doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.21.004

血卟啉单甲醚介导的声动力疗法对牙龈卟啉单胞菌生物膜中丙二醛含量的影响*

张 祎 庄德舒 王宜静 闫春阳 王碧琳 毕良佳△

（哈尔滨医科大学附属第四医院口腔科 黑龙江 哈尔滨 150001）

摘要 目的：探讨血卟啉单甲醚(hematoporphyrin monomethyl ether，HMME)介导的声动力疗法(sonodynamic therapy，SDT)对牙龈卟啉单胞菌(Porphyromonas gingivalis，Pg)生物膜中脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde，MDA)含量的影响。**方法**：羟基磷灰石片培养 Pg 生物膜厌氧培养 3 天，将生物膜随机分为 4 组(对照组、HMME 组、超声组、SDT 组)，分别与无菌生理盐水或 HMME 进行避光孵育，然后进行声动力处理。采用平板计数法计算细菌存活率，MDA 含量使用 MDA 检测试剂盒在可见光分光光度计下进行检测。**结果**：当超声强度为 3 W/cm^2，超声时间为 5 min 时，SDT 组的生物膜细菌存活率仅为 40%，与对照组相比显著降低(P<0.05)，超声组细菌存活率为 62%，与对照组相比亦显著降低(P<0.05)。相同超声参数下，SDT 组 Pg 生物膜中 MDA 含量最高，达 17.3± 1.2 nmol/mL(P<0.05)，超声组生物膜中 MDA 含量为 7± 0.8 nmol/mL，与对照组相比差异并无统计学意义(P>0.05)。**结论**：HMME 介导的 SDT 对 Pg 生物膜有一定杀伤效果，并且在杀伤过程中，可引发脂质过氧化反应，导致 MDA 释放。

关键词：声动力疗法；血卟啉单甲醚；牙龈卟啉单胞菌；生物膜；丙二醛

中图分类号：R-33；R781.4 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2019)21-4017-03

Effect of Sonodynamic Therapy with Hematoporphyrin Monomethyl Ether on the MDA content in the *Porphyromonas Gingivalis* Biofilm*

ZHANG Yi, ZHUANG De-shu, WANG Yi-jing, YAN Chun-yang, WANG Bi-lin, BI Liang-jia△

(Department of Stomatology, The Fourth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME)-mediated sonodynamic therapy (SDT) on the content of lipid peroxides malondialdehyde (MDA) in *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) biofilm. **Methods:** Hydroxyapatite tablets were used to culture *Pg* biofilm anaerobic for 3 days, then biofilm were randomly divided into 4 groups (control group, HMME group, ultrasound group and SDT group), incubated with sterile saline or HMME respectively, and then treated with ultrasound. The bacteria survival rate was calculated by plate counting method. MDA content was detected by MDA detection kit using visible light spectrophotometer after ultrasound treatment. **Results:** When the ultrasound intensity was 3 W/cm^2 and the ultrasound duration was 5 min, the survival rate of bacteria in the SDT group was only 40% (P<0.05), compared to the control group. The survival rate of bacteria in the ultrasonic group decreased to 62% (P<0.05) after the ultrasound treatment, compared to the control group. In the same ultrasound parameters, MDA content was the highest in SDT group, up to 17.3± 1.2 nmol/mL (P<0.05), while the content of MDA ultrasound group was 7± 0.8 nmol/mL, which was not significant statistically compared to the control group (P>0.05). **Conclusions:** HMME mediated SDT has a certain killing effect to *Pg* biofilm, and during the killing process, lipid peroxidation was induced, leading to the release of MDA.

Key words: SDT; HMME; *Pg*; Biofilm; MDA

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R781.4 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)21-4017-03

前言

牙周病是指发生在牙齿支持组织(牙龈、牙周膜、牙槽骨和牙骨质)的一种慢性感染性疾病，是成年人牙齿缺失的首位原因[1]。牙周病患病率高(成人 90%以上)、易复发，主要引起牙周组织的炎症变化(牙周炎)，导致牙龈组织红肿、出血、牙周支持组织破坏、牙齿松动脱落，不但影响患者的咀嚼功能、降低生活质量，而且影响美观和心理健康[2]。现代医学的研究表明牙周病和许多全身疾病如冠心病、糖尿病等的发生、发展关系密切，并能增加早产和低出生体重儿的发生率[3,4]。

牙周病的始动因素是牙菌斑，从根本上预防、治疗牙周病，牙菌斑的控制是关键，亦是难点[5]。牙菌斑是一种细菌性生物

* 基金项目：国家自然科学基金项目(81670994)；黑龙江省自然科学基金项目(H2017022)

作者简介：张祎(1993-)，女，硕士研究生，主要研究方向：声动力疗法在牙周治疗疾病中的作用，E-mail：zoeyzhang0415@163.com

△ 通讯作者：毕良佳(1961-)，男，博士生导师，教授，主要研究方向：声光动力疗法及咬合创伤与牙周病的关系，

电话：0451-82576565，E-mail：biliangjia6601@126.com

(收稿日期：2019-02-28 接受日期：2019-03-24)

膜，是基质包裹的相互粘附、或粘附于牙面、牙间或修复体表面的软而未矿化细菌性群体。然而，牙菌斑是以整体生存的微生物生态群体，其不同于悬浮的单个细菌。细菌嵌入在含有丰富多糖、蛋白质、肽和矿物质组成的基质中，粘附在一起生长，相互附着很紧，难以清除[5]。另一方面，菌斑生物膜的形成是一种适应过程，使细菌能抵抗宿主防御功能、表面活性剂或抗生素等的杀灭作用[6]。目前，已有许多研究证实生物膜中的细菌对抗菌剂的耐药性显著高于其处于浮游状态时，对许多抗菌剂具有很强的抵抗力[7,8]。*Pg* 是研究广泛且证据充足的重要牙周致病菌之一，是引发牙周病的一种主要细菌[9-11]。因此，研究 Pg 生物膜更具有实际意义。

SDT 是一种超声联合声敏剂抑制细菌的前沿方法，其作用机制尚未阐明。有研究表明 SDT 的作用机制可能是超声活化声敏剂后产生如单线态氧、过氧化物、自由基等活性氧物质(reactive oxygen species，ROS)[12,13]。ROS 能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸，引发脂质过氧化作用，从而引起细胞损伤[14]。本实验旨在研究 HMME 介导的声动力疗法对牙龈卟啉单胞菌生物膜的影响，以期为 HMME 介导的 SDT 对牙周病的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

ATCC_33277 牙龈卟啉单胞菌(ATCC，美国)；BHI 血平板(5 mg/L 氯化血红素，10 mg/mL 维生素 K1，50 mL/L 无菌脱纤维羊血)；HMME(上海先辉医药科技有限公司，中国)；厌氧袋(三菱公司，日本)；厌氧指数剂(三菱公司，日本)；羟基磷灰石片(四川大学生物材料工程研究中心，中国)；MDA 测试盒(南京建成生物科技有限公司，中国)。

1.2 方法

1.2.1 仪器 CO_2 恒温培养箱(BB16UV / BB5060UV，Heraeus 公司，德国)；厌氧盒(三菱公司，日本)；脉冲超声波仪器(哈尔滨工业大学物理凝聚态实验室，中国)；可见光分光光度计(EPPENDORF，德国)。

1.2.2 实验菌株的培养 0.9% 无菌生理盐水溶解 Pg (ATCC_33277)冻干粉，无菌涂布于 BHI 血平板(5 mg/L 氯化血红素，10 mg/mL 维生素 K1，50 mL/L 无菌脱纤维羊血)上，置于厌氧箱中，37 ℃，厌氧(80% N_2，10% H_2，10% CO_2)培养 7 天。培养好的 *Pg* 用无菌 BHI 溶液稀释，直到菌液光密度(OD600nm)值为 1.0(约 10^8 cells/mL)为止。

1.2.3 *Pg* 生物膜的培养 羟基磷灰石片置于 24 孔板中，每孔滴加 2 mL 菌液，37 ℃，厌氧(80% N_2，10% H_2，10% CO_2)培养 3天。

1.2.4 SDT 处理 将 24 孔板中培养液吸净，并将生物膜随机分为 4 组，组 1 为对照组；组 2 为 HMME 组；组 3 为超声组；组 4 为 SDT 组；根据实验需要，组 1，3 中与 2 mL 无菌生理盐水、组 2，4 与 2 mL 50 μg/mL 的 HMME 避光条件下，37 ℃孵育 90 min。组 3，4 超声频率为 1 MHz，强度为 3 W/cm²，作用时间 5 min。每组有 10 个样本且重复 3 次。

1.2.5 平板计数法计算细菌存活率 将处理后每组用微量移液枪吸取 50 μL 菌液样本均匀涂在 BHI 血平板上，37 ℃厌氧培养 7 天，对各 BHI 平板上的菌落形成单位(Colony forming unit，CFU)进行数码拍照，用专业图片分析软件进行处理和计算细菌菌落数。得出数据进行细菌存活率的计算。

1.2.6 MDA 检测 将处理后的细菌生物膜吹打至菌液状态收集，应用南京建成生物科技有限公司 MDA 检测试剂盒，根据说明书分别加入检测试剂。使用 532 nm 波长检测各组吸光度值。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 23.0 统计分析软件处理各组实验数据，采用 t 检验的统计学方法比较不同组别之间计量资料数据的差异，以 $P<0.05$ 时为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 SDT 对 Pg 生物膜的杀伤效果

如图 1 所示，当超声强度为 3 W/cm²，超声时间为 5 min 时，SDT 组的生物膜细菌存活率仅为为 40%，与对照组相比显著降低 ($P<0.05$)。超声组经过超声处理后细菌存活率降低至 62%，与对照组相比显著降低($P<0.05$)。然而，HMME 组细菌存活率与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

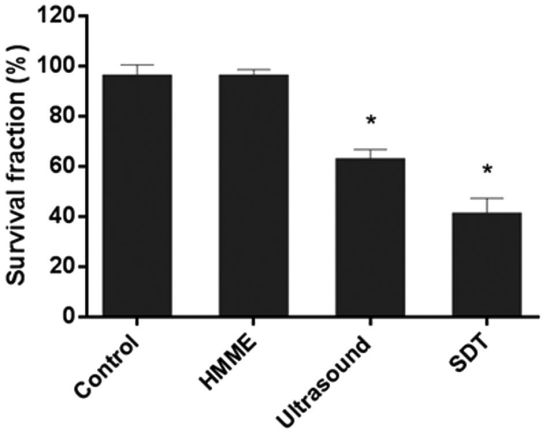

图 1 各组生物膜中细菌存活率比较

Fig.1 Comparison of the survival rate of bacteria from biofilm between different groups

2.2 SDT 对 Pg 生物膜中 MDA 含量的影响

如图 2 所示，SDT 组生物膜中 MDA 含量最高，达 17.3± 1.2 nmol/mL，与对照组相比有统计学差异(P<0.05)，而超声组生物膜中 MDA 含量为 7± 0.8 nmol/mL，与对照组相比差异并无统计学意义($P>0.05$)。

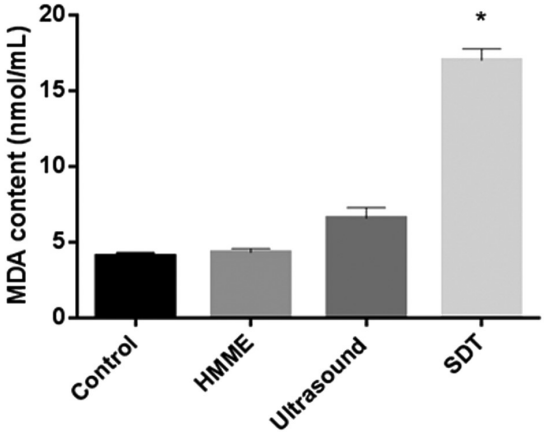

图 2 各组中 MDA 含量比较

Fig.2 Comparison of the content of MDA between different groups

3 讨论

牙周病是口腔中最常见的疾病，成年人中患病率高达90%,严重影响健康和生活质量[15]。牙周病传统的治疗方法虽然具有较好的效果,但也存在很多不足:(1)对操作技术的要求较高,传统的手用器械治疗费时费力,超声治疗存在噪音和敏感的问题[16];(2)效果维持的时间短,2 周后又能恢复到治疗前的细菌水平;(3)器械难以到达某些特殊解剖部位,如窄而深的骨下袋、深牙周袋、以及根分叉和磨牙远中区等,造成菌斑清除的不彻底,影响治疗效果;(4)易产生并发症,如创伤引起的菌血症等;(5)人们对抗生素过分滥用和依赖,导致耐药菌株的迅猛发展[17,18]。近几年,牙周病新型治疗方法的研究在国际备受关注。有研究表明卵黄抗体可以抑制 *Pg* 的生长，并且减少挥发性硫化合物和挥发性有机化合物的产生,可对牙周炎症和口臭起预防作用[19]。还有研究表明成纤维细胞生长因子 -2 通过对牙周韧带(PDL)细胞的增殖、迁移和对细胞外基质产生一系列效应刺激牙周组织再生[20]。

SDT 是一种无创的、安全的、有发展前景的治疗方法,是牙周病新型治疗方法的研究热点之一,其具有靶向性、毒副作用小且组织穿透力强,其产生的活性氧等物质能够有效的杀灭深层的靶向目标[21]。然而,国内外对于 SDT 的报道多关注于杀伤肿瘤细胞方面[22,23],对于其对细菌的作用报道较少[24,25],而 SDT 对于细菌生物膜的作用国内外更尚无报道。本研究中,我们发现在相同的超声强度、频率和作用时间基础上,SDT 组的细菌存活率最低,仅为 40%,表明 SDT 对 Pg 生物膜有杀伤效果,而单纯超声也可以引起 Pg 生物膜的死亡,其存活率为 62%,这可能是由于超声单独可以发挥声流和空化作用,并诱导一些生物效应,如对细胞膜施加剪应力、孔隙形成和内吞作用,这些生物效应可能诱导细胞凋亡,从而杀伤 Pg 生物膜[26]。

已有研究表明过氧化损伤可导致细胞损害甚至死亡[27]。本次研究中,我们发现 SDT 组中 MDA 含量最高,提示 SDT 对细菌生物膜杀伤机制可能与 SDT 杀灭肿瘤细胞相似:HMME 介导的 SDT 诱导 *Pg* 细菌生物膜中产生大量的 ROS,攻击了生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,从而导致 MDA 含量增高,进而导致细菌的凋亡及死亡。

综上所述，超声强度 3 W/cm^2 的超声联合 50 μg/mL HMME 对 *Pg* 生物膜进行 SDT 作用 5 min 后,细菌的存活率为 40%,有显著的杀菌效果。HMME 介导的 SDT 能够有效的杀伤 Pg 生物膜,可能成为将来牙周辅助治疗的重要部分。

参 考 文 献(References)

[1] Ivanovska-Stojanoska M, Popovska M, Anastasovska V, et al. Detection of Virus Herpes Simplex Type 1 in Patients with Chronic Periodontal Disease [J]. Open Access Maced J Med Sci, 2018, 6 (9): 1737-1741

[2] Agnihotri R, Gaur S. Chemically modified tetracyclines: Novel therapeutic agents in the management of chronic periodontitis [J]. Indian J Pharmacol, 2012, 44(2): 161-167

[3] Penova-Veselinovic B, Keelan JA , Wang CA, et al. Changes in inflammatory mediators in gingival crevicular fluid following periodontal disease treatment in pregnancy: relationship to adverse pregnancy outcome[J]. J Reprod Immunol, 2015, 112: 1-10

[4] Soroye M, Ayanbadejo P, Savage K, et al. Association between periodontal disease and pregnancy outcomes [J]. Odontostomatol Trop, 2015, 38(152): 5-16

[5] Cantore S, Ballini, De Vito D, et al. Clinical results of improvement in periodontal condition by administration of oral probiotics [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(5): 1329-1334

[6] Breivik T, Thrane PS, Murison R, et al. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis [J]. Eur J Oral Sci, 1996, 104(4 (Pt1)): 327-334

[7] Wunder DB, BosscherVA, Cok RC, et al. Sorption of antibiotics to biofilm[J]. WaterRes, 2011, 45(6): 2270-2280

[8] Mehdawi IM, Partten J, Spratt DA, et al. High strength re-mineralizing, antibacterial dental composites with reactive calcium phosphates [J]. DentMater, 2013, 29(4): 473-84

[9] Kato T, Yamazaki K, Nakajima M, et al. Oral Administration of Porphyromonas gingivalis Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome[J]. mSphere, 2018, 3(5): e00460-18

[10] Ho M, Lamont RJ, Chazin WJ, et al. Characterization and development of SAPP as a specific peptidic inhibitor that targets Porphyromonas gingivalis [J]. Mol Oral Microbiol, 2018 [Epub ahead of print]

[11] Gao Jin-long, Kwan AH, Yammine A, et al. Structural properties of a haemophore facilitate targeted elimination of the pathogen Porphyromonas gingivalis[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4097

[12] Bullon P, Cordero MD, Quiles JL, et al. Mitochondrial dysfunction promoted by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis [J].Free Radic Biol Med, 2011, 50(10): 1336-1343

[13] Wang Xiao-bin, Jia Ya-li, Wang Pan, et al. Current status and future perspectives of sonodynamic therapy in glioma treatment[J]. Ultrason Sonochem, 2017, 37: 592-599

[14] Li Xue-song, Gao Lei , Zheng Long-bin, et al. The efficacy and mechanism of apoptosis induction by hypericin-mediated sonodynamic therapy in THP-1 macrophages [J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 821-838

[15] Ramsay CR, Clarkson JE, Duncan A, et al. Improving the Quality of Dentistry (IQuaD): a cluster factorial randomised controlled trial comparing the effectiveness and cost-benefit of oral hygiene advice and/or periodontal instrumentation with routine care for the prevention and management of periodontal disease in dentate adults attending dental primary care [J]. Health Technol Assess, 2018, 22 (38): 1-144

[16] Bansal V, Gupta R, Dahiya P, et al. A clinico-microbiologic study comparing the efficacy of locally delivered chlorhexidine chip and diode LASER as an adjunct to non-surgical periodontal therapy [J]. J Oral Biol Craniofac Res, 2019, 9(1): 67-72

[17] Kirtikliene T, Naugzemys D, Steponkiene A, et al. Evaluation of the Inter- and Intrahospital Spread of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Lithuanian Hospitals [J]. Microb Drug Resist, 2018[Epub ahead of print]

[18] Upreti N, Rayamajhee B, Sherchan SP, et al. Prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus, multidrug resistant and extended spectrum β-lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2018, 7: 121

(下转第 4102 页)

2017, 33(5): 506-508

[13] 常颖, 徐鹏, 高利生. 甲卡西酮的液相色谱法测定 [J]. 化学分析计量, 2012, 21(1): 67-69

[14] 常颖, 高利生. 卡西酮、甲卡西酮和 4- 甲基甲卡西酮的 LC-MS/MS 分析方法的研究[J]. 刑事技术, 2014 (1): 29-30

[15] 常颖, 张春水, 高利生. 甲卡西酮的 LC-MS/MS 定性定量分析方法[J].化学分析计量, 2013, 22(3): 51-53

[16] Sørensen L K. Determination of cathinones and related ephedrines in forensic whole-blood samples by liquid-chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2011, 879 (11-12): 727-736

[17] Swortwood Madeleine J Swortwood,Diane M. Boland, DeCaprio Anthony P. Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis[J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(4): 1383-1397

[18] Kiyotaka Usui, Tomomi Aramaki, Masaki Hashiyada, et al. Quantitative analysis of 3,4-dimethylmethcathinone in blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a fatal case[J]. Legal Med, 2014, 16(4): 222-226

[19] Zhang Lin, Wang ZhaoHong, Li Hong, et al. Simultaneous determination of 12 illicit drugs in whole blood and urine by solid phase extraction and UPLC-MS/MS [J]. J. Chromatogr B, 2014, 955-956 (1): 10-19

[20] Hafid B T, Nouredine S. Methcathinone: A new postindustrial drug [J]. Forensic Sci Int, 2005, (153): 99-101

[21] Hyde J F, Browning E, Adamas R. Synthetic homologs of d, l-ephedrine[J]. J Amer ChemSoc, 1928, 50 (8): 2287-2292

[22] Bentur Y, Bloom K A, Raikhlin E B. Illicit cathinone("hagigat") poisoning[J]. Clin. Toxicol, 2008, 46(3): 206-210

[23] 钱振华, 徐鹏, 刘克林. 新型毒品卡西酮类策划药 " 浴盐 "[J].中国药物滥用防治杂志, 2013, 19(1): 42-44

[24] 国家食品药品监督管理总局 (CFDA) . 国家药物滥用监测年度报告(2016 年)[R]. 2017

[25] 高小平. 苯丙胺类毒品将成为 21 世纪泛滥最广的毒品[J].中国药物依赖性杂志, 2002, 11(1): 73-74

[26] Odoardi S, Romolo F S, Strano-Rossi S. A snapshot on NPS in Italy: Distribution of drugs in seized materials analysed in an Italian forensic laboratory in the period 2013-2015 [J]. Forensic Sci Int, 2016, (265): 116-120

[27] 李重阳, 王乐, 赵文成. 甲卡西酮类新型策划毒品的危害及其检测[J].中国司法鉴定, 2014, (2): 47-50

(上接第 4019 页)

[19] Wu Qiao, Fang Wang , Xu Xiao-chen, et al. Egg yolk immunoglobulin interactions with Porphyromonas gingivalis to impact periodontal inflammation and halitosis[J]. AMB Express, 2018, 8(1): 176

[20] Fujihara C, Kanai Y, Masumoto R, et al. Fibroblast growth factor-2 inhibits CD40-mediated periodontal inflammation [J]. J Cell Physiol, 2018[Epub ahead of print]

[21] Sazgarnia A, Shanei A, Eshghi H, et al. Detection of sonoluminescence signals in a gel phantom in the presence of Protoporphyrin IX conjugated to gold nanoparticles[J]. Ultrasonics, 2013, 53(1): 29-35

[22] Li Ye-kuo, Zhou Qun-fang, Deng Zhi-ting, et al. IR-780 Dye as a Sonosensitizer for Sonodynamic Therapy of Breast Tumor [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25968

[23] Li Nan, Sun Miao, Wang Yao, et al. Effect of cell cycle phase on the sensitivity of SAS cells to sonodynamic therapy using low intensity ultrasound combined with 5-aminolevulinic acid in vitro[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 3177-3183

[24] Costley D, Nesbitt H, Ternan N, et al. Sonodynamic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using a Rose Bengal-antimicrobial peptide conjugate [J]. Int J Antimicrob Agents, 2017, 49 (1): 31-36

[25] Wang Xin-na, Ip M, Leung AW, et al. Sonodynamic action of hypocrellin B on methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Ultrasonics. 2016, 65: 137-144

[26] Qin Peng, Han Tao, Yu ACH, et al. Mechanistic understanding the bioeffects of ultrasound-driven microbubbles to enhance macromolecule delivery[J]. J Control Release, 2018, 272: 169-181

[27] Li Qi-lin, Wu Yan-hua, Niu mu, et al. Protective effects of tacalcitol against oxidative damage in human epidermal melanocytes [J]. Int J Dermatol, 2017, 56(2): 232-238