**分类号：R781.1 学校代码：10392**

**学科专业代码：100302** 学 号：2100904294

**福 建 医 科 大 学**

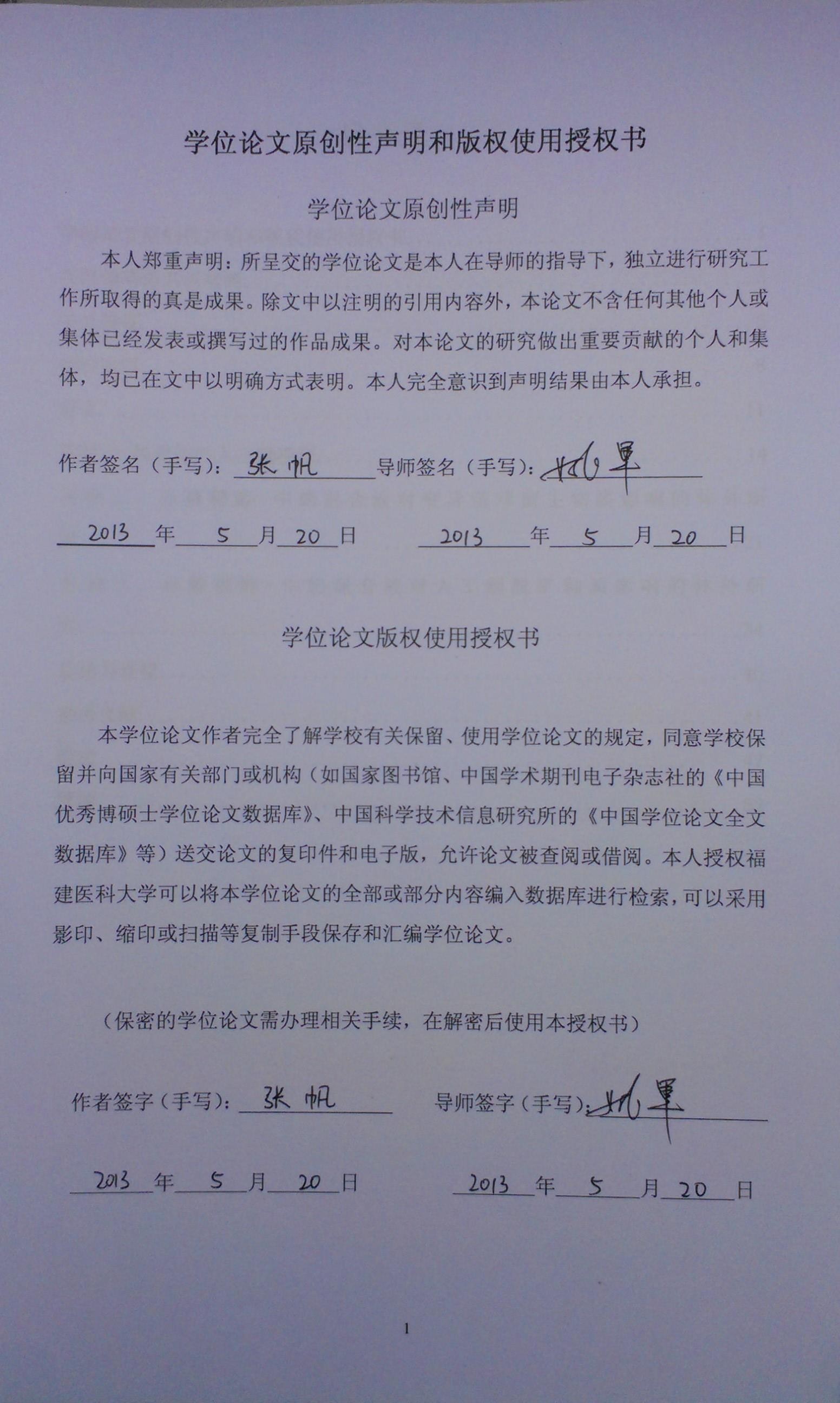
**硕 士 研 究 生 毕 业 论 文**

**赤藓糖醇-牛奶混合液对人工龋菌斑生物膜及 脱矿釉质影响的体外研究**

**The in vitro effect of Erythritol-milk mixture in a biofilm-enamel model**

|  |  |
| --- | --- |
| **学 位 类 型 ：** | **医学硕士** |
| **所 在 学 院 ：** | **口腔医学院** |
| **研** 究 **生：** | **张帆** |
| **学 科、专 业：** | **口腔临床医学** |
| **导** **师：** | **姚军** **副教授** |
| **研究起止日期：** | **2011 年 9 月至 2013 年 3 月** |
| **答 辩 日 期 ：** | **2013 年 5 月 24 日** |

**二○一三年五月**



**目 录**

**英汉缩略语名词对照**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文简称 | 英文全称 | 中文全称 |
| ATCC | American Type Culture Collection | 国际标准菌株 |
| BHI | Brain-heart Infusion | 牛心脑浸液 |
| CLSM | Confocal Laser Scanning | 激光共聚焦 |
| CPP-ACP | Microscopy  Casein Phosphopeptide- | 扫描显微镜  酪蛋白磷酸肽 |
| d | Amorphic Calcium Phosphate  Day | 钙磷复合体  天 |
| ESEM | Environmental Scanning Electron  Microscope | 环境扫描电镜 |
| h | Hour | 小时 |
| HA | Hydroxyapatite | 羟磷灰石 |
| GTF | Glucosyltransferase | 葡糖基转移酶 |
| KHN | Knoop Hardness Number | 洛式硬度值 |
| min | Minute | 分钟 |
| ml | Milliliter | 毫升 |
| MS | Mitis Salivarious Agar | 轻唾琼脂培养基 |
| N | Newton | 牛顿 |
| OD | Optical Density | 光密度 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| s | Second | 秒 |
| SMH | Surface Microhardness | 表面显微硬度 |
| S.mutans | Streptococcus Mutans | 变异链球菌 |
| SNK | Student-Newman-Keuls | 多重比较法 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| SPSS | Statistical Package for the | 社会科学统计软 |
|  | Social Sciences | 件包 |
| VHN | Vicker Hardness Number | 维式硬度值 |
| WTO | World Trade Organization | 世界贸易组织 |
| ％SHL | Percentage Of Surface Hardness | 显微硬度损失 |
|  | Loss | 百分比 |
| μl | Microliter | 微升 |
| μm | Micrometre | 微米 |

**赤藓糖醇-牛奶混合液对人工龋菌斑生物膜及**

**脱矿釉质影响的体外研究**

**中文摘要**

**目的：**

赤藓糖醇是一种新型的糖醇类甜味剂，具有低热量、高耐受、无毒副作用、吸湿性低等优点，近年来研究发现其还具有预防龋病的作用。牛奶含有丰富的营养成分，有“白色血液”之称，其中的钙、磷无机盐离子及酪蛋白等物质也具有防龋的效果。本研究试将赤藓糖醇与牛奶配伍，希望既发挥出赤藓糖醇蔗糖替代品的特点及牛奶营养丰富的优点，满足儿童对糖摄入量及生长发育的营养要求，又能够在一定程度上减少龋病的发生，探讨赤藓糖醇-牛奶混合液用于龋病预防的可行性及机理，为其安全广泛的使用提供实验依据。

**方法：**

1.构建体外人工龋模型

采用细菌诱导法，选择变异链球菌（Streptococcus mutans, S. mutans）作为致龋菌种。在培养的第6h、12h、24h、36h、48h、60 h和72 h通过测定釉质块表面附着生物膜的光密度值来绘制生物膜生长曲线。测定釉质表面显微硬度值，至与建模前差异有统计学意义时停止实验，根据硬度值的改变判断是否形成早期的釉质龋坏。

2.赤藓糖醇-牛奶混合液对变异链球菌生物膜影响的体外研究

使用牛心脑浸液（Brain-heart infusion, BHI）、加氟牛奶溶液、牛奶、2%赤藓糖醇-牛奶混合液、4%赤藓糖醇-牛奶混合液、6%赤藓糖醇-牛奶混合液对实验一中建立的体外人工龋模型进行处理。建模120h后，剥离S. mutans生物膜，活菌计数法观察生物膜中活菌总量。激光共聚焦扫描显微镜（Confocal Laser Scanning

Microscopy，CLSM）观察细菌生物膜结构，以及计算生物膜不同部位的活菌百分比。

3.赤藓糖醇-牛奶混合液对人工龋脱矿釉质影响的体外研究

在建模第25d，测量釉质显微硬度值，与建模前比较差异有统计学意义，终止实验。去除表面生物膜后，测量釉质块显微硬度，提示矿物质丢失情况。环境扫描电镜（Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM）观察釉质表面显微结构。

**结果：**

1. S. mutans生物膜表现出缓慢的非线性生长趋势，6~12h曲线直陡，12~48h变缓，48~72h曲线极为平缓。与实验前相比，人工龋组釉质块经处理后硬度值显著下降(P<0.05)，而对照组硬度值无明显变化（P> 0.05）。

2. BHI组活菌数显著高于其它组（P<0.05）；2%赤藓糖醇-牛奶组生物膜活菌数高于4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组的活菌数（P<0.05）；4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组、加氟牛奶组生物膜中活菌数差别不大，没有统计学意义（P> 0.05）。

CLSM观察发现加氟牛奶组、赤藓糖醇-牛奶组生物膜各层的活菌百分比高于BHI组及牛奶组，但生物膜结构松散，细菌疏松分布。

3.各组釉质的硬度值均下降（P<0.05）；BHI组、牛奶组、2%赤藓糖醇-牛奶组显微硬度损失最多；4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组及加氟牛奶组显微硬度损失小。

ESEM观察，BHI组釉质表面凸凹不平破坏最为严重；加氟牛奶组釉质表面平整，沉积了晶体颗粒；牛奶组釉质表面少量颗粒沉积；2%、4%、6%赤藓糖醇

-牛奶组釉质表面均较平坦，矿物质颗粒似膜状覆盖，微孔减少；6%赤藓糖醇-

牛奶组沉积物最饱满，微孔几乎消失。

结论：

1.应用该实验方法可以诱导建立出体外人工龋模型所需的S. mutans生物膜，建模终止时牙釉质具备牙釉质早期龋的基本表现，该模型可用于后续的实验研

究。

2.赤藓糖醇-牛奶混合液能够抑制S. mutans生物膜的生长及粘附，且4%与6%

赤藓糖醇-牛奶混合液效果优于2%赤藓糖醇-牛奶混合液。

3.各浓度的赤藓糖醇-牛奶混合液均能减轻表层釉质的脱矿程度，促进再矿化的发生，且6%赤藓糖醇-牛奶混合液再矿化作用最强。

**关键词：**赤藓糖醇； 牛奶； 生物膜； 防龋； 脱矿

**The in vitro effect of Erythritol-milk mixture in a biofilm-enamel model**

**Abstract**

**Purposes ：**

Erythritol is a new type of sugar alcohols sweetener, has low quantity of heat, high resistance, non-toxic side effects, hygroscopicity advantages, in recent years, the study found that it also has the function of prevention of caries disease. Milk contains rich nutrition, be called" white blood", it contains calcium, phosphorus inorganic salt ion and casein and other material can play a role of preventing caries. This research try to make a combination of erythritol and milk, hope the mixture both play erythritol sugar substitutes attributes and milk nutrition characteristics, to meet the child to eat sugar quantity and growth of nutrition requirements, the most important is to prevent caries disease. Make a study about the mixture's feasibility and anticaries mechanism, to provide the experimental evidences for it be safety and widely used.

**Methods ：**

1. Constructing an artificial caries model in vitro

S. mutans were choosed to incubate the caries model. The optical density were measured at 6, 12, 24, 36, 48, 72 hours, following a curve described biofilm growth. Measure enamel surface microhardness value and stop the experiment when statistical significance was found between before, judging whether the model formed early enamel caries according to the change of hardness value.

2. The in vitro effect of Erythritol-milk mixture to S. mutans biofilm

Using BHI, fluorine milk, milk, 2% erythritol-milk,4% erythritol-milk, 6% erythritol-milk deal with established caries model. Stripping S. mutans biofilm after modeling 120 hours, viable count method to observe biofilm total viable, CLSM to observe the bacterial biofilm structure and calculate the viable percentage in different parts of the biofilm.

3. The in vitro effect of Erythritol-milk mixture to take off mine enamel Measuring enamel microhardness value in the modeling 25 day found the statistical significance was meaningful, terminate the experiment. Remove surface biofilm, measuring enamel block microhardness reaction mineral loss situation. Using ESEM to observe the enamel surface microstructure.

**Results ：**

1. S. mutans biofilm showed slow nonlinear growth trend, 6-12 hour curve straight steep, 12-48 hour slow, 48-72 hour curve was very gentle. Compared with before, artificial caries group enamel block processing of hardness significantly (P<0.05), whereas the control hardness value no significant change (P> 0.05).

2. BHI group viable quantity was significantly higher than other groups (P<0.05); 2% erythritol-milk group more than 4% erythritol-milk group and 6% erythritol-milk group (P<0.05); 4% erythritol-milk group, 6% erythritol-milk group, and fluorine milk group viable count had no statistical significance (P> 0.05).

CLSM results showed that the viable percentage of fluorine milk group and erythritol milk group were higher than the BHI group and milk group in each layer, but biological membrane structure loose and bacteria distribution.

3. All group made normal enamel hardness value decrease (P<0.05); BHI group, milk group, 2% erythritol-milk group hardness loss most; 4% erythritol-milk group, 6% erythritol-milk group and fluorine milk group microhardness loss small.

ESEM pictures showed that BHI group enamel surface rough and uneven in the most, serious destruction; fluorine milk group enamel surface level off, deposit the crystal particles; Milk group enamel surface a small amount of particles sedimentation; 2%, 4%, 6% erythritol-milk group enamel surface were flat, mineral particles cover like membrane, microporous reduced; 6% erythritol-milk group sediment most full, microporous almost disappear.

**Conclusions：**

1. Application of the experimental method can induce the S. mutans biofilm which was necessary in established this in vitro model, at the end of modeling the caries enamel owed the basic caries performance. This model can be used for subsequent experiments.

2. Erythritol-milk mixture can inhibition S. mutans biofilm growth and adhesion at certain extent.

3. All the concentration of erythritol-milk mixture can reduce surface enamel demineralization, promote again the occurrence of mineralization, and 6% erythritol-milk mixture had strongest mineralization ability.

**Key words:** Erythritol; Milk; Biofilm; Caries-preventing; Demineralization

**赤藓糖醇-牛奶混合液对人工龋菌斑生物膜及**

**脱矿釉质影响的体外研究**

前 **言**

龋病是一种引起牙体缺损和丧失，严重危害人类健康的口腔常见多发病，

WHO将其列为重点防治的非传染性的三大疾病之一，仅次于心血管疾病和肿瘤。在发展中国家，由于饮食结构的改变，食糖消费量增加，龋病发病呈明显的上升趋势【1】。这种趋势在儿童中尤为明显，我国2005年乳牙龋病流行病学调查发现：

5岁组儿童患龋率高达66%【2】。如果不采取有效的预防措施，可以预料在不久的将来形势将更加严峻。

引起龋齿的原因众多，主要包括微生物、食物、宿主和时间这四个因素。其中，细菌存在是龋病发生的先决条件。现代医学认为，龋病是由附着在牙面上的菌斑微生物引起的感染性疾病。细菌粘附聚集在釉质表面形成三维立体空间结构的生态系-牙菌斑，菌斑内的细菌代谢碳水化合物产酸，但此时菌斑中的基质形成屏障阻碍酸的扩散，使局部微环境的pH值下降，钙磷离子溶出，牙体硬组织脱矿，当脱矿率大于再矿化率后，矿物质持续丢失，最终就会导致牙体组织的缺损，龋齿形成【3】。尽管有超过500种细菌参与了菌斑的生长致龋过程，但S. mutans是公认的主要致龋病原菌【4】。食物是龋病发生的物质基础，碳水化合物能被细菌利用代谢产酸，其中的蔗糖被称为龋病的“罪魁”，其致龋性远远高于其他食物。此外，宿主的全身情况、唾液流量、对龋齿的易感性等也是龋病发生的重要环节。而以上三个因素需要同时存在一定长的时间才可能引发龋齿。目前学者们也在对龋病发生相关因素进行研究并寻找控制菌斑，促进釉质再矿化，寻找糖代用品，增强牙齿抗龋能力等方法来预防龋病。

常用控制菌斑的方法是机械性菌斑控制法，如刷牙、使用牙线、牙间刷等。但一般人群刷牙清除菌斑的效果仅在40~60%之间【5】。因此，抗微生物类漱口液作为机械性控制菌斑法的补充应运而生。其中，洗必泰、甲硝唑制剂控制菌斑的效果较为肯定，但却伴随口腔糜烂、牙面染色、味苦等副作用【6】。在诸多的防龋措施中，氟化物已被广泛应用，它通过抑制脱矿，促进再矿化，干扰致龋菌代

谢，抑制致龋菌多种代谢酶达到防龋效果【1】。但是氟化物防龋也存在一定的风险，一旦氟的含量没有严格掌控，就有可能引起氟中毒、氟骨症、氟斑牙等严重后果【7-8】。因此，寻找天然、安全、有效的防龋物质和途径成为龋病防治的研究热点。

赤藓糖醇因其具有的安全性、防龋性吸引了大家的注意。赤藓糖醇，又名原藻醇、赤兔草醇，化学名1, 2, 3, 4-丁四醇，是一种带有清凉口感的填充型功能性食糖替代品。与ft梨糖醇、甘露糖醇和木糖醇一样同属于糖醇。天然存在于海澡、蘑菇、甜瓜、葡萄和发酵食物中，亦存在于人体眼球、血清、精液里，作为人类膳食的组分已有数万年的历史。

赤藓糖醇还具有一些其它糖醇无法比拟的优点：第一：低热量值，能量值仅为0.84KJ/g，是所有多元糖醇甜味剂中能量值最低的一种；第二：高耐受量、无毒副作用，进入机体的赤藓糖醇80%会迅速彻底的被小肠吸收，避免了腹泻、腹胀等肠道不适。此外，有实验表明，赤藓糖醇无致畸毒性，不影响生殖和发育，不引起染色体变异，不致癌变，也不刺激肿瘤生长；第三：低吸湿性，赤藓糖醇即使在相对湿度90%以上的环境中也不易吸湿；第四：抗龋齿性【9-11】。Kawanabe

J等人【12】的动物实验表明，用含有赤藓糖醇的饲料喂养大鼠，大鼠的患龋率就会大大的下降。Miikinen KK等人【13】研究发现在赤藓糖醇环境下，牙菌斑的总重量和其中S. mutans的数量以及唾液中S. mutans的数量都有明显的下降。本课题组的前期研究【14-16】显示，赤藓糖醇溶液可以抑制S. mutans的生长繁殖、产酸以及

S. mutans在菌斑形成过程中的粘附。与相同浓度的木糖醇溶液相比，质量分数为

2%赤藓糖醇溶液已具有抑制S. mutans产酸及粘附的作用，并在质量分数为6%和

8%时效果更为明显。综上所述，赤藓糖醇具有安全天然的食品属性，优良的加工性能以及防龋特性，非常适合为儿童这类嗜糖人群提供一条防龋新途径。

牛奶作为一种营养丰富的健康饮品，对儿童的生长发育有诸多益处。此外，一些动物实验表明牛奶还具有一定程度的抗龋作用。Reynolds用致龋性食物喂养小鼠，发现饮用牛奶的动物患龋程度显著低于饮水的动物。Harper等也观察到去酪蛋白的牛奶可以减少动物光滑面龋和窝沟龋的发生【17】。目前的研究证实牛奶的防龋效能主要与酪蛋白、无机盐离子有关。酪蛋白经过酶消化后得到的酪蛋白磷酸肽(CPP)结合无定形磷酸钙(ACP)，在牙体表面可持续提供钙和磷酸根离子，

促进牙体再矿化并抑制牙体脱矿。此外，酪蛋白还参与了牛奶蛋白膜的形成，牛奶蛋白膜通过抑制细菌对牙表面的黏附、阻止牙表面pH值的降低、抑制脱矿和促进再矿化来发挥防龋的作用。而牛奶中丰富的钙磷离子则为再矿化提供矿物质来源。

近些年来，加氟牛奶的防龋研究也成为一个新的热点。牛奶中加入氟化物后，氟与钙、磷形成类似的矿化系统，可以使釉质表面的钙离子浓度明显增高，有效抑制早期釉质龋的脱矿【18】。王文辉等证实在体外模型中，2mg/L的氟奶就有明显的再矿化作用【19】。在智利和匈牙利，加氟牛奶预防龋病的措施已经起到了一定的作用。但随着氟摄入途径增多，加氟牛奶也存在着氟含量不易掌控、氟中毒等风险【20】。

与氟化物、化学制剂、中草药等防龋措施相比，赤藓糖醇具有安全的食品属性，能够从日常的饮食方面预防龋病。本研究参考加氟牛奶的体外防龋实验，采用更具生物安全性的赤藓糖醇代替氟化物，建立体外龋病模型，并在此模型的基础上观察赤藓糖醇-牛奶混合液对S. mutans生物膜及早期脱矿的釉质有何影响，试图寻找一条新的防龋途径，为一种可以安全广泛使用的防龋食物的开发利用提供理论依据。

**实验一 构建体外人工龋模型**

龋病是细菌代谢碳水化合物产酸，引起牙体硬组织脱矿的结果。在龋病的研究中，由于自然形成的早期龋所需时间长，一般需6~18个月，结构多变，影响因素多，使有关龋损形成机制及防治方法的研究很难直接在口内进行。为了探讨龋病的发生机制以及有效防治办法，人工龋实验被广泛应用【21】。本实验采用细菌诱导法【22】建立体外人工龋模型，通过测定生物膜生长曲线、牙釉质表面显微硬度，确定能形成S. mutans菌斑生物膜以及类似自然早期的釉质龋坏，为下一步研究提供实验材料。

目 录

[结论：](#_Toc68688521) 6

**[Abstract](#_Toc68688522)** 6

[前](#_Toc68688523)[言](#_Toc68688523) 6

[1. 材料和方法](#_Toc68688524) 7

**[2.](#_Toc68688525)** [结果](#_Toc68688525) 8

**[3.](#_Toc68688526)** [讨论](#_Toc68688526) 8

**[1.](#_Toc68688527)** [材料和方法](#_Toc68688527) 9

**[2.](#_Toc68688528)** [结果](#_Toc68688528) 10

**[3.](#_Toc68688529)** [讨论](#_Toc68688529) 12

**[1.](#_Toc68688530)** [材料和方法](#_Toc68688530) 13

**[2.](#_Toc68688531)** [结果](#_Toc68688531) 13

**[3.](#_Toc68688532)** [讨论](#_Toc68688532) 15

[总结与展望](#_Toc68688533) 15

[参考文献](#_Toc68688534) 15

[参考文献：](#_Toc68688535) 17

# 1. 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 实验菌株

变异链球菌标准株（S. mutans）ATCC 25175（由四川大学华西口腔医学院龋病研究室惠赠）。

### 1.1.2 主要试剂及试验仪器

1.牛心脑浸液液体培养基(BHI)

2.超净工作台（上海力申科学仪器有限公司）

3. YQX-Ⅱ厌氧培养箱（上海新苗医疗器械制造有限公司）

4.酶标仪（Heraeu，德国） 5.显微硬度仪（上海尚材试验机有限公司）

### 1.1.3 实验溶液的配制

配置BHI液体培养液，121℃高压蒸汽灭菌15min，置于冰箱保存备用。

配置BHI固体培养基，121℃高压蒸汽灭菌15min，倒板，冷却后置于冰箱保存备用。 1.2实验方法

### 1.2.1 菌液的制备

接种S. mutans标准株至BHI固体培养基内，37℃厌氧(80%N2、10%CO2、10%H2)

条件下复苏24h。

取上述复苏的标准株单个菌落接种于BHI固体培养基内，相同条件下培养

24h。

将上述标准株单个菌落接种于BHI液体培养基内，相同条件下培养6h，离心，弃上清，PBS缓冲液稀释菌落，调菌浓度至酶标仪测定OD(630nm) =l.0，此为工作菌悬液。

菌悬液进行革兰氏染色，镜下形态学观察确定为该菌纯培养物后备用。

### 1.2.2 全唾液的收集【23】

选择无龋齿、无牙周病的志愿者，收集早饭后2h经石蜡刺激的自然混合的全唾液，4℃、4000g离心15min，取上清，0.22μm微孔滤膜过滤除菌。经培养无菌生长后，放入4℃冰箱备用。

### 1.2.3 标本收集与制备

收集因乳牙滞留而拔除的下颌乳中切牙，符合以下纳入标准的乳牙进入本实验：①各离体牙形态大小基本一致；②均为无龋健康的下颌乳中切牙；③牙冠表面无裂纹；④唇面光滑，无视诊可见的发育不良、脱矿等。

无氟石英粉清洗牙齿，去除表面有机污染物，分离冠根，冠部超声清洗，干燥，观察无龋损、氟斑、裂痕。置于去离子水中4℃冰箱保存备用。

唇面釉质用800#-1200#-2400#碳化硅砂纸在流水下依次磨平，抛光机抛光使表面呈镜面。过程中去除表层约150μm，以消除表面有机污染物和表面的不规则，在这种釉质表面上制备的龋损与自然釉质表面比更具重复性和一致性【24】。自然干燥后，釉质块表面开窗2 mm×2 mm，其余区域涂布两层指甲油使其完全封闭。

釉质块置于75%乙醇中消毒24小时。

### 1.2.4 唾液获得性膜的形成

将消毒好的釉质块放入全唾液中37℃孵育24小时，使釉质块上形成唾液获得性膜。

### 1.2.5 实验分组

将釉质块随机分为对照组和人工龋两组。

对照组：将12块已形成唾液获得性膜的釉质块分别置入含BHI培养液3ml的试管中。37℃厌氧培养，每12h更换一次培养液，共孵育25d。

人工龋组：将已形成唾液获得性膜的12块釉质块分别置入含BHI培养液3ml、菌液0.15ml的试管中，37℃厌氧培养，先连续培养48h，其间每12h更换2.4ml的

BHI培养液，形成48h的S. mutans生物膜后，每12h更换一次培养液，每24h补充一次菌悬液，共孵育25d。

### 1.2.6 测定人工龋模型生物膜生长曲线

分别在6h、12h、24h、36h、48h、60 h和72 h取出釉质块，加入0. l ml PBS缓冲液，旋涡震荡器混旋3min，λ=630nm，以时间为横轴，吸光度为纵轴，记录各时间段细菌生物膜的形成情况，绘制生物膜生长曲线。

### 1.2.7 测定釉质块表面显微硬度

人工龋形成前后分别测量釉质块的表面显微硬度（surface microhardness，

SMH）。建模前于每个标本釉质表面中央垂直测3个点，显微硬度计（Vicker压头，

0.98N，15s）测量出釉质表面VHN(Vicker hardness number)，建模25d后取出釉质块，选取基线另一侧釉质面测量3个点的硬度值，将3次显微硬度的平均值作为该样本牙釉质显微硬度值。

### 1.2.8 统计学分析

应用SPSS16.0软件对数据进行分析，绘制菌斑生物膜生长曲线，对建模前后的牙釉质显微硬度进行配对样本t检验，P<0.05为差异有统计学意义。

# **2.** 结果

## 2.1 人工龋模型生物膜生长曲线

测定人工龋模型中菌斑生物膜的生长曲线发现：S. mutans单菌种生物膜表现出缓慢的非线性生长趋势，6~12h曲线直陡，生物膜生长迅速，12~48h曲线变缓，生物膜生长速度逐渐减慢，48~72h曲线极为平缓，生物膜增长非常缓慢，表现为相对的生长停滞期（如图1-1所示）。

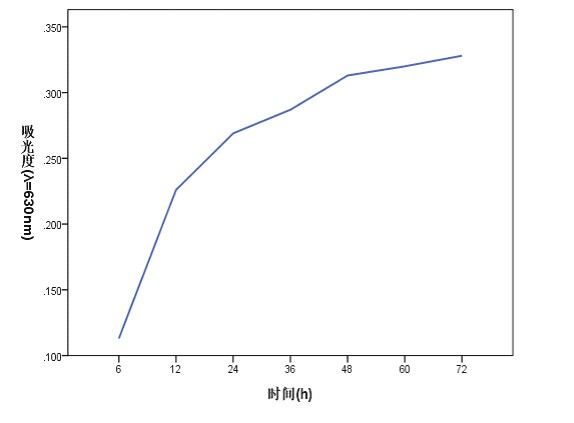


图1-1 人工龋模型中变异链球菌生物膜生长曲线

## 2.2 釉质块表面显微硬度

统计学软件SPSS16.0分析结果可见，人工龋组釉质块处理后VHN显著下降，较处理前差别有统计学意义(P<0.05)，而对照组处理前后VHN无明显变化，差别没有统计学意义（P> 0.05）。

具体结果见图1-2。



图1-2 人工龋形成前后釉质块的显微硬度值（平均值）注：\*表示表示每一实验组处理前后VHN比较P<0.05。

# **3.** 讨论

在龋病研究中，人工龋模型占有重要的地位，它在龋病病因、病理及预防治疗方面都起着不可替代的作用。目前人工致龋的方法主要有口内法和体外法，体外法又包括化学致龋法、电化学法、细菌诱导法和人工口腔模型【21】。本实验采用细菌诱导法建立人工龋模型，即在牙体硬组织块上放置致龋菌悬液，37℃培养一定时间即可诱导出典型的龋病样病损【25】。牙菌斑是龋病发生的始动因子，这种方法考虑了龋病发生的微生物因素，较单纯的化学法更具临床相关性【21】。人工口腔模型是一种可模拟天然口腔环境的龋病研究装置，它可用于研究致龋因素的作用、龋病病变的特征以及鉴定防龋药物的效能【26】。但国内外先进的人工口腔模型结构复杂，造价昂贵。为此，本实验探索利用现有的技术条件，建立较为简化的体外人工龋模型，并进行系列实验验证其可行性。

S. mutans是龋病的主要致病菌，本实验培养的是S. mutans单菌种生物膜。与自然菌斑相比，S. mutans单菌种生物膜虽然在结构和代谢上均与其有一定的差

异，但考虑到后续实验需要观察实验溶液对S. mutans生长代谢的影响以及各组生物膜导致的龋损情况，采用S. mutans单菌种生物膜能使各组之间的差异能够得到更清晰的反映，而实验结果也可以为进一步研究体外多菌种生物膜以及口内原位生物膜提供参考，奠定基础。

生物膜的生长周期一般可分为5个阶段：1.最初的定植阶段；2.不可逆黏附阶段；3.结构的分化阶段；4.成熟阶段；5.膜细胞脱落再定植阶段【27】。本试验的

S. mutans生物膜生长曲线显示：6~12h曲线斜率最大，菌斑生物膜处于形成初期，大量S. mutans定植黏附在釉质表面；12~48h生物膜生长速度减慢，细菌粘附减少，菌斑生物膜进入到结构的分化阶段；48~72h表现为相对的生长停滞期，菌斑生物膜逐渐成熟。该曲线总体表现出缓慢的非线性生长趋势，这和其他学者对

S. mutans生物膜的研究结果相吻合【28-29】。因此，应用该实验方法可以成功的在体外建立诱导人工龋模型所需的S. mutans生物膜，为后续实验奠定基础。

显微硬度测定是目前常用的釉质硬度测量方法，其原理为用一个特殊形状的金刚石压头压迫测试面，施以一定的压力（50-500g），停留特定时间使标本产生永久形变，随后在光镜或电镜下测量压痕长度，计算出被测牙釉质的硬度。根据压头的不同，分为维式硬度和洛式硬度【30】。文献报道的正常牙釉质洛氏硬度在272~440 KHN(knoop hardness number)之间，维氏硬度在242~339VHN(vicker hardness number)之间。

釉质龋是一种非细胞反应性病变，基本变化为脱矿和再矿化。研究龋病脱矿和再矿化的程度，通常是以矿物质的变化情况作为病损严重程度及相关变化的度量。对病变常用的定量检测--显微硬度就是通过对矿物质的丢失量进行量化来描述病变。Koulurides等【31】研究表明，当用显微硬度测量早期脱矿的釉质时，矿物质含量的减少与硬度变化直接存在线性关系，即：如果压痕长度值增大，说明矿物质的损失；如果压痕长度值减小，说明矿物质的获得。此外，Featherstone研究发现表面显微硬度测定对小于50μm深度的病损或脱矿早期阶段很敏感【32】。

Zero等用表面显微硬度值的改变作为口内釉质脱矿程度的指标，显示出比碘渗透法更具快捷性、灵敏性和准确性【33】。综上所述，表面显微硬度测试作为一种检测早期釉质龋的高效便捷的指标被广泛应用。

大量研究表明，出现表层下脱矿的白垩色的釉质龋并不是最早期的龋损，最

早期的脱矿是釉柱周边溶解而致釉质表面软化，但表层下还未出现病损。此时，显微硬度值的变化可以敏锐的反应出釉质表面矿物质的流失，从而检测出早期的釉质龋。

本研究通过分析釉质块表面显微硬度值的变化来评价人工龋模型中是否形成釉质龋，结果表明：人工龋组釉质块致龋后VHN显著下降(P<0.05)，说明釉质表层有大量的矿物质丢失，脱矿大于再矿化；而对照组VHN无明显变化（P> 0.05），实验前后釉质表层矿物质含量并无明显差别，没有脱矿现象。由此可见，通过该实验方法诱导出的体外人工龋模型具备牙釉质早期龋的基本表现，该模型可用于后续的实验研究。

**实验二 赤藓糖醇-牛奶混合液对变异链球菌生物膜**

**影响的体外研究**

菌斑生物膜是龋病发生的始动因素，预防龋病发生最基础的方法是机械清除菌斑生物膜，抑菌药物的使用起着重要的辅助作用，但目前普遍使用的洗必泰等抑菌剂存在诸多弊端【34-35】。赤藓糖醇是一种新型发酵型低热量甜味剂，生物安全性好【36】，国内外亦有文献【14-15】【37】报道赤藓糖醇能够抑制口腔内主要致龋菌

-S. mutans的生长及产酸，以及减弱S. mutans在菌斑形成过程中的粘附能力。近些年来，牛奶因营养丰富受到广大消费者的青睐，加氟牛奶作为一种防龋途径取得了一定效果，但氟含量一旦使用不当就会引起氟中毒等严重后果。

本研究采用更具食品安全性的赤藓糖醇替代氟化物，将赤藓糖醇与牛奶结合，在实验一体外人工龋模型的基础上观察赤藓糖醇-牛奶混合液对变异链球菌生物膜形态结构及活性的影响。

# **1.** 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 实验菌株

变异链球菌标准株（S. mutans）ATCC 25175（由四川大学华西口腔医学院龋病研究室惠赠）。

### 1.1.2 主要试剂及试验仪器

1.牛心脑浸液液体培养基(BHI)

2.轻唾琼脂培养基（Mitis Salivarious Agar, MS）

3. L-7012 LIVE／DEAD BacLightTM Bacterial Viability Kit(Molecular Probes, USA)

4.赤藓糖醇（ft东宝龄宝生物股份有限公司）

5.幼儿配方奶粉（香港明一营养食品国际集团股份有限公司）

6.超净工作台（上海力申科学仪器有限公司）

7. YQX-Ⅱ厌氧培养箱（上海新苗医疗器械制造有限公司）

8.酶标仪（Heraeu，德国）

8.激光共聚焦扫描显微镜（OLYMPUS, 日本）

### 1.1.3 实验溶液的配制及灭菌

配制BHI液体培养液，121℃高压蒸汽灭菌15min，置于冰箱保存备用。配置BHI固体培养基，121℃高压蒸汽灭菌15min，倒板，备用。

配制MS固体培养基，121℃高压蒸汽灭菌15min，倒板，备用。

配制质量分数为2%、4%、6%的赤藓糖醇溶液各20ml，121℃高压蒸汽灭菌

15min，随后按照奶粉冲配比例（水: 奶粉=210ml:31.5g）分别加入3g奶粉，震荡混匀，400W、25KHz超声震荡灭菌30min，吸取7ml溶液平铺于直径9cm玻璃培养皿内，使溶液厚度d<2mm，将装有溶液的培养皿置于紫外消毒灯下照射

30min，以上操作均在无菌环境下进行【38-41】。消毒完毕后各组溶液均吸取50μl，均匀涂布于BHI固体培养皿，37℃有氧培养12h无菌生长后使用。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌液的制备 同实验一

### 1.2.2 全唾液的收集和样本的收集 同实验一

### 1.2.3 样本的制备

无氟石英粉清洗牙齿，去除表面有机污染物，分离冠根，冠部超声清洗，干燥，观察无龋损、氟斑、裂痕。置于去离子水中4℃冰箱保存备用。

唇面釉质用800#-1200#-2400#碳化硅砂纸在流水下依次磨平，抛光机抛光使表面呈镜面。自然干燥，取18个釉质块表面开窗2mm×2mm，其余区域涂布两层指甲油使其完全封闭。12个釉质块继续打磨为唇面2mm×2mm的标本，抛光。

所有釉质块置于75%乙醇中消毒24小时。

### 1.2.4 唾液获得性膜的形成 同实验一

### 1.2.5 实验分组

将开窗的18个釉质块和未开窗的12个釉质块随机分为6组，每组5个，处理如下：

第一组：BHI组即阴性组，不做任何处理，形成常态菌斑生物膜。

第二组：加氟牛奶组即阳性组，形成48h的生物膜后，每12小时加氟牛奶溶液处理30min，氟含量为2mg/L。

第三组：牛奶组，形成48h的生物膜后，每12小时牛奶溶液处理30min。

第四组：2%赤藓糖醇-牛奶混合液组，形成48h的生物膜后，每12小时2%赤藓糖醇-牛奶混合液处理30min。

第五组：4%赤藓糖醇-牛奶混合液组，形成48h的生物膜后，每12小时4%赤藓糖醇-牛奶混合液处理30min。

第六组：6%赤藓糖醇-牛奶混合液组，形成48h的生物膜后，每12小时6%赤藓糖醇-牛奶混合液处理30min。

### 1.2.6 样本处理

将牙釉质块垂直放置于六孔板内，加入6ml的BHI培养液及0.3ml的S. mutans菌悬液，37℃厌氧(80%N2、10%CO2、10%H2)条件下培养，第48h形成S. mutans生物膜后，每12小时对各组进行处理，第120h时取出釉质块，无菌PBS液冲洗，备用。 1.2.7釉质块表面生物膜的活菌计数

将釉质块置于无菌离心管中，加入1mlPBS缓冲液，旋涡振荡器震荡90s。各组分别取100μl混悬液十倍倍比稀释至10-4，取50μl均匀涂布于MS培养基上，37℃厌氧培养48h，计数平皿上的菌落数量，每个样本重复3次，其均值为该样本活菌数。

### 1.2.8 激光共聚焦扫描显微镜观察生物膜结构

1.2.8.1死菌／活菌荧光染色

（1）荧光染液的配制

荧光染色剂为L-7012 LIVE／DEAD BacLightTM Bacterial Viability Kit，含有两种荧光染液SYTO-9和PI，其中SYTO-9使活细菌发出绿色荧光，PI使死细菌发出红色荧光，从而可以在镜下区分活菌和死菌。按SYTO-9: PI：蒸馏水=1.5μl：

1.5μl: lml的比例配置荧光染液。在避光条件下，将以上3种试剂加入同一离心管，振荡混匀，备用，每一个标本使用200μl染液。

（2）菌斑生物膜的荧光染色

将附着有菌斑生物膜的釉质块用无菌PBS液轻轻洗涤两次，以去除未粘附的细菌。取200μl荧光染液滴于釉质表面的菌斑生物膜，黑暗中室温孵育15min。随后无菌PBS液再次轻轻洗涤生物膜标本，以去除表面附着物，37℃风干2min。随后在各组标本上滴加70%甘油一滴封片。

1.2.8.2激光共聚焦扫描显微镜观察

将上述标本置激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)下观察。观察条件：氩激光（514

／488nm），氦氖激光(543nm)，物镜×40。

在死菌／活菌荧光染色的标本中，死菌为红色，活菌为绿色。每个生物膜标本由内（生物膜和玻片相贴的一面）向外（生物膜游离的一面）逐层沿Z轴扫描。通过随机附带的专业软件处理，得到生物膜的断层扫描图像。应用OLYMPUS图像分析软件分别计算死菌／活菌连续扫描图像内层、中间层、外层红光和绿光的荧光量，分别代表生物膜内层、中间层、外层的情况，从而对死菌／活菌量进行计数，通过公式计算活菌百分比。计算公式为：

每层活菌百分比=每层绿色荧光量/（每层红光+绿光荧光量的总和）

### 1.2.9 统计学分析

应用SPSS16.0软件进行数据分析，对各组S. mutans生物膜活菌数及各层的活菌百分比进行单因素方差分析，SNK-q检验对各组均数进行两两比较，P<0.05设为差异有统计学意义。

# **2.** 结果

## 2.1 各组处理后对生物膜活菌量的影响

### 2.1.1 活菌计数结果

统计分析结果可见，与阴性组即BHI组相比，其它组的活菌数目均显著减少

（P<0.05）；2%赤藓糖醇-牛奶组生物膜活菌数显著高于4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组的活菌数（P<0.05）；4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组、加氟牛奶组生物膜中活菌数差别不大，没有统计学意义（P> 0.05）。

具体数值见见表2-1及图2-1。

表2-1 各组生物膜的活菌数

| 组别 ±SD (×105 CFU／mm2) |
| --- |
| BHI组 179.00±9.85a  加氟牛奶组 140.83±8.08bc  牛奶组 151.50±10.85bc  2%赤-牛奶组 156.67±15.31b  4%赤-牛奶组 136.50±14.72c  6%赤-牛奶组 131.67±5.39c |

注：2%赤-牛奶组为2%赤藓糖醇-牛奶组，4%赤-牛奶组为4%赤藓糖醇-牛奶组，

6%赤-牛奶组为6%赤藓糖醇-牛奶组。

a、b、c表示各实验组间活菌量的比较，字母不同，表示P<0.05，字母相同表示

P> 0.05.



图2-1 各组生物膜活菌数

### 2.1.2 各组活菌计数图片如下（图2-2至图2-7）：

图2-2 BHI组 图2-3 加氟牛奶组

图2-4 牛奶组 图2-5 2%赤藓糖醇-牛奶组

图2-6 4%赤藓糖醇-牛奶组 图2-7 6%赤藓糖醇-牛奶组

## 2.2 激光共聚焦扫描显微镜对各组变异链球菌生物膜结构的观察

### 2.2.1 各组处理后对变异链球菌生物膜各层细菌的影响

2.2.1.1对生物膜内层细菌的影响

与其他5组相比，BHI组细菌最密集，层层叠叠如层积云，其死菌（红色表示死菌，绿色表示活菌）比例相对较高，细菌团块间可见众多形态各异的暗黑色管道；加氟牛奶组活菌增多，黑色管道增多变粗、结构模糊不清，细菌密度降低；牛奶组细菌散开，呈小团块状；2%赤藓糖醇-牛奶组、4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组菌斑结构更为疏松，大量黑色管道系统，但存在细菌多为活菌。

2.2.1.2对生物膜中间层细菌的影响

BHI组生物膜结构致密，死菌与活菌密集交织，管道清晰；加氟牛奶组菌斑密度降低，活菌增多，管道结构模糊；牛奶组死菌增多，菌斑密度降低；2%赤藓糖醇-牛奶组、4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组菌斑结构疏松，细菌松散分布，存在细菌多为活菌。

2.2.1.3对生物膜外层细菌的影响

生物膜外层细胞稀疏变少，呈触角状伸向外部，断断续续渐渐消失弥散。加氟牛奶组仍是活菌多于死菌，管道系统模糊；牛奶组死菌多于活菌；2%赤藓糖醇-牛奶组、4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组细菌总量明显下降，存在细菌多为活菌。

各组内、中间、外层CLSM图片见图2-9至图2-26。

图2-9 内层 （BHI组） 图2-10 中间层（BHI组）图2-11 外层（BHI组）

图2-12 内层（加氟牛奶组）图2-13 中间层（加氟牛奶组）图2-14 外层（加氟牛奶组）

图2-15 内层（牛奶组） 图2-16 中间层（牛奶组）图2-17 外层（牛奶组）



图2-18 内层（2%赤-牛奶组）图2-19中间层（2%赤-牛奶组）图2-20外层（2%赤-牛奶组）



图2-21 内层（4%赤-牛奶组）图2-22中间层（4%赤-牛奶组）图2-23外层（4%赤-牛奶组）



图2-24 内层（6%赤-牛奶组）图2-25中间层（6%赤-牛奶组）图2-26外层（6%赤-牛奶组）

2.2.1各组生物膜活菌百分比

各组S. mutans生物膜活菌百分比均为由内层往中间层逐渐增加，由中间层往外层又逐渐降低。

在生物膜内层，加氟牛奶组与6%赤藓糖醇-牛奶组活菌百分比显著高于其它组（P<0.05）；2%赤藓糖醇-牛奶组、4%赤藓糖醇-牛奶组活菌百分比显著BHI组

及牛奶组（P<0.05）；BHI组、牛奶组活菌百分比最低，差异没有统计学意义

（P> 0.05）。

在生物膜中间层，加氟牛奶组与6%赤藓糖醇-牛奶组活菌百分比仍显著高于其它组（P<0.05）；2%赤藓糖醇-牛奶组、4%赤藓糖醇-牛奶组活菌百分比显著BHI组及牛奶组（P<0.05）；BHI组活菌百分数高于牛奶组（P<0.05）。

在生物膜外层，加氟牛奶组、4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组活菌百分比显著高于其它组（P<0.05）；2%赤藓糖醇-牛奶组活菌百分比显著BHI组及牛奶组（P<0.05）；牛奶组活菌百分比高于BHI组（P<0.05）。

具体数据见表2-2及图2-8。

表2-2 菌斑生物膜活菌百分比（%）

| 组别 内层 中层 外层 |
| --- |
| BHI组 36.33±2.16a 48.36±1.36c 33.95±1.94b 加氟牛奶组 55.54±1.85c 58.52±1.15b 50.55±1.71a 牛奶组 37.97±0.60a 40.88±1.44d 38.66±1.19c  2%赤-牛奶组 50.99±1.47b 53.59±0.79a 46.89±1.43d  4%赤-牛奶组 51.50±1.36b 53.06±1.60a 51.54±1.43a  6%赤-牛奶组 56.42±1.13c 58.33±0.59b 54.89±0.62e |

注：a、b、c、d、e表示各实验组间活菌百分比的比较，字母不同，表示P<0.05，字母相同表示P> 0.05。



图2-8 各组生物膜活菌百分比

# **3.** 讨论

龋病是人类最常见的感染性疾病之一，S. mutans是公认的主要致龋菌。由于认识和研究方法的局限性，对其的早期研究大多针对浮游状态的标准参考菌株

【42】。然而在口腔中的牙齿表面，细菌是以生物膜的方式生长，启动一套完全不

同的基因系统，生物学特征明显不同于游离状态的细菌【43】。本实验在实验一模型的基础上，对附着在乳牙釉质块上的S. mutans生物膜进行处理，处理频率模仿1-3岁婴幼儿进食牛奶的习惯（每日2次，30min/次）【44】。基于课题组前期研究显示2%赤藓糖醇已具有抑制S. mutans产酸及粘附的作用，并且赤藓糖醇在食品领域的应用浓度为3%左右，在质量分数8%时已几近饱和【15】，实验采用2%、4%、6%的赤藓糖醇-牛奶混合液验证其防龋效能，更具实用性。加氟牛奶作为阳性对照组。采用CLSM、活菌计数对菌斑生物膜进行定性、定量检测，以此评价赤藓糖醇-牛奶混合液对菌斑生物膜的影响。

细菌生物膜定性研究的主要目的是了解细菌生物膜形成过程及生物膜形态结构，定量研究又有半定量和定量之分。半定量研究方法是将附着于材料表面的

生物膜作为一个整体进行测量【45】。实验采用的CLSM是20世纪80年代发展起来的一种新型高精度显微镜系统，可以直接、完整、实时地研究生物膜的内部结构。它通过水平、垂直的对生物膜进行连续清晰的断层扫描，得到生物膜每个不同层面的精细图像结构，对生物膜进行定性研究【46】。此外，CLSM结合特定荧光染料对生物膜中的活细菌和死细菌进行荧光染色后，可以得到生物膜不同部位的活菌百分比，为实验提供定量资料。而传统的活菌计数为生物膜中活菌总数提供一个直观的计量资料，可一定程度的反应出生物膜中细菌粘附量及生物膜活力。

菌斑生物膜的形态结构与生物膜的生物学特征及细菌的活力之间有着相辅相成的内在联系。生物膜是一个有着三维立体空间结构的生态系，自身能产生大量的细胞外基质，细菌存在于基质中，而基质中有着丰富的气道和水道，进行着营养和代谢产物的输送，并且还存在着复杂的信号分子，协调细胞行为，表达出生物膜细胞所特有的功能【47】。CLSM图片显示BHI组生物膜密集，各层死菌比例均相对较高，细菌团块间可见众多形态各异的暗黑色管道。各浓度的赤藓糖醇

-牛奶组生物膜结构疏松，细菌散开，有大量的黑色管道，荧光分析后发现赤藓糖醇-牛奶组生物膜的内、中间、外层活菌百分比均增高。赤藓糖醇经实验【14】证实不能为S. mutans生长提供营养来源，并且在高浓度下表现出对S. mutans较强的生长抑制作用。但牛奶中含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物等营养成分。

Wolfgang等【18】研究发现在离体牙模型中，牛奶自身的营养成分能加速菌斑生物膜的成熟。此时，营养物质通过生物膜中发达的管道系统扩散到生物膜的内部，为细菌提供营养，菌斑活菌增多，活菌百分比增高。牛奶组生物膜细菌呈小团块状散开，密度高于赤藓糖醇-牛奶组，死菌多于活菌，管道系统清晰，可能与菌斑密度较高，内部代谢产物堆积影响细菌生长同时死菌堆积有关。

Kawanabe J等【12】实验证实，赤藓糖醇不能被葡糖基转移酶（GTF）所利用。此外，牛奶中有7种蛋白质能与唾液中蛋白、GTF竞争结合羟磷灰石(HA)上的位点。用牛奶包被HA后，GTF对HA的吸附量明显减少，使葡聚糖的合成量减少。GTF是S. mutans在代谢过程中自主产生的，此酶利用蔗糖催化合成的α-键葡聚糖是S. mutans致龋的主要毒力因子。其中，通过α-1, 3-糖苷键将葡糖基彼此连接形成的非水溶性葡聚糖具有很强的粘结性，介导细菌粘附到硬组织表面及细菌之间的聚集，紧密覆盖在介质表面形成一道屏障。而主要通过α-1, 6-糖苷键连接形成

的水溶性葡聚糖则为细菌提供能源贮库和营养底物。

生物膜活菌计数结果显示赤藓糖醇-牛奶混合液处理后生物膜的活菌总量下降，且4%及6%赤藓糖醇-牛奶混合液抑菌效果优于2%赤藓糖醇-牛奶混合液。推测赤藓糖醇-牛奶组活菌总量下降与赤藓糖醇抑制GTF活力，牛奶中蛋白阻止

GTF吸附至釉质表面有关。S. mutans在釉质表面粘附时受阻，粘附细菌量减少，菌斑密度降低，CLSM扫描出赤藓糖醇组疏松的菌斑图像也证实了这一点。此外，实验证明S. mutans的黏附量与赤藓糖醇质量分数呈负相关【16】，赤藓糖醇溶液浓度为6%时抑制S. mutans粘附的效果优于木糖醇。结合实验结果中4%及6%赤藓糖醇-牛奶混合液活菌总量低于2%赤藓糖醇-牛奶混合液，推测因为赤藓糖醇溶液浓度越高对S. mutans粘附所起的抑制作用越强烈，将赤藓糖醇与牛奶结合后，赤藓糖醇这种抑制S. mutans粘附的特性依旧存在，从而使较高浓度的赤藓糖醇-牛奶溶液具有更强的抑制细菌粘附的作用。

本实验结果表明赤藓糖醇-牛奶混合液能在一定程度上抑制S. mutans生物膜的生长。主要是因为赤藓糖醇不能作为S. mutans生长及GTF分解的底物，此外，牛奶中的成分也降低了GTF活性，因而对生物膜中细菌的粘附及生长代谢产生影响。但由于赤藓糖醇-牛奶混合液成分的复杂性，其是否存在其它能够破坏和阻止生物膜结构的成份及因两者混合而可能产生的物质结构性能的变化尚需进一步的研究探明。

**实验三赤藓糖醇-牛奶混合液对人工龋脱矿釉质影**

**响的体外研究**

正常生理状态下，牙齿处于脱矿和再矿化的动力平衡之中，当环境改变、平衡被打破后，如果脱矿占主导地位，结果是矿物质的逐渐丢失，最终导致龋洞的形成。但如果环境中存在具有再矿化能力的对抗因素，钙、磷离子将再次沉积，修复被侵蚀的釉质晶体，恢复表面硬度。本实验在实验一早期龋模型的基础上，观察经过赤藓糖醇-牛奶混合液处理后，牙釉质表面脱矿是否停止或发生再矿化。选择测量表面显微硬度反映釉质表面的矿物质含量的改变，扫描电镜反映釉质表面的超微结构。

# **1.** 材料和方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 实验菌株

变异链球菌标准株（S. mutans）ATCC 25175（由四川大学华西口腔医学院龋病研究室惠赠）。

### 1.1.2 主要试剂及试验仪器

1.赤藓糖醇（ft东宝龄宝生物股份有限公司）

2.幼儿配方奶粉（香港明一营养食品国际集团股份有限公司）

3.超净工作台（上海力申科学仪器有限公司）

4. YQX-Ⅱ厌氧培养箱（上海新苗医疗器械制造有限公司）

5.酶标仪（Heraeu，德国）

6.显微硬度仪（上海尚材试验机有限公司）

7.环境扫描电镜（荷兰FEI公司）

### 1.1.3 实验溶液的配制及灭菌

配制BHI液体培养液，121℃高压蒸汽灭菌15min，置于冰箱保存备用。

配制质量分数为2%、4%、6%的赤藓糖醇溶液各20ml，121℃高压蒸汽灭菌

15min，随后按照奶粉冲配比例（水: 奶粉=210ml:31.5g）分别加入3g奶粉，震荡混匀，400W、25KHz超声震荡灭菌30min，吸取6.7ml溶液平铺于直径15cm玻

璃培养皿内，使溶液厚度d<2mm，将装有溶液的培养皿置于紫外消毒灯下照射

30min，以上操作均在无菌环境下进行。消毒完毕后各组溶液均吸取50μl，均匀涂布于BHI固体培养皿，37℃有氧培养12h无菌生长后使用。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌液的制备 同实验一

### 1.2.2 全唾液的收集 同实验一

### 1.2.3 标本收集与制备 同实验一

### 1.2.4 唾液获得性膜的形成 同实验一

### 1.2.5 实验分组

将30个釉质块随机分为6组，每组5个，处理如下：

第一组：BHI组即阴性组，每12h更换BHI培养液，形成常态菌斑生物膜。第二组：加氟牛奶组即阳性组，形成48h的生物膜后，每12小时加氟牛奶溶

液处理30min，氟含量为2mg/L。

第三组：牛奶组，形成48h的生物膜后，每12小时牛奶溶液处理30min。

第四组：2%赤藓糖醇-牛奶混合液组，形成48h的生物膜后，每12小时2%赤藓糖醇-牛奶混合液处理30min。

第五组：4%赤藓糖醇-牛奶混合液组，形成48h的生物膜后，每12小时4%赤藓糖醇-牛奶混合液处理30min。

第六组：6%赤藓糖醇-牛奶混合液组，形成48h的生物膜后，每12小时6%赤藓糖醇-牛奶混合液处理30min。

### 1.2.6 测量釉质块表面显微硬度

将实验第25d时的样本取出，显微硬度仪(Vicker压头, 0.98N, 15s)于各标本暴露窗口再次测量表面VHN（在基线测量点的另一侧平行测3个点），然后对两次不同时间（处理前、处理后）测得的所有3个硬度值的平均值进行比较并计算出表面显微硬度损失的百分比（％SHL），计算公式如下：

%SHL=（基线硬度值－处理后硬度值）×100/基线硬度值

### 1.2.7 扫描电镜观察

将实验第25d的样本取出，超声震荡30min以去除菌斑生物膜，自然干燥，放入2.5％戊二醛液中4℃下固定4 h以上，脱水，干燥、喷金，扫描电镜观察。

### 1.2.8 统计学分析

应用SPSS16.0软件进行分析，实验前后VHN的比较选用配对t检验。各组％

SHL的比较选用单因素方差分析(ANOVA)及其SNK-q检验对组间进行两两比较，

P<0.05设为差异有统计学意义。

# **2.** 结果

## 2.1 釉质块表面显微硬度

实验前后显微硬度值比较，实验各组均使正常釉质的VHN下降（P<0.05）（见表3-1），但组间比较（见图3-1）%SHL则有显著的不同。通过方差分析，各组%SHL之间具有显著的统计学意义（P<0.05）。两两比较可见，BHI组、牛奶组、2%赤藓糖醇-牛奶组显微硬度损失最多，组组间差异无统计学意义(P> 0.05)；4%赤藓糖醇-牛奶组、6%赤藓糖醇-牛奶组及加氟牛奶组显微硬度损失小，差异无统计学意义（P> 0.05），但与BHI组差异有统计学意义(P<0.05)。

表3-1 实验前后牙釉质表面维式硬度（VHN）

| 实验组 | 处理前VHN | 处理后VHN | %SHL |
| --- | --- | --- | --- |
| 加氟牛奶组 | 332.42±11.47 | 255.55±10.48\* | 23.12±3.15b |
| BHI组 | 332.75±12.55 | 220.93±12.21\* | 33.60±3.69a |
| 牛奶组 | 332.75±12.55 | 233.19±13.98\* | 29.92±4.20ac |
| 2%赤-牛奶组 | 331.85±10.85 | 238.02±8.36\* | 28.27±2.52ab |
| 4%赤-牛奶组 | 331.68±12.92 | 241.68±15.98\* | 27.13±4.82bc |
| 6%赤-牛奶组 | 332.95±11.20 | 252.70±9.57\* | 24.10±2.88b |

注：\*表示每一实验组处理前后VHN比较P<0.05。

a、b、c表示各实验组间％SHL的比较，字母不同表示P<0.05，字母相同表示P> 0.05。



图3-1 各组%SHL(牙釉质硬度丢失百分比）

注：a、b、c表示各实验组间％SHL的比较，字母不同表示P<0.05，字母相同表示P> 0.05。

## 2.2 扫描电镜观察牙釉质表面形态

在扫描电镜下观察，BHI组釉质表面凸凹不平，釉柱形态已模糊不清，层叠似深壑；加氟牛奶组釉质表面较为平整，沉积了许多圆形或椭圆形的晶体颗粒，同时出现密集的0.1μm-0.5μm大小的微孔；牛奶组釉质表面较为光洁，只有少量颗粒沉积；2%、4%、6%赤藓糖醇-牛奶组釉质表面均较平坦，见分布不均匀、细小的矿物质颗粒似膜状覆盖釉质表面，微孔逐渐减少，在6%赤藓糖醇-牛奶组沉积的膜状物最为饱满，微孔结构几近消失。

图3-2 BHI组 图3-3 加氟牛奶组

图3-4 牛奶组 图3-5 2%赤藓糖醇-牛奶组

图3-6 4%赤藓糖醇-牛奶组 图3-7 6%赤藓糖醇-牛奶组

# **3.** 讨论

龋病是牙对牙菌斑及其代谢产物的反应。菌斑中的细菌利用可发酵的碳水化合物产酸，这些酸以非解离的形式通过获得性膜扩散入牙齿，使局部微环境的pH值下降，硬组织脱矿，羟磷灰石晶体溶解破坏，无机钙、磷移出。

人牙龋损的形成不是一个简单的持续性脱矿过程，而是脱矿与再矿化的连续动力学反应。脱矿是在酸的作用下，牙中的矿物质发生溶解，钙和磷酸盐等无机离子由牙中脱出。当钙、磷和其他矿物质离子沉积于脱矿釉质表面则牙齿得到了再矿化【48】。在此过程中，如果脱矿占主导作用，将会导致牙体硬组织缺损。反之，如果再矿化占主导作用，牙体硬组织处于一个被修复的过程。实验溶液只要对脱矿过程有抑制或对再矿化过程有促进作用，那么这个溶液就对牙体矿化方面有积极作用，进而抑制龋病的发生发展【49】。

釉质表面的显微硬度值能够反应釉质表面下的脱矿量，而扫描电镜则提供了釉质表面的超微结构。釉质未脱矿时表面光滑平整，内部羟磷灰石晶体相互平行排列成束状，釉柱间散在分布lμm-3μm大小不等的微孔，呈“微孔网络”结构【50】，酸及矿物质离子沿此途径进行双向扩散。实验阴性组釉质表面的正常形态模糊不清，同时%SHL达33.6%，说明该组样本釉质已发生脱矿，且形成了表浅的龋损，其表面一些蓬松的物质可能是因为疏松的结构而吸附的杂质。牛奶组釉质表面只有少量颗粒沉积，%SHL为29.92%，但差别与BHI组没有统计学意义。加氟牛奶组釉质表层较为连续完整，晶体颗粒沉积，%SHL降为23.12%。提示外环境中的钙、磷、氟在浓度梯度的推动下进入到脱矿部位发生沉积，形成氟羟磷灰石晶体，修复了脱矿后的釉质，且再矿化物覆盖了脱矿后釉质孔隙，阻止了脱矿的进一步发生。这与王文辉【51】等学者的研究结果相一致。在赤藓糖醇-牛奶组釉质表面均较为平整，颗粒沉积成膜状，微孔结构减少，%SHL与加氟牛奶组没有统计学差别，提示其对脱矿的釉质有再矿化作用，这些减少的微孔可使酸和脱矿离子双向扩散减少，降低釉质的脱矿速率。不同浓度之间比较发现：6%赤藓糖醇-牛奶混合液再矿化效果优于2%及4%赤藓糖醇-牛奶混合液。

赤藓糖醇为四碳多元醇类化合物，化学名称为l，2, 3, 4-丁四醇，分子式为

C4H10O4【52】。属于碳水化合物，不含有无机盐成分。口内食用时，赤藓糖醇凉爽的口感特性可以刺激唾液的分泌，间接起到防龋作用【53】。但对于体外模型，赤

藓糖醇是否能促进牙齿的再矿化目前还没有实验证明。

牛奶及其所含成分对牙釉质的再矿化作用已在实验中得到证实【54-56】。

McDougall等【57】研究证明在离体牙模型中，牛奶作为高浓度的钙、磷的载体能够有效的促进牙釉质的再矿化。此外，牛奶可以在釉质表面形成一层获得性蛋白膜。这层蛋白膜与唾液获得性膜具有类似的形态和功能，但其主要由酪蛋白、乳清蛋白等所组成。酪蛋白经过酶消化后所得到的CPP-ACP能够稳定游离的钙、磷离子，提高牙表面的钙磷质量浓度，在牙表面形成一个钙离子库，阻止不溶性磷酸钙的形成，从而减少釉质的脱矿并为再矿化提供钙源。乳清蛋白也可以抑制羟磷灰石的溶解，但抑制作用弱于酪蛋白【58】。此外，牛奶中一些具有生物活性的小分子质量的蛋白多肽，如脲蛋白胨也能够对羟磷灰石的脱矿起到明显的抑制作用【59】。

由此推出，赤藓糖醇-牛奶混合液的再矿化作用可能主要是因为牛奶所具有的再矿化效能。但6%赤藓糖醇-牛奶组的%SHL显著低于2%及4%赤藓糖醇-牛奶组，推测与6%赤藓糖醇-牛奶组S. mutans生物膜结构松散，活菌总量少有关。

通过对赤藓糖醇-牛奶混合液对人工釉质龋脱矿影响的研究发现，各浓度的赤藓糖醇-牛奶混合液均能减轻表层釉质的脱矿程度，促进再矿化的发生，且6%赤藓糖醇-牛奶混合液再矿化作用最强。赤藓糖醇-牛奶混合液作为一种安全、营养的食品，极有可能成为替代加氟牛奶的另外一条防龋途径。

总结与展望

龋病是牙齿在菌斑生物膜代谢产酸的过程中，牙釉质持续脱矿引起的牙体组织损伤。其始发因素是菌斑生物膜，具体过程表现为釉质的脱矿。赤藓糖醇和牛奶均为安全无毒的食品，本研究将其组合，通过体外的人工龋实验证实赤藓糖醇-牛奶混合物还具有抑制S. mutans在生物膜中粘附生长，促进脱矿牙釉质再矿化的作用，因而在一定程度上阻断了龋病的发展。

目前龋病预防的方法多是常规检查、氟化物的推广、化学及中草药制剂的应用等。与这些措施相比，赤藓糖醇-牛奶混合液可以作为儿童的日常饮用品，具有更高的生物安全性，同时其将食物转化为众多防龋环节中最易完成接受的一环，无疑具有光明的前景。

本研究初步证实了赤藓糖醇-牛奶混合液的防龋能力，为赤藓糖醇-牛奶防龋的可行性提供了实验依据。但是鉴于混合液成分的复杂性，对于赤藓糖醇-牛奶混合液中是否还存在其他防龋或致龋物质，赤藓糖醇与牛奶混合后是否会引发食品构成改变等一系列问题，还需要进一步的实验研究证明。

参考文献

[1]陆洋.龋病的预防动态[J].右江民族医学院学报,2006,28(1):129-130.

[2]石四箴.儿童口腔医学[M].北京：人民卫生出版社,2008: 80。

[3]樊明文，周学东.牙体牙髓病学[M].北京：人民卫生出版社,2008: 27。

[4] Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay[J]. Microbiol Rev,1986,50(4):353-380.

[5]郑晓丹.不同性别刷牙效果的临床对比研究[J].临床口腔医学杂志，2000, 18(1)：71-72.

[6]卞金有，胡德渝.预防口腔医学[M].北京：人民卫生出版社，2005: 103．

[7] Castillo JL, Milgrom P, Coldwell SE, et al. Children's acceptance of milk with xylitol or sorbitol for dental caries prevention[J]. BMC Oral Health, 2005,5:6.

[8]盛江筠.口腔变形链球菌耐氟菌株的产生[J].国外医学口腔医学分册，2000, 27(1)：20-23.

[9]杨海军.赤藓糖醇在食品工业不同领域应用情况概论[J].发酵科技通讯，2007，(4)：30-35.

[10]黄海英，黄绍华，沈玲霞.“零”值配料-赤藓糖醇的研究现状及展望[J].江西食品工业，2005，(2)：14-16.

[11]张新明，李宏，朱永辉.几种多元糖醇的比较[J]. ft东食品发酵，2007，(4)：36-39.

[12] Kawanabe J, Hirasawa M, Takeuchi T, et al. Noncariogenicity of erythritol as a substrate[J]. Caries Res,1992,26(5):358-362．

[13] Maikinen KK, Isotupa KP, Kivilompolo T, et al. Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutans streptococci[J]. Caries Res,2001,35(2):129-135．

[14]姚军，张佳丽，吴玉琼，等.赤藓糖醇和木糖醇对变异链球菌生长和产酸作用的对比研究[J].华西口腔医学杂志，2009,27(6)：603-604.

[15]张佳丽，姚军.赤藓糖醇对变异链球菌产酸作用影响的研究[J].广东牙病防治，2011,19(11)：582-585.

[16]杨秀娟，姚军.赤藓糖醇和木糖醇对变异链球菌黏附的影响[J].国际口腔医学杂志，2012,39(2)：155-157.

[17]陈文霞.牛奶及其成分与龋病的关系[J].国外医学口腔医学分册，1999, 26(1)：17-19.

[18] Wolfgang HA, Stefan F, Joerg H, et al. The in vitro effect of fluoridated milk in a bacterial biofilm-enamel model[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub,2006,150(1):63–69.

[19]王文辉，卞金有，王勤，等.氟化牛奶的再矿化及抗龋作用的体内观察

[J].现代口腔医学杂志,2001,15(2):114-116.

[20] Jorge LC, Peter M, Susan EC, et al. Children's acceptance of milk with xylitol or sorbitol for dental caries prevention[J]. BMC Oral Health, 2005,5:6.

[21]黄冠玮，邹玲，李伟.人工龋模型的建立方法[J].国际口腔医学杂志，2010,37(5)：537-540.

[22]叶玲，苏勤，周学东.体外人工龋模型的建立方法及检测新技术[J].广东牙病防治，2002,10(4)：310-311.

[23]周智，陈惠珍，胡德渝.壳寡聚糖对菌斑生物膜形成的影响[J].现代预防医学，2007,34(5)：978-980.

[24] ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions[J]. Caries Res,1982,16(3):201-210．

[25]周学东，岳松龄.五种细菌致人工龋的研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志，1993, 3(3)：131-132.

[26]黄正蔚，周学东，李继遥，等.口腔生物膜体外模型的建立和应用评估[J].牙体牙髓牙周病学杂志，2004,19(4)：481-484.

[27] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development[J]. Annu Rev Microbiol,2000,54:49-79.

[28]简垣材，张德庆，邱明.不同pH对变异链球菌体外生物膜形成的影响[J]. 临床口腔医学杂志，2010,26(50)：278-281.

[29]赵今，朱昞，李继遥.不同培养条件对口腔细菌生物膜生长的影响[J].临床

口腔医学杂志,2006,22(60):323-325.

[30]李东育，石四箴.牙釉质显微硬度测定及应用[J].上海铁道大学学报，2000, 21(3)：96-99.

[31] Koulourides T, Reed JL Jr. Effects of calcium, phosphate and fluoride ions on the rate of softening and dissolution of tooth enamel[J]. Arch Oral Bi0l,1964,9(5):585-594．

[32] Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, et a1. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs[J]. J Oral Sci,2003,45(1):17-23．

[33] Zero DT, FU J, Anne KM, et al. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries[J]. J Dent Res,1992,71:871-878.

[34] Twetman S. Antimicrobials in future caries controlAreviewwithspecialreferencetochlorhexidinetreatment[J]. CariesResearch,2004, 38(3):223-229．

[35] Robinson C, Stratford S, Rees G, et a1. Plaque biofilms: The effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture[J]. Archives of Oral Biology,2006,11(51):1006-1014．

[36]肖素荣，李京东.赤藓糖醇的特性及应用[J].中国食物与营养，2008, 5: 26-28.

[37] Soderling EM, Hietala-Lenkkeri AM. Xylitol and Erythritol Decrease Adherence of Polysaccharide-Producing Oral Streptococci[J]. Curr Microbiol,2010,60(1):25-29.

[38]周红生，许小芳，王欢，等.超声波灭菌技术的研究进展[J].声学技术，2010,29(5)：498-502.

[39]赵永勋，耿小丕，王剑.超声技术在牛奶保鲜中的应用[J].承德石油高等专科学校学报，2007, 9(2)：8-10.

[40]王蕊.牛奶保鲜技术的研究进展[J].粮食与食品工业，2003, 4: 48-52.

[41]余东霞，张迎庆，钟晓玲.紫外线对牛乳杀菌效果的研究[J].食品工业科技，1999, 20(3)：24-26.

[42] Wilkins JC, Homer KA, Beighton D. Analysis of Streptococcus mutans proteins mediated by culture under acidic conditions[J]. Appl Environ Microbiol,2002,68(5):2382-2390．

[43]徐蓉蓉.生物膜中细菌的代谢特点及影响因素[J].国外医学口腔医学分册，2004, 31(1)：42-43.

[44]黄筱声，吴楚平.天天喝奶人人健康-兼谈羊奶的保健功能[C].儿童食品专业学会第十届学术年会论文集，2007: 190-194.

[45]赵今，朱昞，李继遥，等.不同培养条件对口腔细菌生物膜生长的影响[J].临床口腔医学杂志，2006,22(6)：323-325.

[46]姬亚昆，凌均綮.激光共聚焦扫描显微镜及其在牙菌斑生物膜研究中的应用

[J].国际口腔医学杂志,2006,3(4):281-283.

[47] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. Clin Microbiol Rev,2002,15(2):167-193．

[48]楚金普.中药防龋药效学实验方法的建立-牙齿矿化作用实验[D].四川：四川大学华西口腔医学院,2006: 7-9.

[49]李新尚，冯锦虹，林静.维药没食子对牙釉质脱矿与再矿化作用的扫描电镜观察[J].中华老年口腔医学杂志，2011,9(5)：261-264.

[50]行勇军，刘鲁川，韩旭.菌斑液对釉质脱矿和表面超微结构影响的体外研究

[J].第三军医大学学报,2006,28(13):1409-1411.

[51]王文辉，卞金有，王勤，等.氟化牛奶再矿化、抗酸脱矿及抗龋作用的体外观察[J].现代口腔医学杂志，2000,14(6)：377-378.

[52]杨海军.赤藓糖醇的发展及应用[J].中国食品添加剂，2004，(1)：100-102.

[53]张佳丽.赤藓糖醇在龋病预防中的应用[J].医学综述,2010,16(4):570-571.

[54] Kashket S, DePaola DP. Cheese comsumption and development and progression of dental caries[J]. Nutr Rev,2002,60(4):97-103.

[55] Rugg-Gunn AJ, Roberts GJ, Wright WG. Effect of human milk on plaque pH in situ and enamel dissolution in vitro compared with bovine milk, lactose, and sucrose[J]. Caries Res,1985,19(4):327-334.

[56] Harper DS, Osborn JC, Clayton R, et al. Modification of food

Cariogenicity in rats by mineral-rich concentrates from milk[J]. J Dent Res,1987,66(1):42-45.

[57] McDougall WA. Effect of milk on enamel demineralization and remineralization in vitro[J]. Caries Res,1977,11(3):166-172.

[58]孙建勋，周学东.牛奶蛋白膜对牙矿化影响的研究进展[J].国际口腔医学杂志，2008,35(2)：192-194.

[59] Grenby TH, Andrews AT, Mistrya M, et al. Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations in vitro[J]. J Dent,2001,29(2):83-92.

**牛奶与龋病的关系**

张帆综述姚军校审

**【摘要】**牛奶营养丰富，其和龋病的关系也受到人们的关注。牛奶中的蛋白质、脂肪和无机盐离子具有一定的抗龋效果。但如果长期频繁的饮用牛奶，牛奶却成为菌斑的成熟的营养底物，加速菌斑的成熟，导致菌斑内pH降低和釉质更大程度的脱矿。

**【关键词】牛奶；奶瓶龋；防龋**

**1.牛奶的主要成分**

牛奶中主要含有脂肪、蛋白质、乳糖、无机盐类及维生素等各种成分。正常牛奶的成分大致是稳定的，成分含量在一定范围内变动，其中脂肪变动量大，蛋白质次之，乳糖的含量则很少有变化。

牛奶中含量水分86—89%,蛋白质2.7-3.7%,乳糖4.5—5.0%,脂肪3—5%,无机盐类0.60一O.75%[1]。

而牛奶因其营养丰富有“白色血液”之称，近些年来受到广大消费者的青睐，成为日常饮用的营养品。与此同时，牛奶与龋病的关系也越来越受到人们的关注。

**2.牛奶及其成分的防龋作用**

**2-1．酪蛋白的防龋作用**

牛奶中大约85%的蛋白质是与钙结合的酪蛋白（磷蛋白），以胶态分子形式存在[2]。Reynolds等[3]用普通巧克力和富含酪蛋白的巧克力喂养动物，发现后者使动物的光滑面和窝沟龋减少，两组动物的最终体重、唾液流量、唾液蛋白质含量、钙、磷浓度、口腔细菌总量和变异链球菌的数量无明显不同。Guggenheim等[4]

研究发现局部运用可溶性酪蛋白多肽可以减少动物窝沟龋的发生和茸毛链球菌在菌群中所占的比例。这些研究均证实了酪蛋白具有局部抗龋效果。

目前认为酪蛋白质的抗龋机制可能是：①酪蛋白可牢固地附于牙面上，和釉质紧密结合而降低其溶解性；②结合至牙菌斑的蛋白质及氨基酸的分解代谢产物可对菌斑pH值下降起缓冲作用；③酪蛋白本身带有磷钙，可增加牙菌斑中磷、钙离子的含量，防止釉质脱矿和促进釉质的再矿化[5]。

**2-2.脂肪的辅助防龋作用**

Vacca-Smith等[6]观察到牛奶中有7种蛋白质结合到羟基磷灰石(HA)上，而唾

液中的蛋白质、牛奶中的蛋白质与葡糖基转移酶三者之间竞争结合HA上的结合位点，影响葡糖基转移酶的吸附和活性，而蛋白质的结合量与牛奶脂肪含量呈正相关。研究证实，全脂牛奶在唾液包被的羟磷灰石上存在时阻止葡糖基转移酶合成葡聚糖的作用强干2%脂肪牛奶[2]。

爱斯基摩人的食品中脂肪含量极高，其龋病发病率却极低。动物试验表明脂肪可降低龋病的发生。其作用可能是：油性物质包裹牙面，食物不易滞留；在牙面上形成脂性保护膜，糖类不易渗入；脂肪酸可能干扰致龋菌的生长、代谢[7]。

**2-3.无机盐类的再矿化作用**

牛奶中平均含有无机盐钙0.12%和磷0.095%[2]. Rugg-Gunn等[8]比较了人乳、牛奶、7%乳糖和7%蔗糖溶液含漱对菌斑原位pH值的影响，并在含糖量相同的条件下，观察它们分别与釉质和唾液一起孵育引起釉质脱矿的程度，结果显示牛奶和人乳导致釉质脱矿的程度和含漱后菌斑pH值下降的幅度均小于乳糖和蔗糖溶液，相比之下，牛奶比人乳显示出更强的保护作用。Grenby等分析了牛奶中各种成分的抗脱矿作用，认为钙、磷的作用强于牛奶中的酪蛋白和其他主要的牛奶蛋白质。

**3. 牛奶的致龋作用3-1.婴幼儿龋**

婴幼儿龋是发生在婴幼儿时期的一类龋病，最早由儿科医师Jacobi于1862年描述与报道，他认为牙齿大面积破坏的龋病与婴幼儿喂食的牛奶和含糖饮料有关。20世纪60年代末，病例报道增多。于是将这种因入睡前用奶瓶喂养牛奶、糖水、蜂蜜之类的食物，在短时间内使多个牙齿多个牙面发生龋坏的一种特殊类型的乳牙龋病称为奶瓶龋[9、10]。

关于奶瓶龋的致病因素，研究证明与牛奶及饮用习惯有着密切的联系。张剑

[11]等通过对贵州省5岁儿童乳牙龋病流行病学调查及相关因素分析得出，幼儿频

繁饮用碳酸饮料，长期进食甜牛奶、酸奶或奶粉等奶制品以及儿童近12月内曾经发生过牙痛等与乳牙龋关系密切。饮用牛奶对牙齿的危害与碳酸饮料相比要小，但长期频繁食用牛奶，尤其是牛奶中含有大量糖份时，可以使人体牙菌斑的pH值降低和产酸量增加[12、13]。

张桂荣等[14]对奶瓶龋的危险因素进行多变量分析后得出：（1）菌斑pH值是

对奶瓶龋发生影响最强的指标；（2）喂养的奶瓶内容以含糖饮料或乳酸类饮料为主，会增加患龋机率；（3）吃甜食的次数越多越易患龋；（4）断奶的时间越晚，小儿患龋的机率越大。

**3-2.牛奶致龋研究的最新进展**

Wolfgang等[15]研究发现在离体牙模型中，牛奶自身的营养成分能加速菌斑生物膜的成熟，这将导致牙釉质更大程度的脱矿和牙体组织损害。长期频繁饮用牛奶，可以使口腔内牙菌斑的pH值降低和产酸量增加[11]，釉质长期处于脱矿状态。此时牛奶中钙磷再矿化的对抗能力变的不足，牛奶成为龋病发生的因素之一。

牛奶中含有4%的乳糖，乳糖的致龋性很低，但少量多次进食含乳糖的食物后，口腔菌群可能发生适应性变化。Birkhed等用含乳糖的培养基对变链、血链和唾链分别进行体外适应性培养3周，适应后的细菌利用乳糖的产酸量大大增加。在对人体的研究中，发现用10%乳糖含漱，每天6次，6周后与实验前相比，漱口5分钟后的菌斑pH值比实验前降低，产酸量显著增加。发生这种现象的确切机理仍不十分清楚，比较合理的解释是，与乳糖转运和分解代谢相关细菌的酶增多有关[2]。

**4.总结**

牛奶是龋病的双刃剑，牛奶和龋病的关系也不仅仅只有防龋或者致龋这么简单。牛奶中的蛋白质、脂肪和无机盐离子能通过影响葡糖基转移酶、细菌粘附、抗釉质脱矿等途径达到抗龋效果。但是如果长期频繁的饮用牛奶，牛奶却为菌斑的成熟提供营养底物，促使菌斑的成熟，导致菌斑内pH降低和釉质更大程度的脱矿。

参考文献：

[1] 陈彦霞, 吴子欧, 王艳红. 浅谈牛奶的主要成分及其影响因素[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, (6): 19.

[2] 陈文霞. 牛奶及其成分与龋病的关系[J]. 国外医学口腔医学分册, 1999, 26(1): 17-19.

[3] ReynoldsEC, BlackCL. Confectionerycompositionandrat caries[J]. Caries Res, 1987, 21(6): 538-545.

[4] Guggenheim B, Schmid R. Powdered milk micellar casein prevents oral colonization by Streptococcus sobrinus and dental caries in rats: a basis for the caries-protective effect of dairy products[J]. Caries Res, 1999, 33(6): 446-54.

[5] 刘良, 陈桂红. 儿童龋病与饮食习惯的研究概述[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(3): 109-111.

[6] Vacca-Smith AM, Newman FR, Bowen WH. The effect of milk and kappa casein on streptococcal glucosyltransferase[J]. Caries Res, 1995, 29(6): 498-506.

[7] 林亮, 何尔扬, 黄晓红. 饮食与龋病[J]. 膳食指南

[8] Rugg-Gunn AJ, Roberts GJ, Wright WG. Effect of human milk on plaque pH in situ and enamel dissolution in vitro compared with bovine milk, lactose, and sucrose[J]. Caries Res, 1985, 19(4): 327-334.

[9] 文玲英. 婴幼儿龋的早期防治[J]. 中华口腔医学杂志, 2008, 43(9): 515-518.

[10] 董俊平, 鄂艳华. 奶瓶龋的预防及治疗[J]. ft西职工医学院学报, 2000, 10(2): 20-21.

[11] 张剑, 刘建国, 张绍伟, 等. 贵州省5岁儿童乳牙龋病流行病学调查及相关因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(18): 28-30.

[12] Grando LJ, Mistry M. Erosive by soft drink and lemon juice making of stereoscople microscope with the scanning electran microscope analysis [J]. Caries Res, 1996, 30(5): 373.

[13] 吕昌惠, 王海欣. 唐ft市区学龄前儿童乳牙患龋影响因素研究[J]. 中国学校

卫生, 2006,27(7):571.

[14] 张桂荣, 马红英, 高勇, 等. 奶瓶龋危险因素的多变量分析[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(5): 609.

[15] Wolfgang HA, Stefan F, Joerg H, et al. The in vitro effect of fluoridated milk in a bacterial biofilm-enamel model[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2006, 150(1): 63–69.

致**谢**

时光荏苒，岁月如歌。转眼间，三年的研究生求学生活即将结束，站在毕业的门槛上，回首往昔，奋斗和辛劳成为丝丝的记忆，甜美与欢笑也都尘埃落定。从对这座城市的陌生到熟悉，从青涩到成熟，这三年是一种积累，它给我带来太多的感动、感悟乃至成长。值此毕业论文完成之际，我谨向所有关心、支持、帮助我的师长，亲友呈上我最诚挚的感谢与最美好的祝愿。

首先，衷心感谢我的导师姚军老师，三年来，在您悉心的培养和无微不至的关怀下，我的科研能力和临床技能都有了很大的提高，顺利完成了毕业课题的设计、实施和论文的撰写。您严谨的治学精神，深厚广博的学术造诣，孜孜不倦的开拓进取精神，宽广的胸怀和坦荡的人格都深深感染着我，使我受益终生，激励我在今后的人生道路上谦虚、谨慎、努力、奋斗。

感谢福州大学林建航老师、何炳蔚老师、张凤玲老师，感谢你们在扫描电子显微镜检测、显微硬度测量、激光共聚焦扫描显微镜荧光测量方面提供的技术和信息支持，你们高屋建瓴的专业见地使我受益匪浅。

感谢福建医科大学附属口腔医院儿童牙科全体医师和护士，感谢你们在工作、生活中对我的关心和支持，实验的样本是在科室收集的，感谢你们为此提供的诸多便利。

感谢张佳丽师姐、杨秀娟师姐、王静师姐、汪志君同门、童丹师妹，你们帮我走过实验过程中最困难的阶段。

感谢中心实验室赵欣老师在实验中给予我的大力支持。

感谢与我共同走过三年时光的研究生同学，三年的时间让我们之间建立了深厚的友谊。临别之际，祝愿你们在以后的日子里工作顺利，生活美满幸福！最后，我要特别感谢我挚爱的父母，感谢你们给予我无私的爱和支持，让

我在面临各种挑战和困难时决不气馁。祝愿你们幸福健康！

感谢所有关心、支持和帮助过我而又不能一一列举的人们，在此道一声：谢谢！