 1 个循环; PCR 反应 (95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s) 40 个循环, 终止反应 (95 $^{\circ}$ C 5 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s) 1 个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组的目的基因相对表达量。

表1 qRT-PCR反应中引物序列

Table 1 The primers sequence of the genes used in qRT-PCR

Target gene	Primers sequence
MMP-1	F: 5'-GAAACCCTGAAGGTGATGAAGC-3'
	R: 5'-TTGGCAAATCTGGCGTGAAT-3'
MMP-2	F: 5'-TTCCGCTTCCAGGGCACAT-3'
	R: 5'-GCACCTTCTGAGTTCCACCAA-3'
β-actin	F: 5'-CCACGAACTACCTTCAACTCC-3'
	R: 5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3'

1.11 统计学分析

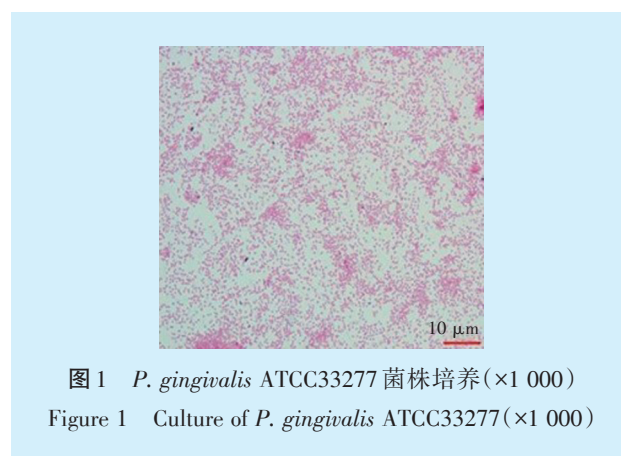
采用SPSS 21.0对数据进行统计学分析,定量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布与方差齐性的采用单因素方差分析(ANOVA),若不符合采用Kruskal-Wallis非参数检验,组间两两比较采用LSD法检验或Dunnett's T3检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG对*P. gingivalis*浮游菌及生物膜的影响

将*P. gingivalis* ATCC33277接种于BHI血琼脂平板,37℃厌氧培养24 h,光镜下为革兰氏阴性染色的球杆菌(图1)。EGCG对*P. gingivalis*浮游菌MIC和MBC分别为62.5 μg/mL,500 μg/mL(表2)。

7.8~125 μg/mL EGCG对*P. gingivalis*生物膜形成具有抑制作用,呈现剂量效应关系($P < 0.05$,图2a);其中,MBIC₅₀为7.8 μg/mL,MBIC₉₀为31.25 μg/mL。EGCG对24 h形成的*P. gingivalis*生物膜表现出清除作用,MBRC₅₀为250 μg/mL(图2b)。125 μg/mL的EGCG即可抑制50%固着状态细菌活性,即SMIC₅₀;62.5~1 000 μg/mL的实验组生物膜细菌活性均低于空白对照组,差异有统计学意义(图2c, $P < 0.05$)。扫描电镜观察结果显示:与对照组相比,实验组生物膜的量明显减少,致密结构变得疏松多孔,1 000 μg/mL EGCG组细胞间几乎无连接(图3)。

图1 *P. gingivalis* ATCC33277菌株培养($\times 1\ 000$)Figure 1 Culture of *P. gingivalis* ATCC33277($\times 1\ 000$)表2 EGCG对*P. gingivalis*浮游菌及生物膜的作用Table 2 Effects of EGCG against *P. gingivalis* planktonic culture and biofilms

Drug	Planktonic <i>P. gingivalis</i>		<i>P. gingivalis</i> biofilms					
	MIC	MBC	Formation		Reduction		Viability	
			MBIC ₅₀	MBIC ₉₀	MBRC ₅₀	MBRC ₉₀	SMIC ₅₀	SMIC ₉₀
EGCG(μg/mL)	62.5	500	7.8	31.25	250	> 1 000	125	> 1 000

EGCG: epigallocatechin-3-gallate; MIC: minimal inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration; MBIC: minimum biofilm inhibition concentration; MBRC: minimum biofilm reduction concentration; SMIC: sessile minimal inhibitory concentration

2.2 EGCG对牙龈素蛋白水解活性的抑制作用

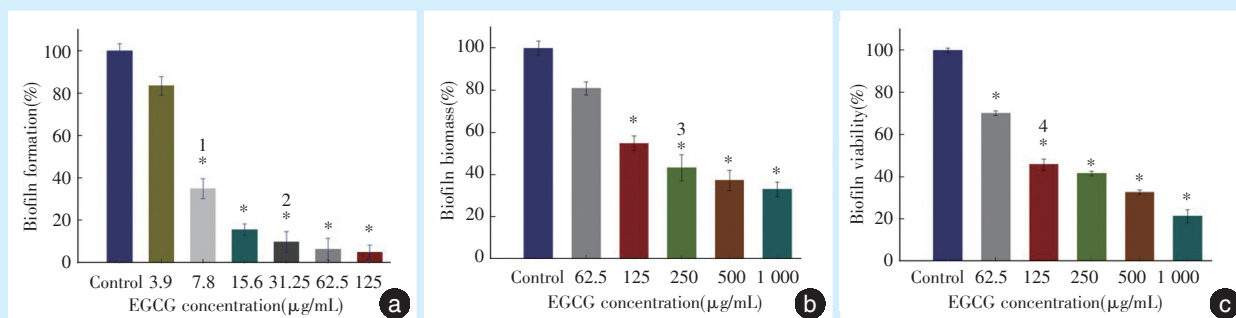
低于MIC浓度的EGCG均可抑制Rgp对蛋白的降解作用($P < 0.05$),10、50 μg/mL的EGCG抑制率分别为(49.92 $\pm$ 6.41)%,(69.56 $\pm$ 3.62)%(图4a),且10、50 μg/mL EGCG对Rgp蛋白降解抑制作用在1、2、3、4 h组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(图4b)。*P. gingivalis* Kgp蛋白水解活性同样被抑制($P < 0.05$),抑制率分别为(37.50 $\pm$ 1.91)%和(49.40 $\pm$ 3.61)%,50 μg/mL EGCG对Kgp蛋白降解抑制作用在3、4 h组间比较无统计学意义($P > 0.05$)(图4c、4d)。

2.3 *P. gingivalis*及EGCG对HGFs细胞活性影响

与对照组相比,*P. gingivalis*在MOI值250:1及500:1时对HGFs的生长有抑制作用($P < 0.05$,图5a)。500 μg/mL EGCG抑制HGFs的生长,250 μg/mL及以下浓度EGCG对HGFs细胞存活无影响(图5b)。

2.4 EGCG对*P. gingivalis*刺激下HGFs表达MMP-1、MMP-2水平的影响

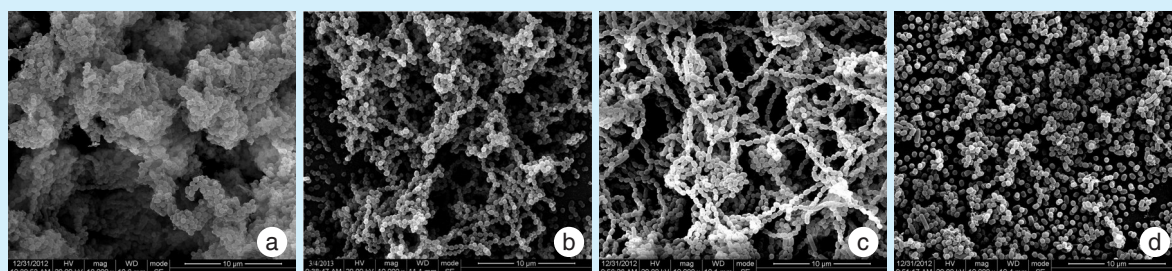
与阴性对照组相比,阳性对照组MMP-1和MMP-2的分泌分别上升了1.4倍和1.6倍。与阳性对照组相比较,50 μg/mL EGCG实验组HGFs上清



a: the inhibitory effect of EGCG on *P. gingivalis* biofilm formation; 1 represents MBIC₅₀ and 2 represents MBIC₉₀; b: a marked reduction in the *P. gingivalis* biofilm biomass after exposure to EGCG ranging from 62.5 to 1 000 μg/mL; 3 represents MBRC₅₀; c: the inhibitory effect of EGCG of pre-established *P. gingivalis* biofilm on the viability of *P. gingivalis*; 4 represents SMIC₅₀; *: $P < 0.05$ vs. the control group; MBIC: minimum biofilm inhibition concentration; MBRC: minimum biofilm reduction concentration; SMIC: sessile minimal inhibitory concentration; EGCG: epigallocatechin-3-gallate

Figure 2 Inhibitory effect of different concentrations of EGCG on *P. gingivalis* biofilm

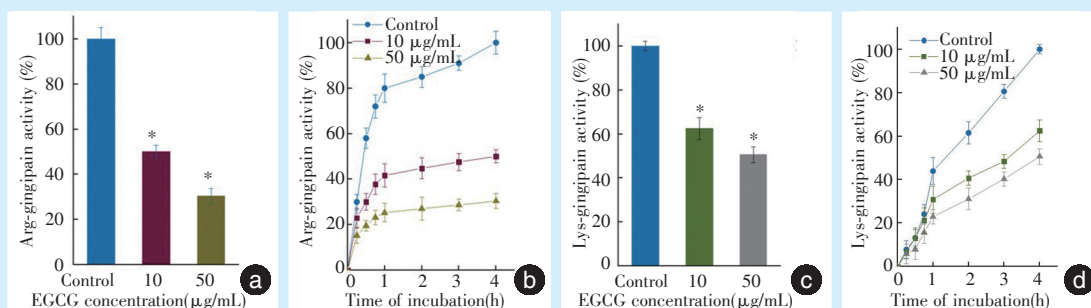
图2 不同浓度EGCG对*P. gingivalis*生物膜的抑制作用



a: untreated control group of *P. gingivalis* biofilm; b: a marked 50% reduction in *P. gingivalis* biofilm after 24 h of exposure to 250 μg/mL of EGCG compared with the control; c: disruption in the architecture of *P. gingivalis* biofilm after 24 h of exposure to 500 μg/mL of EGCG; d: no biofilm in 24 h pre-established *P. gingivalis* biofilms after 24 h of exposure to 1 000 μg/mL of EGCG; EGCG: epigallocatechin-3-gallate

Figure 3 Effect of the EGCG concentration on the mature biofilms of *P. gingivalis* using SEM (× 10 000)

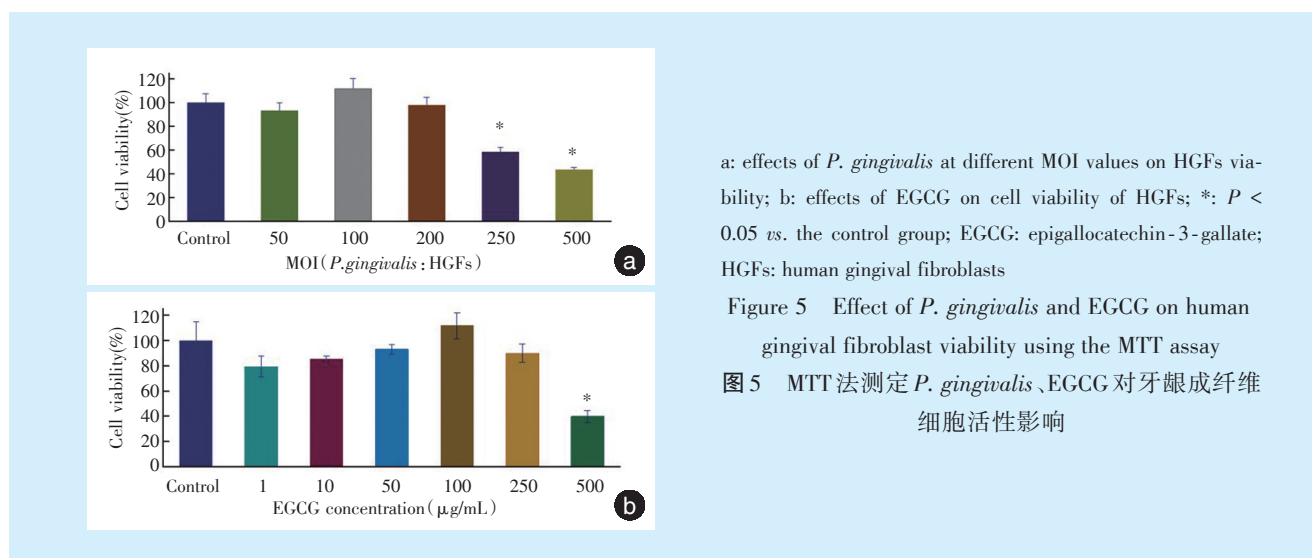
图3 SEM观察不同浓度EGCG对*P. gingivalis*成熟生物膜的影响(× 10 000)



a-b: the inhibitory effect of EGCG on the proteolytic activity of *P. gingivalis* Rgp; c-d: the inhibitory effect of EGCG on the proteolytic activity of *P. gingivalis* Kgp; *: $P < 0.05$ vs. the control group; EGCG: epigallocatechin-3-gallate

Figure 4 Effect of EGCG on *P. gingivalis* Rgp and Kgp activities

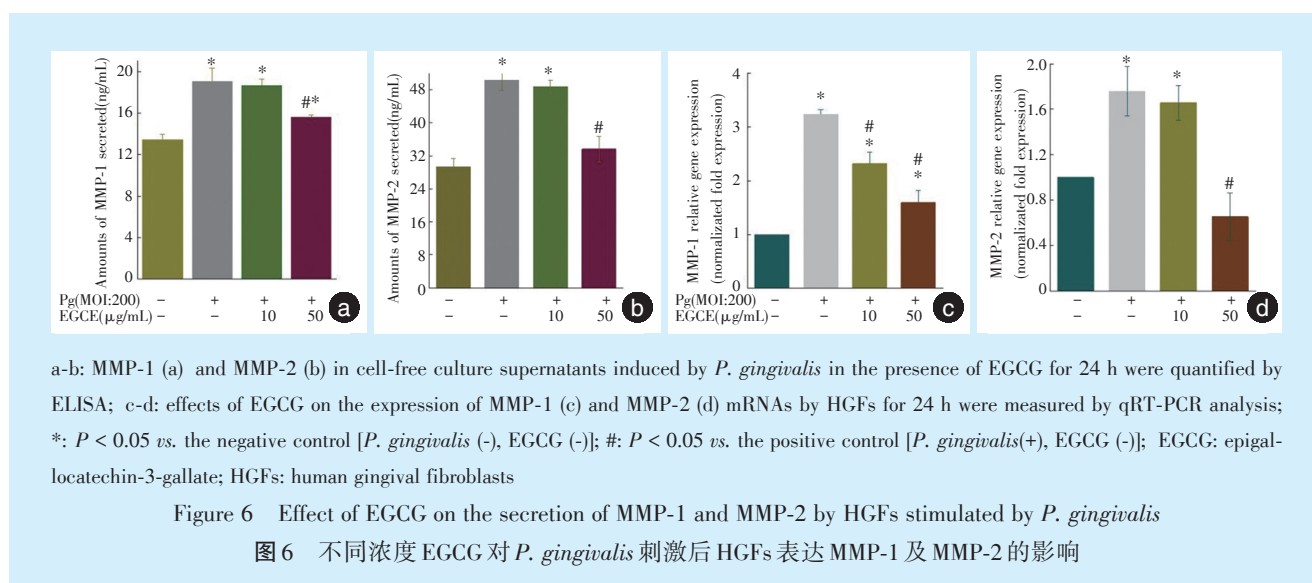
图4 EGCG对*P. gingivalis* Rgp及Kgp蛋白水解活性的影响



液中 MMP-1 和 MMP-2 的分泌被抑制 ($P < 0.05$), 而 10 $\mu\text{g/mL}$ EGCG 对其无明显抑制作用 (图 6a、6b)。

qRT-PCR 结果显示: 与阳性对照组相比, 50 $\mu\text{g/mL}$ EGCG 可显著抑制 *P. gingivalis* 刺激 HGFs 后 MMP-1 和 MMP-2 mRNA 水平升高 ($P < 0.05$), 10

$\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 EGCG 对 MMP-1 mRNA 表达的抑制率分别为 $(28.3 \pm 6.58)\%$ 和 $(50.69 \pm 6.95)\%$ ($P < 0.05$), 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 EGCG 对 MMP-2 mRNA 表达的抑制率为 $(62.92 \pm 11)\%$ (图 6c、6d)。



3 讨论

绿茶儿茶素具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗癌等多种药理作用,其主要成分 EGCG 抗菌作用最强且抗菌谱广^[13]。EGCG 可在细胞质膜的脂质层中产生过氧化氢,导致细胞的裂解^[14];螯合细菌生长必须的铁离子,造成菌体营养缺乏^[15]。此外,EGCG 还可抑制细胞质二氢叶酸还原酶,从而抑制核酸前体的合成^[16]。EGCG 对牙周炎主要致病菌 *P. gingivalis* 有抗菌作用, MIC 为 31.25 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ ^[17-20]。本研究结果显示: EGCG 抑制 *P. gingivalis* ATCC 33277 浮

游菌的生长, MIC 为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

菌斑生物膜形成和成熟是牙周病发生的关键,且成熟生物膜中细菌活性更高,较浮游菌对抗生素或宿主防御功能的抵抗作用更强。因此,抑制生物膜形成、清除成熟生物膜和抑制成熟生物膜活性三个方面能较全面反应药物对菌斑生物膜的影响。本研究发现: 低于 MIC 浓度的 EGCG 对 *P. gingivalis* 生物膜的形成有显著的抑制作用,且呈剂量依赖效应关系。以上结果与 Ben 等^[15]结果类似,在不对细菌生长产生显著影响的前提下,

EGCG可抑制具核梭杆菌生物膜的形成。本研究发现EGCG对已形成的*P. gingivalis*生物膜具有清除作用,扫描电镜分析发现EGCG改变*P. gingivalis*成熟生物膜的结构,生物膜致密结构变薄且疏松,细菌量减少。此外,XTT法检测EGCG对成熟生物膜活性的抑制作用,SMIC₅₀为125 μg/mL。Asahi等^[21]通过激光共聚焦显微镜发现EGCG处理组*P. gingivalis*成熟生物膜中死菌的比例明显高于对照组,进一步证实EGCG可抑制成熟生物膜活性。根据以上结果推测:EGCG可能通过抑制*P. gingivalis*的黏附,初步抑制生物膜的形成。此外,EGCG可抑制成熟生物膜的活性并对成熟生物膜有清除作用,形成疏松多孔的生物膜,利于免疫细胞、药物等进一步渗透,并利于机械方法清除龈下菌斑。

多项体外研究证实,EGCG可抑制细菌的毒力因子活性。变异链球菌是主要致龋菌,葡萄糖基转移酶(glucosyltransferase, GTF)是变异链球菌重要的致病因子。EGCG可抑制葡萄糖基转移酶合成葡聚糖,阻碍细菌黏附形成菌斑生物膜^[22]。此外,EGCG可抑制莫雷梭菌(*Solobacterium moorei*, *S. moorei*)表达β-半乳糖苷酶基因,从而减少与口臭相关挥发性硫化物的产生^[23]。牙龈素是*P. gingivalis*最重要的毒力因子,参与摄取氨基酸,提供营养;促进细菌黏附共聚及菌毛成熟,形成菌斑生物膜^[7, 24-25];降解细胞间黏附分子及多种细胞因子、补体成分,入侵宿主防御反应,最终导致牙周组织破坏^[26-27]。研究发现EGCG能抑制rgpA和kpg基因的表达式,减少Rgp和Kgp的分泌^[19],但尚无对Rgp和Kgp活性的研究。本研究结果显示:低于MIC剂量的EGCG可显著抑制*P. gingivalis*牙龈素Rgp和Kgp裂解特异性产生色底物释放显色团P-硝基苯胺的水平。

宿主对牙周致病菌的免疫反应是造成牙周组织破坏的主要原因,牙周结缔组织中最主要的细胞成分为HGFs,牙周致病菌主要通过刺激HGFs分泌MMPs,破坏细胞外基质稳态,引起牙周组织破坏^[28-30]。研究证实EGCG可抑制伴放线放线杆菌-LPS^[31]及牙龈卟啉单胞菌-LPS^[32]诱导HGFs分泌MMPs。本实验采用*P. gingivalis*直接刺激宿主HGFs产生MMP-1和MMP-2,在加入50 μg/mL EGCG后,HGFs中MMP-1和MMP-2的分泌及表达均下调。

日常绿茶饮品中儿茶素平均浓度为1 mg/mL^[33],EGCG约500 μg/mL,足以抑制*P. gingivalis*的生长及生物膜的形成,此外,超声震动不会引起

EGCG的明显降解^[34]。基于唾液的冲刷作用,难以保证EGCG的有效抗菌浓度,50 μg/mL EGCG仍可抑制*P. gingivalis*毒力因子牙龈素,抑制*P. gingivalis*诱导牙龈成纤维细胞表达MMPs。综上所述,EGCG可作为伴全身疾病的牙周炎辅助治疗的潜在药物。本课题组后续将建立动物模型,多方面证实EGCG的抗菌及抗炎作用,以期对牙周炎的防治提供更多依据。

【Author contributions】 Qi X and Kong LX performed the experiments, analyzed the data, and wrote and revised the article. Li SJ, Ma ST, Qi YL wrote and revised the article. Zhao L designed the study, wrote and revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M, et al. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells[J]. Microb Pathog, 2016, 94(10): 42-47. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.003.
- [2] Tzach-Nahman R, Mizraji G, Shapira L, et al. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* induces peri-implantitis in a murine model: evaluation of bone loss and the local inflammatory response [J]. J Clin Periodontol, 2017, 44(7): 739 - 748. doi: 10.1111/jcpe.12735.
- [3] Lu W, Gu JY, Zhang YY, et al. Tolerance induced by *Porphyromonas gingivalis* may occur independently of TLR2 and TLR4[J]. PLoS One, 2018, 13(7): e0200946. doi: 10.1371/journal.pone.0200946.
- [4] Xu W, Zhou W, Wang H, et al. Roles of *porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2020, 120(120): 45 - 84. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.12.001.
- [5] Mohanty R, Asopa SJ, Joseph MD, et al. Red complex: polymicrobial conglomerate in oral flora: a review[J]. J Family Med Prim Care, 2019, 8(11): 3480-3486. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_759_19.
- [6] Van TE, Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve?[J]. Periodontol, 2020, 82(1): 205 - 213. doi: 10.1111/prd.12317.
- [7] Takeuchi H, Sasaki N, Yamaga S, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(11): e1008124. doi: 10.1371/journal.ppat.1008124.
- [8] Han K, Hwang E, Park JB. Excessive consumption of green tea as a risk factor for periodontal disease among Korean adults[J]. Nutrients, 2016, 8(7): 408. doi: 10.3390/nu8070408.
- [9] Lee HA, Song YR, Park MH, et al. Catechin ameliorates *Porphyromonas gingivalis* - induced inflammation via the regulation of TLR2/4 and inflammasome signaling[J]. J Periodontol, 2020, 91(5): 661-670. doi: 10.1002/JPER.18-0004.

- [10] Zeng Y, Nikitkova A, Abdelsalam H, et al. Activity of quercetin and kaempferol against *Streptococcus mutans* biofilm[J]. Arch Oral Biol, 2019, 98(98): 9-16. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.11.005.
- [11] Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *streptococcus mutans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(3): 1229 - 1236. doi: 10.1128/AAC.01016-10.
- [12] Li B, Li X, Lin H, et al. Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans*[J]. Biomed Res Int, 2018: 4508709. doi: 10.1155/2018/4508709.
- [13] Li Y, Jiang X, Hao J, et al. Tea polyphenols: application in the control of oral microorganism infectious diseases[J]. Arch Oral Biol, 2019, 102: 74-82. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.03.027.
- [14] Asahi Y, Noiri Y, Miura J, et al. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(5): 1164-1171. doi: 10.1111/jam.12458.
- [15] Ben LA, Haas B, Grenier D. Tea polyphenols inhibit the growth and virulence properties of *Fusobacterium nucleatum*[J]. Sci Rep, 2017, 7(7): 44815. doi: 10.1038/srep44815.
- [16] Navarro MD, Navarro PE, Cabezas HJ, et al. Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7): 2914 - 2920. doi: 10.1128/AAC.49.7.2914-2920.2005.
- [17] Zhao L, La VD, Grenier D. Antibacterial, antiadherence, antiprotease, and anti-inflammatory activities of various tea extracts: potential benefits for periodontal diseases[J]. J Med Food, 2013, 16(5): 428-436. doi: 10.1089/jmf.2012.0207.
- [18] Sakanaka S, Aizawa M, Kim M, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(5): 745-749. doi: 10.1271/bbb.60.745.
- [19] Fournier-Larente J, Morin MP, Grenier D. Green tea catechins potentiate the effect of antibiotics and modulate adherence and gene expression in *Porphyromonas gingivalis*[J]. Arch Oral Biol, 2016, 65(65): 35-43. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.01.014.
- [20] Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin EGCG suppresses the *mgI* gene associated with halitosis[J]. J Dent Res, 2010, 89(11): 1304-1308. doi: 10.1177/0022034510378682.
- [21] Asahi Y, Noiri Y, Miura J, et al. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(5): 1164-1171. doi: 10.1111/jam.12458.
- [22] Wu CY, Su TY, Wang MY, et al. Inhibitory effects of tea catechin epigallocatechin-3-gallate against biofilms formed from *Streptococcus mutans* and a probiotic lactobacillus strain[J]. Arch Oral Biol, 2018, 94(94): 69-77. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.06.019>.
- [23] Morin MP, Bedran TB, Fournier-Larente J, et al. Green tea extract and its major constituent epigallocatechin-3-gallate inhibit growth and halitosis-related properties of *Solobacterium moorei*[J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(1): 48. doi: 10.1186/s12906-015-0557-z.
- [24] Kristoffersen AK, Solli SJ, Nguyen TD, et al. Association of the *rg-pB* gingipain genotype to the major fimbriae (*fimA*) genotype in clinical isolates of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*[J]. J Oral Microbiol, 2015, 7: 29124. doi: 10.3402/jom.v7.29124.
- [25] Rieko I, Ishihara K, Shoji M, et al. Hemagglutinin/adhesin domains of *porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *treponema denticola*[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 60(3): 251-260. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00737.x.
- [26] Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins[J]. Periodontol 2000, 2010, 54(1): 15-44. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00377.x.
- [27] Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, et al. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 7242 - 7250. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.7242.
- [28] Bozkurt SB, Hakki SS, Hakki EE, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces a pro-inflammatory human gingival fibroblast phenotype[J]. Inflammation, 2017, 40(1): 144 - 153. doi: 10.1007/s10753-016-0463-7.
- [29] Nazemiasman B, Sajedinejad N, Darvish S, et al. Evaluation of inductive effects of different concentrations of cyclosporine A on MMP-1, MMP-2, MMP-3, TIMP-1, and TIMP-2 in fetal and adult human gingival fibroblasts[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2019, 30(3): 1-8. doi: 10.1515/jbcp-2018-0176.
- [30] Javaid M, Bi J, Biddle C, et al. Platelet factor 4 upregulates matrix metalloproteinase - 1 production in gingival fibroblasts[J]. J Periodontol Res, 2017, 52(4): 787-792. doi: 10.1111/jre.12448.
- [31] Morin MP, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinase secretion by green tea catechins in a three-dimensional co-culture model of macrophages and gingival fibroblasts[J]. Arch Oral Biol, 2017, 75(75): 89-99. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.035.
- [32] Wen WC, Kuo PJ, Chiang CY, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide - enhanced matrix metalloproteinase - 1 production through inhibition of interleukin-6 in gingival fibroblasts[J]. J Periodontol, 2014, 85(6): 868-875. doi: 10.1902/jop.2013.120714.
- [33] Nomura R, Inaba H, Matayoshi S, et al. Inhibitory effect of a mouth rinse formulated with chlorhexidine gluconate, ethanol, and green tea extract against major oral bacterial species[J]. J Oral Sci, 2020, 62(2): 206-211. doi: 10.2334/josnurd.18-0483.
- [34] Zeng J, Xu H, Cai Y, et al. The effect of ultrasound, Oxygen and sunlight on the stability of (-)-Epigallocatechin gallate[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2394. doi: 10.3390/molecules23092394.

(编辑 罗燕鸿,曾曙光)



官网



公众号