

## 人参皂苷 Rh2 型联合氟化钠对变异链球菌生长及生物膜形成的抑制作用

方 圆<sup>1,2</sup>, 刘晓璇<sup>1,2</sup>, 王 瑞<sup>1,2</sup>

(1. 吉林大学口腔医院口腔预防科, 吉林 长春 130021; 2. 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:** 探讨人参皂苷 Rh2 型 (G-Rh2) 联合氟化钠 (NaF) 对体外变异链球菌生长及生物膜形成的抑制作用, 为其将来在口腔临床上的应用提供理论依据。**方法:** 采用微量稀释法分别测量 G-Rh2 与 NaF 对变异链球菌的半数最小抑制浓度 ( $MIC_{50}$ ); 采用棋盘微量稀释法测量 G-Rh2 与 NaF 联合应用于变异链球菌的  $MIC_{50}$  值, 并计算分级抑菌浓度 (FIC) 指数来判断两者的联合效应, 当  $FIC < 0.5$  时证明 2 种药物间具有协同抑制变异链球菌的作用; 采用结晶紫染色实验分别测量 G-Rh2 与 NaF 对变异链球菌的半数最小生物膜抑制浓度 ( $MBIC_{50}$ ) 值; 实验分为空白对照组、 $MIC_{50}$ G-Rh2 组、 $MIC_{50}$ NaF 组和  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF 联合组, 采用生长曲线及产酸实验评估各组变异链球菌浮游菌生长速度及产酸抑制率; 实验分为空白对照组、 $MBIC_{50}$ G-Rh2 组、 $MBIC_{50}$ NaF 组及  $MBIC_{50}$ G-Rh2+ $MBIC_{50}$ NaF 联合组, 采用结晶紫染色实验及扫描电镜观察各组变异链球菌生物膜形成量及结构的变化; 空白对照组内不含任何药物。**结果:** G-Rh2 与 NaF 作用于变异链球菌的  $MIC_{50}$  分别为 25.000 和 125.000  $mg \cdot L^{-1}$ ; G-Rh2 与 NaF 联合应用时  $MIC_{50}$  分别为 5.00 和 31.25  $mg \cdot L^{-1}$ , FIC 指数为 0.45, 小于 0.50, 证明 2 种药物间具有协同抑制变异链球菌的作用; G-Rh2 与 NaF 作用于变异链球菌的  $MBIC_{50}$  分别为 22.5 和 62.5  $mg \cdot L^{-1}$ 。与空白对照组、 $MIC_{50}$ G-Rh2 组和  $MIC_{50}$ NaF 组比较,  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF 联合组变异链球菌的生长速度明显降低 ( $P < 0.05$ )。与空白对照组比较,  $MIC_{50}$ G-Rh2 组、 $MIC_{50}$ NaF 组和  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF 联合组  $\Delta pH$  值均降低, 且  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF 联合组  $\Delta pH$  值低于  $MIC_{50}$ G-Rh2 组和  $MIC_{50}$ NaF 组 ( $P < 0.05$ );  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF 联合组的产酸抑制率高于  $MIC_{50}$ G-Rh2 组和  $MIC_{50}$ NaF 组 ( $P < 0.05$ )。  $MBIC_{50}$ G-Rh2+ $MBIC_{50}$ NaF 联合组的生物膜形成量明显少于空白对照组、 $MBIC_{50}$ G-Rh2 组和  $MBIC_{50}$ NaF 组 ( $P < 0.01$ )。扫描电镜观察,  $MBIC_{50}$ G-Rh2 组和  $MBIC_{50}$ NaF 组生物膜厚度降低, 胞外基质量减少, 细菌之间排列疏松, 而  $MBIC_{50}$ G-Rh2+ $MBIC_{50}$ NaF 联合组生物膜结构消失, 细菌数量减少且细菌形态发生变化。**结论:** G-Rh2 与 NaF 联合应用对体外变异链球菌生长及生物膜形成具有协同抑制作用。

**[关键词]** 变异链球菌; 人参皂苷 Rh2 型; 氟化钠; 联合药敏实验

**[中图分类号]** R781.1 **[文献标志码]** A

## Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 combined with sodium fluoride on growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*

FANG Yuan<sup>1,2</sup>, LIU Xiaoxuan<sup>1,2</sup>, WANG Rui<sup>1,2</sup>

(1. Department of Stomatology Prevention, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021,

[收稿日期] 2021-07-24

[基金项目] 吉林省卫计委卫生计生科技项目 (2017W001); 吉林省卫计委卫生适宜技术扶贫项目 (2017FP024); 吉林省卫健委卫生健康研究项目 (2020JK001)

[作者简介] 方 圆 (1995—), 女, 山东省菏泽市人, 在读硕士研究生, 主要从事龋病及口腔预防医学方面的研究。

[通信作者] 王 瑞, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: w\_rui@jlu.edu.cn)

China; 2. Key Laboratory of Tooth Development and Jaw Bone Remodeling and Regeneration, Jilin Province, Changchun 130021, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the inhibitory effects of ginsenoside Rh2 (G-Rh2) combined with sodium fluoride (NaF) on the growth of *Streptococcus mutans* and biofilm formation *in vitro*, and to provide theoretical basis for their application in stomatological clinic. **Methods:** The half minimum inhibitory concentrations ( $MIC_{50}$ ) of G-Rh2 and NaF against *Streptococcus mutans* were measured by microdilution method; the  $MIC_{50}$  value of G-Rh2 combined with NaF on *Streptococcus mutans* was measured by chessboard microdilution method, and the fractional inhibitory concentration (FIC) value was calculated to judge the combined effect of these two drugs. When  $FIC < 0.5$ , it was proved that the two drugs had synergistic inhibitory effect on *Streptococcus mutans*. The half minimum biofilm inhibition concentrations ( $MBIC_{50}$ ) of G-Rh2 and NaF against *Streptococcus mutans* were measured by crystal violet staining test. The experiment was divided into blank control group,  $MIC_{50}$ G-Rh2 group,  $MIC_{50}$ NaF group and  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF combined group, the growth curve and acid production test were used to evaluate the growth speeds and inhibitory rates of acid production of *Streptococcus mutans* in each group; the experiment was divided into blank control group,  $MBIC_{50}$ G-Rh2 group,  $MBIC_{50}$ NaF group and  $MBIC_{50}$ G-Rh2+ $MBIC_{50}$ NaF combined group, the changes of biofilm formation of *Streptococcus mutans* and structures were observed by crystal violet staining test and scanning electron microscope in each group. The blank control group did not contain any drugs. **Results:** The  $MIC_{50}$  of G-Rh2 and NaF acting on *Streptococcus mutans* alone were 25.000 and 125.000  $mg \cdot L^{-1}$ , respectively; the  $MIC_{50}$  of G-Rh2 combined with NaF on *Streptococcus mutans* were 5.00 and 31.25  $mg \cdot L^{-1}$ , the FIC index was 0.45 and less than 0.5, which proved that the two drugs had synergistic inhibitory effect on *Streptococcus mutans*. The  $MBIC_{50}$  of G-Rh2 and NaF were 22.5 and 62.5  $mg \cdot L^{-1}$ . The growth speed of *Streptococcus mutans* in  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF combined group was significantly lower than those in blank control group,  $MIC_{50}$ G-Rh2 group and  $MIC_{50}$ NaF group ( $P < 0.05$ ). The  $\Delta pH$  values in  $MIC_{50}$ G-Rh2 group,  $MIC_{50}$ NaF group and  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF combined group were lower than that in blank control group, and the  $\Delta pH$  value in  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF combined group was lower than those in  $MIC_{50}$ G-Rh2 group and  $MIC_{50}$ NaF group ( $P < 0.05$ ). The inhibition rate of acid production in  $MIC_{50}$ G-Rh2+ $MIC_{50}$ NaF combined group was higher than those in  $MIC_{50}$ G-Rh2 group and  $MIC_{50}$ NaF group ( $P < 0.05$ ), and the amount of biofilm formation in  $MBIC_{50}$ G-Rh2+ $MBIC_{50}$ NaF combined group was significantly lower than those in blank control group,  $MBIC_{50}$ G-Rh2 group and  $MBIC_{50}$ NaF group ( $P < 0.01$ ). The scanning electron microscope results showed that the thickness of biofilm, and the mass of extracellular base in  $MBIC_{50}$ G-Rh2 group and  $MBIC_{50}$ NaF group were decreased, the arrangement of bacteria was loose; while in  $MBIC_{50}$ G-Rh2+ $MBIC_{50}$ NaF combined group, the biofilm structure was disappeared, the number of bacteria was decreased, and the morphology of bacteria was changed. **Conclusion:** The combination of G-Rh2 and NaF has the synergistic inhibitory effect on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans in vitro*.

**KEYWORDS** *Streptococcus mutans*; Ginsenoside Rh2; Sodium fluoride; Combined drug susceptibility experiments

龋病是一种发生于牙体硬组织的慢性感染性疾病, 被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为三大慢性非传染性疾病之一, 其主要致病菌为变异链球菌<sup>[1]</sup>。变异链球菌为革兰阳性菌, 具有较强的产酸和耐酸能力, 其胞壁表面物质

有助于细菌的黏附、定植和聚集, 从而有助于形成生物膜, 研究<sup>[2-3]</sup>表明: 生物膜中的变异链球菌比浮游状态时更能抵抗抗菌药物及宿主的免疫功能, 因此抑制变异链球菌的生长及生物膜形成是防龋工作的关键。目前氟化钠(sodium fluoride, NaF)

是临床上使用范围最广和最有效的防龋物质, 其能降低釉质溶解度、促进釉质再矿化及改变牙萌出后的形态和结构, 还能对致龋菌的代谢产生影响, 如抑制基质金属蛋白酶活性等<sup>[4-5]</sup>, 但 NaF 使用不当易出现氟牙症和耐氟菌株等一系列不良反应<sup>[6]</sup>。而中药不仅能调节机体免疫功能, 抑制细菌生长, 还能延缓细菌的耐药性, 因此中药抑菌现已成为研究热点之一<sup>[7]</sup>。人参皂苷作为我国传统中药材人参中的主要活性成分, 近年来已有研究<sup>[8-9]</sup>证明其对多种细菌均有抑制作用。但人参皂苷联合 NaF 是否能够增强抑菌效果国内外尚未见报道, 因此本研究选择将人参皂苷 Rh2 型 (ginsenoside Rh2, G-Rh2) 与 NaF 联合应用于变异链球菌, 探讨 2 种药物是否具有协同抑菌作用, 是否在减少 NaF 使用剂量的同时增强对变异链球菌的抑制作用, 为开发更有效的防龋产品提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细菌、主要试剂和仪器** 变异链球菌 UA159 由吉林大学口腔医院牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室提供。G-Rh2 (上海源叶生物科技有限公司), NaF (上海易恩化学技术有限公司), 脑心浸出液肉汤 (brain heart infusion, BHI) (赛默飞世尔科技公司), 蔗糖 (北京索莱宝科技有限公司), 结晶紫染料 (北京酷来博科技有限公司), 戊二醛 (北京雷根生物技术有限公司)。二氧化碳细胞恒温培养箱 (日本 SANYO 公司), 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), 分光光度计 (上海尤尼科有限公司), pH 值检测仪 (上海雷磁新泾仪器有限公司), 抽气式厌氧罐 (上海坤科仪器设备有限公司)。

**1.2 实验菌株和菌液制备** 将  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存的变异链球菌复苏后接种于 BHI 琼脂板中, 于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  厌氧条件下培养 24 h, 扫描电镜鉴定为纯培养后挑取单菌落接种于含 1% 蔗糖的 BHI 液体培养基中, 继续培养至对数生长期以备后续实验使用。

**1.3 半数最小抑菌浓度 (half minimum inhibition concentration,  $\text{MIC}_{50}$ ) 的测定** 通过微量稀释法分别测量 G-Rh2 与 NaF 对变异链球菌的  $\text{MIC}_{50}$  值。分别将等量的菌液和不同浓度的药物加入 96 孔细胞培养板中, 菌液最终浓度为  $1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , G-Rh2 的浓度为 12.5、15.0、20.0、25.0、30.0 和  $40.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NaF 的浓度为 15.625、31.250、62.500、125.000、250.000 和  $500.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下厌氧培养 24 h, 采用酶标

仪在波长为 600 nm 处测量吸光度 (A) 值, 对照组 A (600) 值的 1/2 所对应的浓度即为  $\text{MIC}_{50}$ 。 $\text{MIC}_{50}$  定义为与空白对照组相比至少抑制 50% 细菌生长的最低药物浓度。

**1.4 棋盘微量稀释法** 通过棋盘微量稀释法进行联合药敏试验, 检测 G-Rh2 和 NaF 间是否具有协同抑制变异链球菌的作用。将 100  $\mu\text{L}$  菌液依次加入 96 孔细胞培养板中, 再于 96 孔细胞培养板的 2~6 行和 2~6 列中分别加入 50  $\mu\text{L}$  不同浓度的 G-Rh2 和 NaF, G-Rh2 的最终浓度为 3.125、3.750、5.000、6.250 和  $7.510 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NaF 的最终浓度为 3.906 25、7.812 50、15.625 00、31.250 00、62.500 00 和  $125.000 00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 菌液最终浓度为  $1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 空白对照组内不含任何药物。各组混匀后厌氧培养 24 h, 采用酶标仪检测 A (600) 值以观察实验结果。根据单独用药及联合用药时的结果计算分级抑菌浓度 (fractional inhibitory concentration, FIC) 指数, 定量检测 2 种药物之间是否具有协同作用。FIC 的计算公式:  $\text{FIC} = \text{联合用药时 A 药的 } \text{MIC}_{50} \text{ 值} / \text{单独应用 A 药时的 } \text{MIC}_{50} \text{ 值} + \text{联合应用 B 药时的 } \text{MIC}_{50} \text{ 值} / \text{单独应用 B 药时的 } \text{MIC}_{50} \text{ 值}$ 。当  $\text{FIC} < 0.5$  时, 表示 2 种药物间有协同作用; 当 FIC 为 0.5~1.0 和 1.0~2.0 时分别表示相加作用和无关作用; 当  $\text{FIC} > 2.0$  表示 2 种药物间有拮抗作用。

**1.5 生物膜形成量的测定** 采用结晶紫染色法定量检测 G-Rh2 与 NaF 单独和联合应用时变异链球菌生物膜的形成量, 并检测药物半数最小生物膜抑制浓度 (half minimum biofilm inhibition concentration,  $\text{MBIC}_{50}$ )。将等量的菌液和不同浓度的药物分别加入 96 孔细胞培养板中, G-Rh2 最终浓度: 15.0、20.0、22.5、25.0、30.0 和  $40.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; NaF 最终浓度: 15.625、31.250、62.500、125.000、250.000 和  $500.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 检测 G-Rh2 和 NaF 单独与联合应用对变异链球菌生物膜形成量的影响时分组为  $\text{MBIC}_{50}\text{G-Rh2}$  组、 $\text{MBIC}_{50}\text{NaF}$  组和  $\text{MBIC}_{50}\text{G-Rh2} + \text{MBIC}_{50}\text{NaF}$  联合组; 空白对照组内不含任何药物。各组厌氧培养 24 h 后吸出每孔中的液体, 戊二醛固定, 结晶紫染色, 最后溶于 95% 酒精中, 用酶标仪测定 600 nm 波长处的 A 值, 定量检测  $\text{MBIC}_{50}$ , 对照组 A (600) 值的 1/2 所对应的浓度即为  $\text{MBIC}_{50}$ 。 $\text{MBIC}_{50}$  定义为与空白对照组相比至少抑制 50% 细菌生物膜形成



时的最低药物浓度。

**1.6 变异链球菌生长曲线的绘制** 分别将等量的菌液和不同分组的药物加入离心管中, 药物分组为 MIC<sub>50</sub>G-Rh2 组、MIC<sub>50</sub>NaF 组和 MIC<sub>50</sub>G-Rh2+MIC<sub>50</sub>NaF 联合组, 空白对照组内不含任何药物。各组混匀后置于厌氧环境中培养, 每隔 4 h 采用酶标仪测量 A (600) 值, 并绘制生长曲线, 观察 G-Rh2 和 NaF 单独与联合应用时对变异链球菌生长变化的影响。

**1.7 产酸实验检测 G-Rh2 和 NaF 单独与联合应用时对变异链球菌的产酸抑制率** 分别将等量的菌液和不同分组的药物加入离心管中, 药物分组为 MIC<sub>50</sub>G-Rh2 组、MIC<sub>50</sub>NaF 组和 MIC<sub>50</sub>G-Rh2+MIC<sub>50</sub>NaF 联合组, 空白对照组内不含任何药物。调整各管内初始 pH 值, 即 pH<sub>0</sub> 均为 7.4, 厌氧培养 24 h 后取上清液, 依次测量 pH 值, 记为 pH<sub>1</sub>。计算 pH 值的变化即 ΔpH, ΔpH=pH<sub>0</sub>-pH<sub>1</sub>, 并计算产酸抑制率, 空白对照组产酸抑制率为 0。产酸抑制率=(对照组 ΔpH-实验组 ΔpH)/对照组 ΔpH×100%。ΔpH 值越小, 产酸抑制率越高, 表明抑制细菌产酸的作用越强。

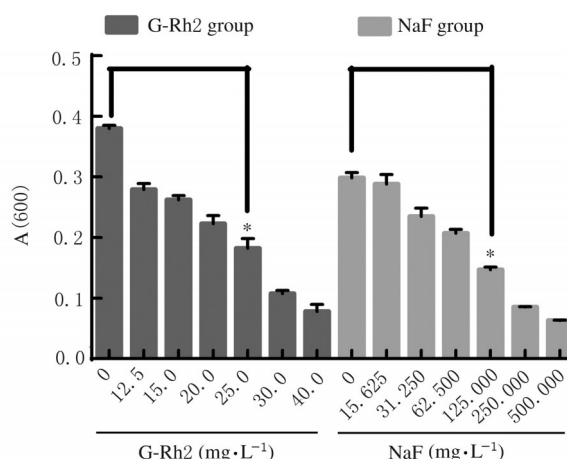
**1.8 扫描电镜观察各组变异链球菌形态、数量和生物膜结构** 将细胞爬片置于 24 孔细胞培养板中, 每孔分别加入等量的菌液和不同分组的药物, 药物分组为 MBIC<sub>50</sub>G-Rh2 组、MBIC<sub>50</sub>NaF 组和 MBIC<sub>50</sub>G-Rh2+MBIC<sub>50</sub>NaF 联合组, 于厌氧环境下培养 24 h 后吸出每孔中的液体, 戊二醛固定、酒精梯度脱水、干燥、样本镀金, 扫描电镜下观察变异链球菌形态、数量和生物膜结构。

**1.9 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。各组生物膜形成量和 ΔpH 值符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验, 计数资料以率 (%) 表示。所有实验均重复 3 次。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 微量稀释法检测不同浓度 G-Rh2 和 NaF 对变异链球菌的 MIC<sub>50</sub> 值** 随着浓度的升高, G-Rh2 和 NaF 对变异链球菌的抑制作用逐渐增强, 当 G-Rh2 浓度为 25.0 mg·L<sup>-1</sup>, NaF 浓度为 125.000 mg·L<sup>-1</sup> 时可以抑制空白对照组 50% 细菌的增长 ( $P < 0.05$ ), 因此 G-Rh2 的 MIC<sub>50</sub> 值为 25.0 mg·L<sup>-1</sup>, NaF 的 MIC<sub>50</sub> 值为 125.000 mg·L<sup>-1</sup>。见图 1。

**2.2 G-Rh2 和 NaF 联合应用对变异链球菌的抑制作用** 当 G-Rh2 与 NaF 单独应用时, G-Rh2 的 MIC<sub>50</sub> 值为 25.0 mg·L<sup>-1</sup>, NaF 的 MIC<sub>50</sub> 值为 125.000 mg·L<sup>-1</sup>, 而当 G-Rh2 与 NaF 联合应用时, G-Rh2 的 MIC<sub>50</sub> 值仅为 5.00 mg·L<sup>-1</sup>, NaF 的 MIC<sub>50</sub> 值仅为 31.25 mg·L<sup>-1</sup>, FIC=0.45, 小于 0.50, 表明 G-Rh2 与 NaF 具有协同抑制变异链球菌的作用。



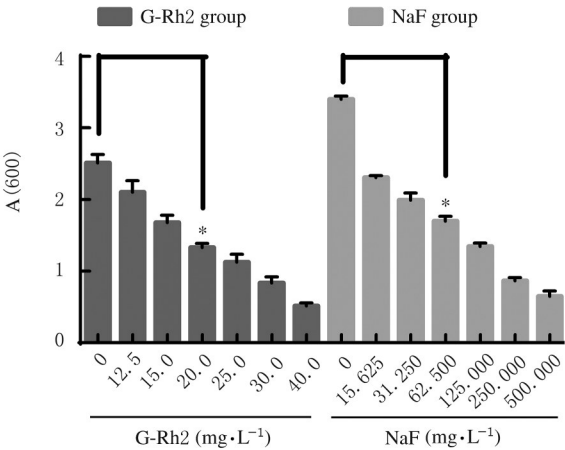
\* $P < 0.05$  compared with blank control group.

图1 不同浓度 G-Rh2 和 NaF 对变异链球菌生长的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effects of different concentrations of G-Rh2 and NaF on growth of *Streptococcus mutans*

**2.3 结晶紫染色法检测 G-Rh2 和 NaF 对变异链球菌的 MBIC<sub>50</sub> 值** 当 G-Rh2 浓度为 15.0 mg·L<sup>-1</sup> 时可以抑制变异链球菌生物膜的形成, 随着浓度的升高, 抑制作用越强, 生物膜的形成量越少, 且 G-Rh2 的 MBIC<sub>50</sub> 值为 22.5 mg·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ); NaF 可以减少变异链球菌生物膜的形成量, 且浓度越大生物膜的形成量越少, 当 NaF 浓度为 62.5 mg·L<sup>-1</sup> 时, 变异链球菌生物膜形成量仅为空白对照组的 1/2, 因此 NaF 的 MBIC<sub>50</sub> 值为 62.500 mg·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ )。见图 2。

**2.4 结晶紫染色法检测 G-Rh2 和 NaF 联合应用对变异链球菌生物膜的抑制作用** 本实验结果显示: 与单组药物组和空白对照组比较, 联合应用组 A (600) 值降低, 见表 1。结晶紫染色检测结果显示空白对照组生物膜较厚, 着色较深; 与空白对照组比较, MBIC<sub>50</sub>G-Rh2 组和 MBIC<sub>50</sub>NaF 组变异链球菌生物膜形成受到抑制, 生物膜着色相对较浅, 而 MBIC<sub>50</sub>G-Rh2+MBIC<sub>50</sub>NaF 联合组生物膜几乎



\* $P<0.05$  compared with blank control group.

图2 不同浓度 G-Rh2 和 NaF 对变异链球菌生物膜的 MBIC<sub>50</sub> 值

Fig.2 MBIC<sub>50</sub> of *Streptococcus mutans* biofilm when treated with different concentrations of G-Rh2 and NaF

不能着色, 生物膜形成量明显减少并少于单独应用单组药物时。见图3。

**2.5 G-Rh2 和 NaF 单独与联合应用时变异链球菌的生长曲线** 生长曲线图可见空白对照组的变异链球菌在0~12 h内生长迅速, 之后生长逐步缓慢, 最后进入稳定期。与空白对照组比较, 单独应用 G-Rh2 或 NaF 时变异链球菌的生长速度均降低 ( $P<0.05$ ), 而联合应用 G-Rh2 与 NaF 时变异链球菌的生长速度明显降低, 且低于单独药物组 ( $P<0.05$ ), 表明2种药物联合应用时对变异链球菌的抑制作用更优。见图4。

**2.6 各组 ΔpH 值和产酸抑制率** 空白对照组、MIC<sub>50</sub>G-Rh2 组、MIC<sub>50</sub>NaF 组和 MIC<sub>50</sub>G-Rh2+MIC<sub>50</sub>NaF 联合组 ΔpH 值为  $2.627\pm0.048$ 、

表1 G-Rh2 和 NaF 单独与联合应用对变异链球菌生物膜的抑制作用

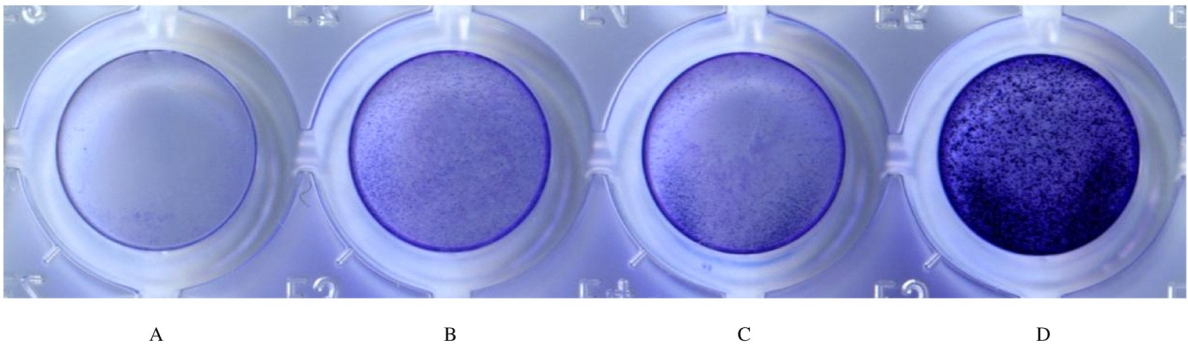
Tab. 1 Inhibitory effects of G-Rh2 and NaF alone or in combination on *Streptococcus mutans* biofilm ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Group	A(600)
Blank control	$3.298\pm0.0368$
MBIC <sub>50</sub> G-Rh2	$1.657\pm0.0321^*$
MBIC <sub>50</sub> NaF	$1.616\pm0.0326^*$
MBIC <sub>50</sub> G-Rh2+MBIC <sub>50</sub> NaF combined	$0.602\pm0.0440^{*\Delta\#}$

\* $P<0.01$  compared with blank control group;  $\Delta P<0.05$  compared with MBIC<sub>50</sub>G-Rh2 group;  $\#P<0.01$  compared with MBIC<sub>50</sub>NaF group.

$1.457\pm0.026$ 、 $1.393\pm0.035$  和  $0.433\pm0.049$ 。与空白对照组比较, MIC<sub>50</sub>G-Rh2 组、MIC<sub>50</sub>NaF 组和 MIC<sub>50</sub>G-Rh2+MIC<sub>50</sub>NaF 联合组的 ΔpH 值均降低, 且 MIC<sub>50</sub>G-Rh2+MIC<sub>50</sub>NaF 联合组 ΔpH 值低于 MIC<sub>50</sub>G-Rh2 组和 MIC<sub>50</sub>NaF 组。结合实验结果由产酸抑制率计算公式可得, 24 h 内单独应用 G-Rh2 或 NaF 的产酸抑制率分别为 44.54% 和 47.00%, 而联合应用 G-Rh2 与 NaF 时产酸抑制率高达 83.51%。

**2.7 扫描电镜下变异链球菌形态** 空白对照组变异链球菌的生物膜较厚, 细菌之间紧密连接, 形态规则, 结构完整, 并由致密的胞外基质包绕成三维立体结构; MIC<sub>50</sub>G-Rh2 组和 MIC<sub>50</sub>NaF 组可见生物膜厚度降低, 胞外基质量减少, 细菌之间排列疏松; 而 MIC<sub>50</sub>G-Rh2+MIC<sub>50</sub>NaF 联合组生物膜结构消失, 细菌数量减少且细菌形态发生变化, 可见细菌表面较粗糙, 有凹坑状结构存在。见图5。



A: MBIC<sub>50</sub>G-Rh2+MBIC<sub>50</sub>NaF combined group; B: MBIC<sub>50</sub>G-Rh2 group; C: MBIC<sub>50</sub>NaF group; D: Blank control group.

图3 结晶紫染色分析 G-Rh2 和 NaF 单独与联合应用时变异链球菌生物膜形成量

Fig. 3 Biofilm formation amounts of *Streptococcus mutans* when treated with G-Rh2 and NaF alone or in combination analyzed by crystal violet staining

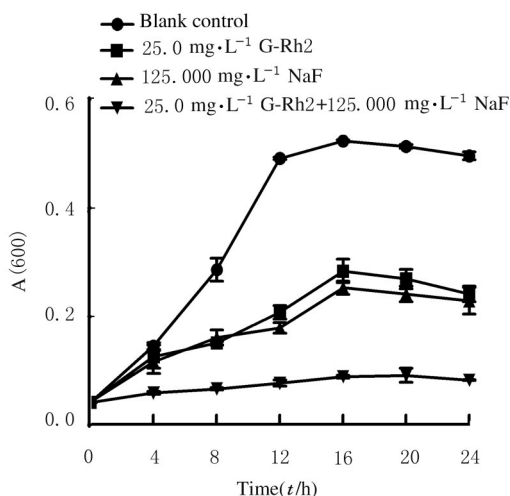


图4 G-Rh2和NaF单独与联合应用时变异链球菌生长曲线

Fig. 4 Growth curves of *Streptococcus mutans* when treated with G-Rh2 and NaF alone or in combination

### 3 讨论

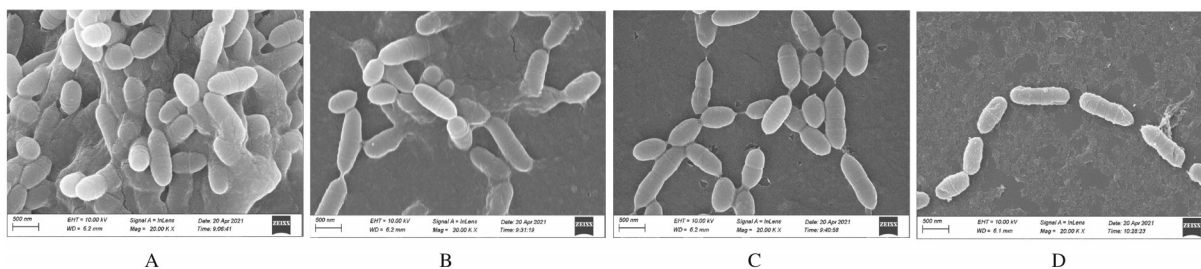
氟化物作为一种常用的防龋物质,使用不当会出现耐氟菌株、氟牙症和氟骨症等不良反应<sup>[10]</sup>,短期内氟化物抑制变异链球菌产酸的能力可随时间的推迟而减弱<sup>[11]</sup>,因此许多学者提出将氟化物与其他药物联合使用,以达到降低氟化物用量、弥补氟化物不足和增强防龋效果的目的<sup>[12]</sup>。人参皂苷具有抗氧化、调节免疫和提高机体抗感染能力等功能,其不仅可以抑制细菌生长还可以增强其他药物的抑菌性能<sup>[13-14]</sup>。因此本研究将G-Rh2与NaF联合应用,以期通过2种药物间潜在的协同作用来降低单组药物的用量。

变异链球菌是公认的主要致龋菌,其可以利用葡萄糖基转移酶代谢蔗糖产生胞外多糖,从而有利于细菌黏附和生物膜形成<sup>[15]</sup>,还可以利用碳水化合

物产生乳酸等多种有机酸,使菌斑pH值始终处于临界pH值(5.5)之下,且变异链球菌具有较强的耐酸性,在酸性环境中可通过改变自身基因表达来提高生存能力,使其在牙菌斑致龋过程中发挥重要作用<sup>[16]</sup>,因此减弱变异链球菌的黏附性、产酸性和耐酸性等致龋毒力因素是防龋的关键。

本研究结果显示:联合应用G-Rh2与NaF可以抑制变异链球菌生长、生物膜形成和产酸,且较单组药物应用时效果更好。棋盘微量稀释法检测结果显示:仅将 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  G-Rh2与 $31.250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NaF联合应用就可以达到单独应用 $25.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  G-Rh2或 $125.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NaF的效果;生长曲线表明:与空白对照组和单组药物组比较,联合组对细菌生长的抑制作用更明显;结晶紫染色实验和扫描电镜检测结果显示:联合组较单独药物组更能抑制变异链球菌生物膜的形成,且联合组的产酸抑制率高于空白对照组和单独药物组,表明联合应用时能更好地抑制变异链球菌产酸。关于G-Rh2和NaF抑制变异链球菌的相关机制,2种药物均可通过降低变异链球菌胞外多糖水平,抑制葡萄糖基转移酶、乳酸脱氢酶和烯醇酶等糖酵解相关酶的活性等来影响生物膜形成和产酸<sup>[17-18]</sup>。除上述共同抑菌途径之外,NaF还可抑制胞内多糖生长及抑制过氧化物酶和过氧化氢酶活性来影响变异链球菌生长及生物膜形成,且其能抑制 $\text{F}^{-}\text{ATPase}$ 和 $\text{H}^{+}\text{ATPase}$ 等质子转运酶的活性使细胞质酸化,降低变异链球菌的耐酸性<sup>[19-21]</sup>,而G-Rh2可以直接破坏细菌细胞壁、抑制磷酸转移酶和乙醛/乙醇脱氢酶等的活性、影响群体感应系统及抑制eDNA释放<sup>[22]</sup>,此外还可通过消除质粒和抑制 $\beta$ -内酰胺酶活性等途径来干预及逆转细菌耐药性<sup>[23]</sup>。

综上所述,将G-Rh2与NaF联合应用不仅可



A: Blank control group; B: MBIC<sub>50</sub> G-Rh2 group; C: MBIC<sub>50</sub> NaF group; D: MBIC<sub>50</sub> G-Rh2 + MBIC<sub>50</sub> NaF combined group.

图5 G-Rh2和NaF单独与联合应用时变异链球菌扫描电子显微镜图像( $\times 20\,000$ )

Fig. 5 Scanning electron microscope images of *Streptococcus mutans* when treated with G-Rh2 and NaF alone or in combination( $\times 20\,000$ )



通过共同的抑菌途径发挥作用, 还可通过各自的抑菌机制增强效果, 降低变异链球菌耐药性的发生, 但 2 种药物协同抑制变异链球菌的具体机制, 仍需要进一步的探讨研究。

#### [参考文献]

- [1] CONRADS G, ABOUT I. Pathophysiology of dental caries[J]. Monogr Oral Sci, 2018, 27: 1-10.
- [2] BEDOYA-CORREA C M, RINCÓN RODRÍGUEZ R J, PARADA-SANCHEZ M T. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans* [J]. J Oral Biosci, 2019, 61(1): 22-31.
- [3] GRIGALUSKIENĖ R, SLABŠINSKIENĖ E, VASILIAUSKIENĖ I. Biological approach of dental caries management [J]. Stomatologija, 2015, 17 (4): 107-112.
- [4] JAIN A, SUPRABHA B S, SHENOY R, et al. Remineralising effectiveness of two fluoride varnishes containing additives: an *in vitro* study[J]. Oral Health Prev Dent, 2019, 17(4): 385-393.
- [5] MANARELLI M M, DELBEM A C B, BÁEZ-QUINTERO L C, et al. Fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate reduce enamel demineralization *in vitro*[J]. Acta Odontol Scand, 2017, 75(5): 376-378.
- [6] YU O Y, MEI M L, ZHAO I S, et al. Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride[J]. Dent Mater, 2018, 34(12): e344-e352.
- [7] ZHAO Y, LI H, WEI S, et al. Antimicrobial effects of chemical compounds isolated from traditional Chinese herbal medicine (TCHM) against drug-resistant bacteria: a review paper [J]. Mini Rev Med Chem, 2019, 19(2): 125-137.
- [8] CAO X, YE Q, FAN M, et al. Antimicrobial effects of the ginsenoside Rh2 on monospecies and multispecies cariogenic biofilms [J]. J Appl Microbiol, 2019, 126(3): 740-751.
- [9] KACHUR K, SUNTRES Z E. The antimicrobial properties of ginseng and ginseng extracts [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2016, 14(1): 81-94.
- [10] WEGEHAUPT F, MENGHINI G. Update fluorid [fluoride update] [J]. Swiss Dent J, 2020; 130 (9): 677-683.
- [11] DANG M H, JUNG J E, LEE D W, et al. Recovery of acid production in *Streptococcus mutans* biofilms after short-term fluoride treatment[J]. Caries Res, 2016, 50(4): 363-371.
- [12] CHEN X Q, DALIRI E B M, KIM N, et al. Microbial etiology and prevention of dental caries: exploiting natural products to inhibit cariogenic biofilms [J]. Pathogens, 2020, 9(7): 569.
- [13] LI X, CHU S, LIN M, et al. Anticancer property of ginsenoside Rh2 from ginseng [J]. Eur J Med Chem, 2020, 203: 112627.
- [14] IM D S. Pro-resolving effect of ginsenosides as an anti-inflammatory mechanism of panax ginseng [J]. Biomolecules, 2020, 10(3): 444.
- [15] YOO H J, JWA S K. Inhibitory effects of  $\beta$ -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm [J]. Arch Oral Biol, 2018, 88: 42-46.
- [16] LIU S, WEI Y, ZHOU X, et al. Function of alanine racemase in the physiological activity and cariogenicity of *Streptococcus mutans* [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5984.
- [17] DAMÉ-TEIXEIRA N, DENG D, DO T. *Streptococcus mutans* transcriptome in the presence of sodium fluoride and sucrose [J]. Arch Oral Biol, 2019, 102: 186-192.
- [18] LÓPEZ-LÓPEZ A, MIRA A. Shifts in composition and activity of oral biofilms after fluoride exposure [J]. Microb Ecol, 2020, 80(3): 729-738.
- [19] NAUMOVA E A, WEBER L, PANKRATZ V, et al. Bacterial viability in oral biofilm after tooth brushing with amine fluoride or sodium fluoride [J]. Arch Oral Biol, 2019, 97: 91-96.
- [20] KITAGAWA H, MIKI-OKA S, MAYANAGI G, et al. Inhibitory effect of resin composite containing S-PRG filler on *Streptococcus mutans* glucose metabolism [J]. J Dent, 2018, 70: 92-96.
- [21] ISHIGURO T, MAYANAGI G, AZUMI M, et al. Sodium fluoride and silver diamine fluoride-coated tooth surfaces inhibit bacterial acid production at the bacteria/tooth interface [J]. J Dent, 2019, 84: 30-35.
- [22] 曹茜茜, 叶倩琳, 周立波, 等. 人参皂苷 Rh2 抑制致龋菌生物膜的实验研究 [J]. 口腔医学研究, 2018, 34(12): 1302-1306.
- [23] 刘 迪, 张 浩, 孙宏宇, 等. 人参皂苷抑菌活性研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(12): 1424-1426.