

网络出版时间: 2019-5-9 10:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.010.html>

## EGCG 对致龋变异链球菌抑制作用的研究

施秀芳<sup>1</sup>, 刘雨<sup>1</sup>, 杨棕昕<sup>1</sup>, 王一君<sup>2</sup>, 张晨<sup>3</sup>, 王烈成<sup>4</sup>, 王元银<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对致龋变异链球菌(*S. mutans*)的抑制作用。方法 利用液体二倍稀释法测定 EGCG 对 *S. mutans* 的最低抑菌浓度(MIC)。利用紫外分光光度计测不同浓度的 EGCG 药液中 *S. mutans* 的光密度(OD)值, pH 计测 *S. mutans* 产酸的 pH 值, 并利用 OD 值评估 *S. mutans* 的黏附性能。结果 EGCG 对 *S. mutans* 的 MIC 为 6.25 mg/L; 随着 EGCG 药液浓度的增高, EGCG 对 *S. mutans* 的生长、产酸及黏附性能的抑制作用逐渐增强。结论 EGCG 可能是一种防治龋病的天然材料。

**关键词** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 变异链球菌; 龋病

**中图分类号** R 285

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)05-0715-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.010

2019-01-30 接收

**基金项目**: 国家自然科学基金(编号: 81271162); 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1401045013); 茶树生物学与资源利用国家重点实验室 2016 年度开放基金(编号: SKLTOF20160110)

**作者单位**: 安徽医科大学<sup>1</sup> 口腔医学院、<sup>4</sup> 基础医学院生理学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽医学高等专科学校, 合肥 230601

<sup>3</sup> 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036

**作者简介**: 施秀芳, 女, 硕士研究生;

张晨, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: 18663272@qq.com;

王烈成, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangliecheng@ahmu.edu.cn;

王元银, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

龋病是在以细菌为主的多因素作用下牙体硬组织发生的病变。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)、乳杆菌、放线菌等为常见的致龋菌, 其中 *S. mutans* 的致龋性主要依赖于其产酸、耐酸及黏附性能。绿茶的主要成分是茶多酚, 而茶多酚主要是由儿茶素组成的。儿茶素组分中含量最多的是表儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>证实 EGCG 在保护神经系统、抗氧化及抑菌等方面起重要作用。该课题组通过观察 *S. mutans* 与 EGCG 在厌氧条件下的共同孵育情况, 得出 EGCG 对 *S. mutans* 的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 并检测不同浓度的 EGCG 对 *S. mutans* 的光密度(optical density, OD)值、pH 值及黏附能力的影响, 从而探究绿茶提取物 EGCG 对致龋 *S. mutans* 的抑菌作用。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 国际标准变异链球菌菌株 ATCC 25175 (血清型 c)、牛脑心浸出液培养基(brain heart infusion, BHI)购自北京陆桥公司; EGCG 购自北京 Solarbio 公司; 蔗糖购自美国 Sigma 公司; 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS), 成分为 2 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、137 mmol/L NaCl 等。

### 1.2 方法

(20 mg/kg) ginsenoside CK intervention group, high concentration(40 mg/kg) ginsenoside CK intervention group and adenosylmethionine positive control group, HE staining was used to pathological examination of liver tissues, Western blot was used to detect the relative expression of ERS marker protein GRP78, Annexin V-FITC/PI double labeling method was used for detection of hepatocyte apoptosis, electron microscope observation was used for liver cell ultrastructure and triglyceride was measured. **Results** The intervention of high concentration(40 mg/kg) of ginsenoside CK of alcoholic liver injury model significantly improved the pathological changes of liver tissue, reduced the increased GRP78 protein expression caused by liver injury, effectively inhibited the apoptosis and mitochondrial structure damage induced by alcohol, and reduced the content of triglyceride. **Conclusion** This study demonstrates that high concentration(40 mg/kg) of ginsenoside CK can inhibit ERS response and effect on cell apoptosis, ultrastructure and lipid metabolism in alcoholic liver injury, and inhibit alcoholic liver disease to a certain extent.

**Key words** ginsenoside metabolite compound K; endoplasmic reticulum stress; alcoholic liver injury

**1.2.1 液体二倍稀释法测定 MIC 值** 取 8 支试管编号 1~8, 1 号试管中加入 9 ml 100 mg/L 的 EGCG 药液, 2~7 号试管中各加入 4.5 ml 的 BHI 液体培养基。根据二倍稀释法, 1 号试管中 EGCG 的浓度为 100 mg/L, 2 号为 50 mg/L, 3 号为 25 mg/L, 4 号为 12.5 mg/L, 5 号为 6.25 mg/L, 6 号为 3.125 mg/L。随后 1~7 号试管中分别加入 0.5 ml 的菌液, 将 7 号试管中加入的液体作为阴性对照, 空白对照为 8 号试管中加入的 5 ml BHI 液体培养基。紫外分光光度计在 590 nm 波长下测孵育前(0 h)及 37 °C 厌氧箱孵育 24 h 时各试管中 *S. mutans* 的 OD 值, 计算 24 h 该菌的 OD 增长值, 即  $\Delta OD$ 。肉眼观察厌氧孵育 24 h 时 8 支试管中该菌的生长情况, 以溶液澄清的最小浓度 EGCG 为 EGCG 对 *S. mutans* 的 MIC。

**1.2.2 不同浓度的 EGCG 作用下 *S. mutans* 的生长变化** 依照测定的 MIC, 1~5 号试管中各加入 4.5 ml 含 EGCG 的 BHI 液体培养基, 其中 1 号试管中 EGCG 的浓度为 2 MIC, 其余浓度依次减半。6 号及 7 号试管中分别为 4.5 ml、5 ml 不含 EGCG 的 BHI 液体培养基, 1~6 号试管中各加入 0.5 ml 菌液。7 支试管均置于 37 °C 厌氧箱孵育, 孵育前(0 h)及孵育 4、8、12、24、48 h 时, 在 590 nm 波长下用紫外分光光度计测各试管中 *S. mutans* 的 OD 值, 实验重复 3 次。根据 3 次实验所测 OD 值的均值, 绘制出不同浓度的 EGCG 作用下 *S. mutans* 的生长曲线。

**1.2.3 不同浓度的 EGCG 作用下 *S. mutans* 的产酸变化** 1~5 号试管中各加入 4.5 ml 含 EGCG 的 BHI 培养基(均含 1% 蔗糖), 其中 1 号试管中 EGCG 的浓度为 2 MIC, 其余浓度依次减半。6 号、7 号分别加入 4.5 ml 和 5 ml 的不含 EGCG 的 BHI 培养基(含 1% 蔗糖), 1~6 号各加入 0.5 ml 的菌液, 7 支试管均置于 37 °C 厌氧箱孵育。孵育前(0 h)及孵育 4、8、12、24、48 h 时取样本, 离心后收集上清液, pH 计检测上清液 pH 值并记录, 实验重复 3 次。根据 3 次实验所测 pH 值的均值, 绘制出 *S. mutans* 的 pH 变化曲线。

**1.2.4 不同浓度的 EGCG 作用下 *S. mutans* 的黏附能力变化** 1~4 号试管中各加入 4.5 ml 含 EGCG 的 BHI 培养基(均含 1% 蔗糖), 其中 1 号试管中 EGCG 的浓度为 1 MIC, 其余浓度依次减半。5 号试管中加入 4.5 ml 不含 EGCG 的 BHI 培养基(含 1% 蔗糖)。1~5 号试管中各加入 0.5 ml 菌液, 然后将 5 支试管倾斜 30° 置于 37 °C 厌氧箱孵育。孵育 24 h 后取出, 试管内液体均倒入第 2 批相应编号的试管

中, 原试管中各加入 5 ml PBS 液, 轻轻震荡洗涤, 将洗涤液移至第 3 批相应编号的试管中; 原试管中再次各加 5 ml PBS 液, 然后刮下原试管壁上的全部细菌; 将第 2、3 批试管中的溶液进行离心, 弃上清液, 然后向第 2、3 批试管中各加 5 ml PBS 液。充分混匀后在 590 nm 下测三批试管中 *S. mutans* 的 OD 值, 实验重复 3 次, 三批试管对应的均值分别记为 A、B、C。通过均值计算不同浓度的 EGCG 作用下 *S. mutans* 的黏附率和黏附抑制率变化, 计算公式如下: 黏附率 =  $A / (A + B + C) \times 100\%$ ; 黏附抑制率(%) =  $(\text{对照组黏附率} - \text{实验组黏附率}) / \text{对照组黏附率} \times 100\%$ 。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 多组间均值两两比较采用单因素方差分析的 LSD 检验, 显著水平  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 EGCG 对 *S. mutans* 的 MIC** 8 号空白对照组溶液为澄清的淡黄色, 7 号阴性对照组溶液为浑浊的淡黄色, 1~5 号与 8 号相似, 6 号与 7 号相似。以溶液澄清的最小 EGCG 浓度为 EGCG 对 *S. mutans* 的 MIC, 则 5 号 6.25 mg/L 的 EGCG 即为对 *S. mutans* 的 MIC。计算 *S. mutans* 在不同浓度 EGCG 药液中孵育 24 h 时的 OD 增长值, 即  $\Delta OD$ , 可见随着浓度的增加, 其  $\Delta OD$  值减少, 见表 1。为了进一步验证 MIC 值, 采用琼脂稀释法测 EGCG 对 *S. mutans* 的 MIC, *S. mutans* 的生长受到 80% 以上的抑制时, EGCG 的最低浓度即为 MIC。得出的结论与液体二倍稀释法一致, 即 6.25 mg/L 为 EGCG 对 *S. mutans* 的 MIC。

表 1 不同浓度 EGCG 抑制 *S. mutans* 的  $\Delta OD$  值

浓度( mg/L)	$\Delta OD$ 值
100	0.058
50	0.076
25	0.103
12.5	0.132
6.25	0.411
3.125	0.718
0	1.075
空白对照	0

**2.2 EGCG 对 *S. mutans* 生长的影响** EGCG 浓度为 1/2 MIC 时即可在共孵育的各时间段均能抑制 *S. mutans* 的生长, 差异有统计学意义(4 h:  $F = 17.918, P = 0.013$ ; 8 h:  $F = 319.461, P < 0.01$ ; 12 h:

$F = 241.725, P < 0.01$ ; 24 h:  $F = 2038.812, P < 0.01$ ; 48 h:  $F = 3835.226, P < 0.01$ ) 随着药液浓度的增高,对该菌生长的抑制作用逐渐增强。见图1。

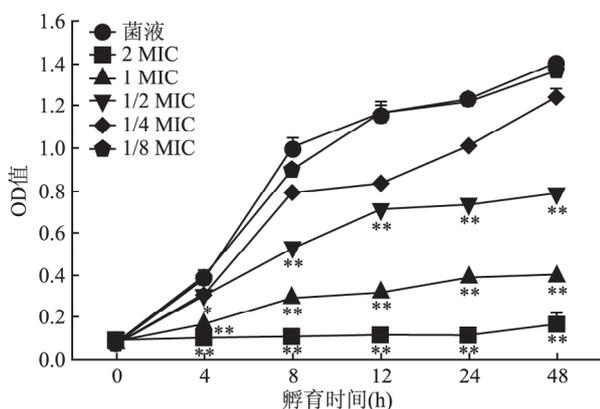


图1 不同浓度的EGCG对*S. mutans*生长曲线的影响  
与菌液组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.3 EGCG对*S. mutans*产酸的影响** EGCG浓度为1/4 MIC时即可在各时间段抑制*S. mutans*的产酸能力,差异有统计学意义(4 h:  $F = 120.032, P < 0.001$ ; 8 h:  $F = 37.020, P = 0.004$ ; 12 h:  $F = 102.400, P = 0.001$ ; 24 h:  $F = 317.793, P < 0.001$ ; 48 h:  $F = 92.571, P = 0.001$ ) 随着EGCG药液浓度的增高,对该菌产酸能力的抑制作用逐渐增强。见图2。

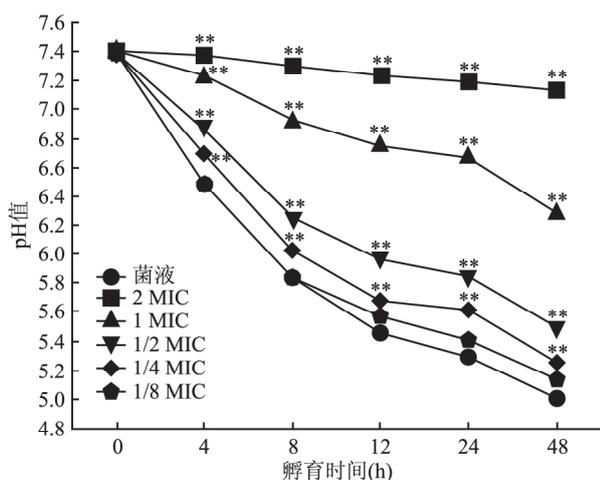


图2 不同浓度的EGCG对*S. mutans*产酸变化的影响  
与菌液组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.4 EGCG对*S. mutans*黏附能力的影响** EGCG浓度为1/4 MIC时与菌液组相比黏附率降低,差异有统计学意义( $F = 98.195, P = 0.001$ ),且随着EGCG浓度的增加,黏附率逐渐降低,黏附抑制率逐

渐增加。见表2。

表2 不同浓度的EGCG对*S. mutans*黏附的影响( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	黏附率(%)			抑制率(%)		
	$\bar{x} \pm s$	F值	P值	$\bar{x} \pm s$	F值	P值
菌液	36.24 ± 0.949	-	-	0	-	-
1 MIC	19.87 ± 0.854	401.965	<0.001	45.11 ± 3.795	-	-
1/2 MIC	23.80 ± 0.712	330.093	<0.001	34.27 ± 3.631	12.778	0.023
1/4 MIC	28.95 ± 0.849	98.195	0.001	20.09 ± 1.404	39.785	0.003
1/8 MIC	34.45 ± 0.988	5.122	0.086	4.94 ± 2.097	108.202	<0.001

黏附率:各实验组与菌液组比较;抑制率:低浓度组EGCG与相邻高浓度组比较

### 3 讨论

龋病是人类常见的口腔疾病,是在具有产酸及耐酸性能的乳酸杆菌、*S. mutans*等作用下分解、破坏牙体硬组织所造成的<sup>[3]</sup>。细菌致龋的先决条件是菌群以特异性或非特异性的方式黏附于牙面,相互聚集形成菌斑生物膜。*S. mutans*是世界上公认的主要致龋菌之一,其能够利用生物膜中的多糖提高牙菌斑中酸的含量<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明,与低糖或无糖相比,高糖浓度下*S. mutans*的产酸、耐酸、黏附毒力更强,由此推测,随着糖浓度的提高,*S. mutans*的致龋能力逐渐增强<sup>[6]</sup>。

绿茶有着几千年的饮用历史,具有防癌、降血脂、抑菌等多种功效。绿茶的主要化学成分包括茶多酚、蛋白质、糖类、生物碱和氨基酸等<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>证实茶多酚具有抗氧化、抗病毒、抗炎、抗菌等多种功能。也有研究<sup>[9]</sup>报道,茶多酚与木糖醇联合应用可明显抑制菌斑的形成。国内研究<sup>[10]</sup>表明茶多酚对细菌的抑制作用主要表现为对细菌细胞壁的破坏。而国外研究<sup>[11]</sup>显示茶多酚主要是通过破坏细菌的细胞膜从而抑制细菌的生长、繁殖。茶多酚主要由儿茶素类化合物组成,研究<sup>[12]</sup>证实儿茶素类化合物能抑制*S. mutans*的产酸能力。已知EGCG是儿茶素类化合物中含量最高、最具生物活性的成分<sup>[13]</sup>,具有最强的抗感染潜能以抑制各种微生物的生长及生物膜的形成<sup>[14]</sup>。但EGCG对致龋*S. mutans*的抑制作用及具体机制仍待研究。

为探讨EGCG对*S. mutans*的抑菌效能,本研究利用二倍稀释法检测EGCG对该菌的MIC,将不同浓度的EGCG与该菌共孵育,利用紫外分光光度计测590 nm波长下各浓度EGCG药液中该菌的OD值,pH计测该菌产酸的pH值,并利用OD值评估该菌的黏附性能。该研究结果表明,EGCG对*S. mutans*的MIC为6.25 mg/L,EGCG浓度为1/2 MIC时

即可在共孵育的各时间段抑制该菌的生长,EGCG浓度为1/4 MIC时即可抑制 *S. mutans* 的产酸能力且与菌液组相比黏附率降低;随着EGCG浓度的增加 *S. mutans* 的OD值逐渐降低,pH值逐渐上调,黏附率逐渐降低。鉴于EGCG对 *S. mutans* 的抑制作用,其可能在龋病的防治领域有重要作用,为龋病的防治提供了新方向。但本研究尚缺乏在体实验的支持,进行在体实验的关键是龋齿模型的建立。该课题组采用4~5周龄的雄性SD大鼠,喂养高糖食物并隔天涂抹 *S. mutans* 菌液,以期3~4个月的时间导致龋齿从而建立SD大鼠的龋齿模型。但由于SD大鼠本身不易患龋齿且长期喂养存在不可控性的死亡等,多次造模均未成功。接下来课题组将改进造模方案,争取造出龋齿模型,用在体实验进一步研究EGCG对龋病的影响。

### 参考文献

- [1] Kim H S, Quon M J, Kim J A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 187-95.
- [2] 葛建,林芳,李明揆,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)生物活性研究进展[J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(2): 156-63.
- [3] Gaikwad S S, Gheware A, Kamatagi L, et al. Dental caries and its relationship to malocclusion in permanent dentition among 12-15 year old school going children [J]. *J Int Oral Health*, 2014, 6(5): 27-30.
- [4] Pinna R, Usai P, Filigheddu E, et al. The role of adhesive materials and oral biofilm in the failure of adhesive resin restorations [J]. *Am J Dent*, 2017, 30(5): 285-92.
- [5] Sun M, Kang Q, Li T, et al. Effect of high-fructose corn syrup on *Streptococcus mutans* virulence gene expression and on tooth demineralization [J]. *Eur J Oral Sci*, 2014, 122(3): 216-22.
- [6] 高敬,黄文明. 变异链球菌耐酸毒力因子质子移位膜ATP酶在龋病进展中的动态变化[J]. *华西口腔医学杂志*, 2016, 34(2): 200-4.
- [7] Vuong Q V. Epidemiological evidence linking tea consumption to human health: a review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014, 54(4): 523-36.
- [8] 董璐,代增英,韩晴,等. 茶多酚的抑菌作用研究进展[J]. *山东食品发酵*, 2014(3): 42-4.
- [9] 黄晓晶,高升辉,钟泉,等. 茶多酚-木糖醇漱口液抑制菌斑形成的体内研究[J]. *福建医科大学学报*, 2004, 38(2): 179-81.
- [10] 陈冉冉,傅柏平. 茶色素抑制变形链球菌的实验研究[J]. *口腔医学*, 2007, 27(4): 181-3.
- [11] Yi S M, Zhu J L, Fu L L, et al. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 144(1): 111-7.
- [12] Xu X, Zhou X D, Wu C D. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(3): 1229-36.
- [13] Row K H, Jin Y. Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction [J]. *Bioresour Technol*, 2006, 97(5): 790-3.
- [14] Guo Y J, Zhang B, Feng X S, et al. Human cathelicidin LL-37 enhance the antibiofilm effect of EGCG on *Streptococcus mutans* [J]. *BMC Oral Health*, 2016, 16(1): 101.

## Study on the inhibitory effect of EGCG on *Streptococcus mutans* of cariogenic bacteria

Shi Xiufang, Liu Yu, Yang Liangxin, et al

(*Stomatological College of Anhui Medical University, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To investigate the inhibitory effect of epigallocatechin gallate(EGCG) on *Streptococcus mutans*(*S. mutans*). **Methods** The minimum inhibitory concentration(MIC) of EGCG against *S. mutans* was determined by liquid double dilution method. The optical density(OD) value of *S. mutans* in different concentrations of EGCG solution was measured by ultraviolet spectrophotometer. The pH value of acid produced by *S. mutans* was measured by pH meter, and the adhesion property of *S. mutans* was evaluated by OD value. **Results** The MIC of EGCG against *S. mutans* was 6.25 mg/L. With the increase of the concentration of EGCG, the inhibitory effect of EGCG on the growth, acid production and adhesion properties of *S. mutans* was gradually enhanced. **Conclusion** EGCG may be a natural material for the prevention and treatment of dental caries.

**Key words** epigallocatechin gallate; *Streptococcus mutans*; dental caries