

· 论 著 ·

一株分离自口腔的鼠李糖乳杆菌及其特性

鄢梦洁¹, 路江浩¹, 孙新凯¹, 霍文敏¹, 马新颖¹, 崔文静¹, 何方², 赵林森¹

1. 河北一然生物科技有限公司, 河北 石家庄 050000;

2. 四川大学华西公共卫生学院 营养与食品卫生及毒理学系, 四川 成都 610000

摘要: 目的 分离筛选出在维护口腔微生态平衡方面具有潜在益生特性的乳杆菌菌株。方法 从健康志愿者的口腔样本中分离乳杆菌, 采用生理生化 and 16S rDNA 分子测序进行菌株鉴定, 并检测其抑菌能力、凝集能力、表面疏水性以及对溶菌酶耐受性。结果 筛选出 1 株鼠李糖乳杆菌 LR863, 对变形链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和伴放线放线杆菌具有抑菌作用, 经蛋白酶处理后其抑菌活性降低。同时鼠李糖乳杆菌 LR863 有较强的自凝集能力并对上述 5 株指示菌有共凝集效果, 对二甲苯、氯仿和乙酸乙酯的疏水率依次为 76.91%、87.46% 和 41.88%, 能耐受 2.0 mg/mL 浓度的溶菌酶。**结论** 鼠李糖乳杆菌 LR863 具有优良生物学特性, 可作为口腔保健产品的候选益生菌株。

关键词: 口腔健康; 鼠李糖乳杆菌; 抑菌能力; 凝集能力

中图分类号: R378 文献标志码: A 文章编号: 1005-376X (2020) 12-1370-05

DOI 编码: 10.13381/j.cnki.cjm.202012002

In vitro assessment of probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from oral cavity

YAN Mengjie*, LU Jianghao, SUN Xinkai, HUO Wenmin,

MA Xinying, CUI Wenjing, HE Fang, ZHAO Linsen

* Hebei Inatural Bio-Tech Co, Ltd., Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Corresponding author: ZHAO Linsen, E-mail: zhaolinsen@yrsrw.cn

Abstract: **Objective** To evaluate the probiotic potential of *Lactobacillus* isolated from oral cavity and select candidates to be used as probiotic in oral health. **Methods** *Lactobacillus* strains were screened from saliva and dental plaque by using selective medium. The *Lactobacillus* strains were identified and examined for antimicrobial activity, co-aggregation ability, hydrophobicity and resistance to lysozyme. **Results** A strain of *Lactobacillus rhamnosus* named LR863 was obtained, which exhibited antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Its antimicrobial activity decreased after protease treatment. This strain also showed excellent autoaggregation ability and co-aggregation ability. The hydrophobicity rates with xylene, chloroform and ethyl acetate were 76.91%, 87.46% and 41.88% respectively. Moreover, *L. rhamnosus* LR863 showed resistance to 2.0 mg/mL lysozyme. **Conclusion** *L. rhamnosus* LR863 exhibited a spectrum of probiotic properties, which may facilitate its applications in oral care products.

Key words: Oral health; *Lactobacillus rhamnosus*; Antimicrobial activity; Co-aggregation ability

口腔内已知细菌种类多达 700 余种, 构成其特有的生态系统。卫生习惯、吸烟、服用抗生素、饮食等不良生活方式会导致口腔菌群紊乱, 而菌群失调会导致龋齿、牙周炎等多种口腔疾病的发生^[1]。

龋病被 WHO 列为发病率最高的三大疾病之一, 而变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 则是公认的主要致龋菌^[2]。牙周炎患病率在我国成年人中达 90% 以上, 常见致病菌有具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 等^[3]。牙周斑生生物膜是龋病和牙周病发生的始动因子, 而戈登链球菌 (*Streptococcus gordonii*) 作为生物膜形成的早期定植菌, 为其他致病菌提供了特异性结合位点并加速其在

基金项目: 石家庄市科技型中小企业技术创新资金项目 (17SCX03006)

作者简介: 鄢梦洁 (1990-), 女, 硕士, 从事微生态制剂研究, E-mail: yanmengjie@yrsrw.cn

通信作者: 赵林森, E-mail: zhaolinsen@yrsrw.cn

牙菌斑中定植^[4-5]。研究发现服用含乳杆菌的食品可减少口腔中致病菌的数量,缓解口腔疾病的发生发展^[6-8]。作为维护口腔健康的益生菌,需具备抑制口腔致病菌能力,减轻这些致病菌在口腔中聚集,并能耐受口腔环境,降低口腔疾病发生率。本研究从健康口腔志愿者的唾液和牙菌斑样本中分离得到乳杆菌,验证其抑菌和凝集能力以及其他益生特性,为开发具有预防和缓解口腔疾病的益生菌产品提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis* ATCC 33277)、具核梭杆菌 (*F. nucleatum* ATCC 25586)、伴放线放线杆菌 (*A. actinomycetemcomitans* ATCC 700685) 购自北纳创联生物技术研究院。变形链球菌 (*S. mutans* ATCC 25175)、戈登链球菌 (*S. gordonii* DL1) 由四川大学华西公共卫生学院何方教授惠赠。

1.1.2 主要试剂与仪器 脱纤维羊血 (益康生物科技有限公司), 过氧化氢酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、溶菌酶 (美国 Sigma 公司), API 50CH 试剂条 (法国梅里埃公司), 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (上海生工生物技术有限公司)。生物安全柜 (BSC-1604 II A2 型, 苏州安泰空气技术有限公司), 高速离心机 (Fresco 21 型, 赛默飞世尔科技公司), 紫外分光光度计 (722N 型, 上海仪电分析仪器有限公司), 生化培养箱 (LRH-250 型, 昆山一恒仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 乳杆菌分离及鉴定 收集 24 名 3 个月内未服用抗生素的健康志愿者唾液和牙菌斑样本 (本研究为体外采样, 无损伤行为), 加生理盐水稀释后涂布于含碳酸钙的固体 MRS 培养基上 37 °C 厌氧培养 48 h, 将溶钙圈明显的菌落分离纯化, 革兰阳性、接触酶试验阴性的菌株判定为乳杆菌并进行抑菌试验。

采用 API 50CH 试剂条对抑菌效果明显的乳杆菌进行糖发酵试验。按 DNA 提取试剂盒说明提取该乳杆菌基因组, 用通用引物 27F/1492R 扩增菌株的 16S rDNA 序列。上游引物 27F 为 5'-AGAGTTTG-ATCCTGGCTCAG-3', 下游引物 1492R 为 5'-GG-TTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 体系 50 μ L: PCR Mix (2 \times) 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物的测序由上海生工生物技术公司完成, 序列信息与

NCBI 序列进行比对分析。

1.2.2 抑菌试验

1.2.2.1 乳杆菌发酵上清液制备 挑取单菌落于 MRS 液体培养基中活化, 37 °C 培养 24 h, 4 °C、6 164 \times g 离心 10 min, 收集上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后备用。

1.2.2.2 乳杆菌发酵上清液对变形链球菌和戈登链球菌的抑菌试验 采用牛津杯双层平板法^[9], 无菌平皿加入 10 mL 琼脂培养基凝固后, 放入牛津杯, 将 100 μ L 指示菌液 (浓度约为 1×10^8 CFU/mL) 与 10 mL 固体 BHI 培养基混匀倒入平皿中, 凝固后取出牛津杯, 将 100 μ L 乳杆菌发酵上清液加至孔中, 37 °C 厌氧培养 20~24 h 后测量抑菌圈直径。

1.2.2.3 乳杆菌发酵上清液对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌、伴放线放线杆菌的抑菌试验 采用琼脂扩散法^[9], 取 100 μ L 指示菌液 (浓度约为 1×10^8 CFU/mL) 均匀涂布于含脱纤维羊血固体 TSA 培养基上, 放入牛津杯并加入 100 μ L 乳杆菌发酵上清液, 37 °C 厌氧培养 3~5 d 后测量抑菌圈直径。

1.2.2.4 抑菌物质的初步探究 测定乳杆菌发酵上清液 pH 值, 用 NaOH 溶液调至 pH 值为 4.0、5.0、5.5 后过滤除菌。液体 MRS 培养基经乳酸调至 pH 值为 4.0、5.0、5.5 作为对照。以变形链球菌为指示菌, 探究酸性物质对抑菌效果的影响。

将乳杆菌发酵上清液调至各种酶作用的最适 pH 值, 分别按终浓度 1 mg/mL 添加过氧化氢酶 (pH 7.0)、胰蛋白酶 (pH 7.0)、胃蛋白酶 (pH 2.0) 和蛋白酶 K (pH 7.0), 37 °C 水浴 3 h 后将发酵上清液调至 pH 值为 5.5 过滤除菌。液体 MRS 培养基进行相同处理作为对照。以变形链球菌为指示菌, 探究过氧化氢酶及蛋白酶对抑菌效果的影响。

1.2.3 凝集试验^[10]

1.2.3.1 自凝集试验 将乳杆菌菌液或致病菌菌液 2 408 \times g 离心 15 min, 收集菌体用 PBS (pH 7.0) 洗涤并重悬, 测定波长 600 nm 处的 A 值, 调节菌悬液 A 值为 0.60 ± 0.02 记为 A_0 , 静置培养, 分别在 1、2、3、4、5 h 缓慢吸取 1 mL 上层液体, 测定 A 值记为 A_t , 计算菌体自凝集率。自凝集率 = $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$ 。

1.2.3.2 共凝集试验 分别将乳杆菌、致病菌菌液 2 408 \times g 离心 15 min, 收集菌体用 PBS (pH 7.0) 洗涤并重悬, 测定波长 600 nm 处的 A 值, 调节菌悬液 A 值为 0.60 ± 0.02 , 其中乳杆菌 A 值记为 A_x , 致病菌 A 值记为 A_y , 将 2 种菌悬液等体积混合, 充分震荡 2 min, 静置培养, 分别在 1、2、3、4、5 h 缓慢吸取 1 mL 上层液体, 测定吸光度 $A_{(x+y)}$ 值, 计算乳杆菌与致病菌的共凝集率。共凝集率 = $[(A_x + A_y) - 2A_{(x+y)}] / (A_x + A_y) \times 100\%$ 。

1.2.4 疏水性试验 按照文献 [9] 中方法将乳杆菌菌株与二甲苯、氯仿、乙酸乙酯混合，测定其表面疏水性。

1.2.5 溶菌酶耐受性试验^[11] 取 1 mL 乳杆菌菌液 (1×10^7 CFU/mL) 与固体 MRS 培养基混匀倒入平皿中，凝固后放置牛津杯，取不同浓度的溶菌酶溶液 (0.05~2.00 mg/mL) 100 μ L 加至牛津杯中，37 $^{\circ}$ C 培养 24 h，根据透明圈程度大小判定乳杆菌对溶菌酶的耐受性。

1.3 数据统计与分析 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。每组试验重复 3 次，结果以 3 次重复试验的均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，使用 Graph-

Pad Prism 软件做图。

2 结果

2.1 乳杆菌分离与鉴定 从口腔样本中分离得到 32 株革兰阳性、接触酶阴性的乳杆菌。通过抑菌试验筛选出 1 株抑菌活性最佳的乳杆菌进行糖发酵试验，结果见表 1。将该菌 16S rDNA 测序结果用 BLAST 进行基因同源性比对，与鼠李糖乳杆菌的同源性达 99%。结合糖发酵试验，鉴定该菌为鼠李糖乳杆菌，命名为鼠李糖乳杆菌 LR863 (GenBank: MT312810)。

表 1 鼠李糖乳杆菌 LR863 发酵糖试验结果 [碳水化合物产酸 (API 50CH)]

发酵糖	试验结果	发酵糖	试验结果	发酵糖	试验结果
甘油	-	肌醇	-	菊糖	-
赤藓醇	-	甘露醇	+	松三糖	+
D-阿拉伯糖	-	山梨醇	+	棉子糖	-
L-阿拉伯糖	-	α -甲基-D-甘露糖苷	-	淀粉	-
D-核糖	+	α -甲基-D-葡萄糖苷	+	糖原	-
D-木糖	-	N-乙酰-葡糖胺	+	木糖醇	-
L-木糖	-	苦杏仁苷	+	龙胆二糖	+
阿东醇	-	熊果苷	+	D-松二糖	+
β -甲基-D-木糖苷	-	七叶灵	+	D-来苏糖	-
D-半乳糖	+	水杨苷	+	D-塔格糖	+
D-葡萄糖	+	纤维二糖	+	D-岩藻糖	-
D-果糖	+	麦芽糖	+	L-岩藻糖	-
D-甘露糖	+	乳糖	+	D-阿拉伯糖醇	-
L-山梨糖	+	蜜二糖	-	L-阿拉伯糖醇	-
L-鼠李糖	+	海藻糖	+	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
卫茅醇	-	蔗糖	+		

2.2 抑菌试验 鼠李糖乳杆菌 LR863 发酵上清液对 5 株口腔指示菌均有较强的抑菌活性，对 5 株口腔指示菌的抑菌圈直径 (mm) 分别为：变形链球菌 15.35 ± 0.06 、戈登链球菌 16.08 ± 0.15 、牙龈卟啉单胞菌 15.12 ± 0.29 、具核梭杆菌 16.56 ± 0.36 、

伴放线放线杆菌 15.82 ± 0.17 (打孔直径为 7 mm，牛津杯直径 7 mm，结果以均值 \pm 标准差表示)。图 1 依次是 LR863 对变形链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和伴放线放线杆菌的抑菌结果。



注：左到右依次是 LR863 对变形链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和伴放线放线杆菌的抑菌结果，其中每个平皿中左边 2 孔为 LR863 上清液的抑菌效果，右边 2 孔是以 MRS 培养基作为空白对照。

图 1 鼠李糖乳杆菌 LR863 对 5 株口腔指示菌的抑菌结果

2.3 抑菌物质的初步探究试验 pH 4.0 和 pH 5.0 的液体 MRS 培养基对变形链球菌有抑制作用，而

调至 pH 5.5 时抑菌作用消失。LR863 发酵上清液抑菌效果随 pH 值上升而下降，但调至 pH 5.5 时仍

可抑制变形链球菌生长, 推测除有机酸外还有其他成分发挥抑菌作用, 未经处理的 LR863 上清液抑菌圈直径为 (15.58±0.21) mm, 调至 pH 5.5 的上清液抑菌圈直径为 (13.67±0.15) mm。经过氧化氢试剂盒检测, LR863 代谢产物中含 1.61 mg/L 过氧化氢, 经过氧化氢酶处理后抑菌圈直径为 (11.96±0.23) mm。经胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K 处理后抑菌活性下降, 抑菌圈直径分别为 (10.06±0.04) mm、(10.23±0.52) mm 和 (9.50±0.11) mm (打孔直径为 7 mm, 牛津杯直径 7 mm, 结果以均值±标准差表示), 表明其代谢产物中除有机酸和过氧化氢外, 还含有蛋白类物质发挥抑菌作用。而经相同酶处理的液体 MRS 培养基未出现抑菌圈。

2.4 凝集试验 由图 2 可见, 随时间延长 LR863、变形链球菌、戈登链球菌、伴放线放线杆菌的自凝集率逐渐增加, 其中 LR863 的自凝集能力最强。LR863 与变形链球菌、戈登链球菌、伴放线放线杆菌的共凝集率均高于这 3 株菌的自凝集率, LR863 与这 3 株菌发生共凝集反应, 有助于使这些菌从口腔中排出。由图 3 可见, 具核梭杆菌和牙龈卟啉单胞菌具有较强的自凝集能力, 这与菌株本身的特性有关。LR863 与具核梭杆菌、牙龈卟啉单胞菌共凝集率低于这 2 株菌的自凝集率, LR863 与这 2 株致病菌产生共凝集反应, 在一定程度上减弱了这 2 株菌的自凝集, 从而减少其在牙周袋和龈下菌斑中聚集形成生物膜。

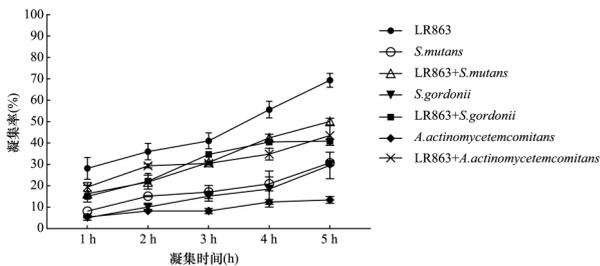


图 2 菌株自凝集及鼠李糖乳杆菌 LR863 与变形链球菌、戈登链球菌、伴放线放线杆菌共凝集能力

2.5 疏水性 疏水性作为细菌非特异性黏附的重要组成部分, 其疏水性强弱对细菌与牙面、口腔上皮细胞的初始黏附有重要作用, 表面疏水性与黏附作用呈正相关。根据疏水率标准: 疏水率 > 50% 为高疏水性, 介于 20%~50% 为中度疏水, < 20% 为非疏水性^[12-13], 由图 4 可见, 鼠李糖乳杆菌 LR863 具有良好的疏水性, 对二甲苯、氯仿和乙酸乙酯的疏水率分别为 76.91%、87.46% 和 41.88%。

2.6 对溶菌酶耐受性 口腔中溶菌酶浓度为 1~57 μg/mL, 作用于口腔中的乳酸菌需对溶菌酶有耐受能力^[14]。经 37 °C 培养 24 h 后, 加有浓度 0.05~

2.00 mg/mL 溶菌酶的牛津杯周围均没有抑菌圈形成, 表明鼠李糖乳杆菌 LR863 可耐受较高浓度的溶菌酶。

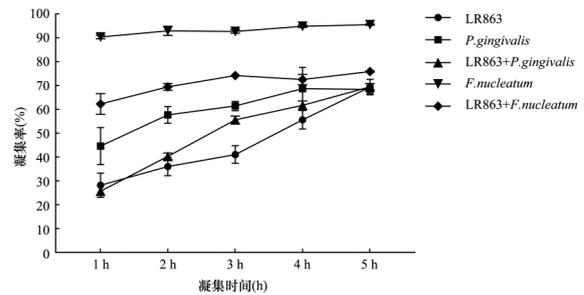


图 3 菌株自凝集及鼠李糖乳杆菌 LR863 与牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌共凝集能力

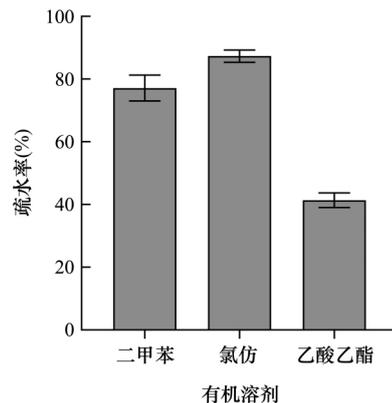


图 4 鼠李糖乳杆菌 LR863 的表面疏水性

3 讨论

3.1 口腔益生菌特性分析 本研究从健康志愿者口腔样本中分离出 1 株鼠李糖乳杆菌并命名为 LR863, 经验证可明显抑制变形链球菌、戈登链球菌、牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和伴放线放线杆菌等常见龋齿和牙周炎致病菌的生长, 并与这些菌发生共凝集反应。同时 LR863 表现出较高的表面疏水性和对溶菌酶耐受性, 为口腔中发挥作用提供基础。

在龋病和牙周炎初期, 部分变形链球菌、戈登链球菌、伴放线放线杆菌以浮状态存在于唾液或牙齿表面^[15-17]。乳杆菌与这些菌产生共凝集反应, 加速其从口腔中排出, 降低这些菌与其他致病菌的凝集或定植, 减少生物膜形成。姚沛琳等^[18]分离的魏斯菌也表现出对变形链球菌的共凝效果。牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌由于菌体形态及生长特性, 主要定植于牙周袋和龈下菌斑中, 使得刷牙、漱口等清洁方式很难将其清除, 具核梭杆菌以“粘接桥”形式特异性介导龋齿致病菌和牙周炎致病菌发生共凝集反应, 促进牙菌斑形成^[19-20]。LR863 与具核梭

杆菌和牙龈卟啉单胞菌发生共凝集反应，以减少这 2 种菌在牙周袋和牙菌斑中定植，还能降低与其他致病菌发生交互凝集。因此利用乳杆菌与这些致病菌共凝集可作为降低牙菌斑形成的辅助手段。

3.2 研究展望 龋齿和牙周炎作为常见的口腔疾病，不仅损害牙体及牙周组织，而且与全身疾病如糖尿病、结直肠癌、心血管疾病、阿尔茨海默病有关联^[21-24]。鼠李糖乳杆菌 LR863 通过抑菌和共凝集作用减少龋齿和牙周炎致病菌在口腔中的数量，在防治口腔疾病、维持微生态平衡方面具有潜在应用价值，可在饮料、发酵制品、口含片和口香糖等口腔保健产品中应用。应用于牙膏和漱口水等清洁类产品中，由于这些产品不适于乳杆菌长期存活，所以研究灭活的乳杆菌是否具有此类益生功效值得深入研究。

参考文献

[1] Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, et al. Oral diseases; a global public health challenge[J]. Lancet(London, England), 2019, 394(10194): 249-260.

[2] 许颖, 袁媛, 李婷, 等. 盐酸小檗碱对变形链球菌生物膜及其致龋毒力因子作用的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(3): 300-303.
XU Ying, YUAN Yuan, LI Ting, et al. Effect of Berberine hydrochloride against the biofilm and cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*[J]. Chin J Microecol, 2014, 26(3): 300-303. (in Chinese)

[3] Bosshardt DD. The periodontal pocket; pathogenesis, histopathology and consequences[J]. Periodontology, 2018, 76(1): 43-50.

[4] Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms; emerging concepts in microbial ecology[J]. J Dent Res, 2010, 89(1): 8-18.

[5] 张冬梅, 刘静波, 潘亚萍, 等. 戈登链球菌对牙龈卟啉单胞菌生物膜形成的影响[J]. 上海口腔医学, 2015, 24(6): 641-644.
ZHANG Dongmei, LIU Jingbo, PAN Yaping, et al. The impact of *S. gordonii* on *P. gingivalis* on the form of biofilm[J]. Shanghai J Stomatol, 2015, 24(6): 641-644. (in Chinese)

[6] Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, et al. *Salivary mutans streptococci* and *Lactobacillus* levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets[J]. Acta Odontologica Scandinavica, 2006, 64(5): 314-318.

[7] D' Wlivaara, Sjgren I, Gerasimeik N, et al. Effects of *Lactobacillus reuteri*-containing lozenges on healing after surgical removal of mandibular third molars: a randomised controlled trial [J]. Benef Microb, 2019, 10(6): 1-8.

[8] Eden E, Topalolu A, Zgen F, et al. Effect of short-term probiotic Yogurt consumption on caries risk factors in infants[J]. J Pediatr Res, 2019, 6(1): 12-17.

[9] 郭兴华, 凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 161-331.

[10] 杨娟, 堵国成, 陈坚, 等. 口腔乳酸杆菌的分离及其益生特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(4): 403-408.
YANG Juan, DU Guocheng, CHEN Jian, et al. Characterization of a probiotic *Lactobacillus* strain isolated from oral cavity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(4): 403-408. (in Chinese)

[11] Köll P, Mändar R, Marcotte H, et al. Characterization of oral *Lactobacilli* as potential probiotics for oral health[J]. Oral Microbiol Immun, 2008, 23(2): 139-147.

[12] Colloca ME, Ahumada MC, Lopez ME, et al. Surface properties of *Lactobacilli* isolated from healthy subjects[J]. Oral Dis, 2000, 6(4): 227.

[13] Santos Y, Bandin I, Bruno DW, et al. Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures[A]. Pathology in Mafine Sciences[C]. San Diego: Academic Press, 1990; 101-115.

[14] 周菊芬, 徐岩英, 李晓新. 口腔念珠菌病患者唾液溶菌酶水平的研究[J]. 北京口腔医学, 2003, 11(2): 97-103.
ZHOU Jufen, XU Yanying, LI Xiaoxin. The levels of lysozyme in saliva in the patients with *Oral candidosis*[J]. Beijing J Stomatol, 2003, 11(2): 97-103. (in Chinese)

[15] Lang C, Bottner M, Holz C, et al. Specific *Lactobacillus/Mutans streptococcus* co-aggregation[J]. J Dental Res, 2010, 89(2): 175-179.

[16] Valappil SP, Coombes M, Wright L, et al. Role of gallium and silver from phosphate-based glasses on in vitro dual species oral biofilm models of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*[J]. Acta Biomater, 2012, 8(5): 1957-1965.

[17] Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects[J]. Infect Immun, 2001, 69(4): 2700-2707.

[18] 姚沛琳, 刘思思, 张宁, 等. 预防龋齿的口腔益生菌的分离及其特性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(19): 347-351.
YAO Peilin, LIU Sisi, ZHANG Ning, et al. Screening and research of a probiotic lactic acid bacteria against dental caries in vitro[J]. Sci Technol Food Indust, 2015, 36(19): 347-351. (in Chinese)

[19] 韩伶俐, 潘春玲, 张树伟, 等. 牙龈卟啉单胞菌、链球菌、口腔链球菌属在口腔内不同解剖部位的分布[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(4): 423-444.
HAN Lingna, PAN Chunling, ZHANG Shuwei, et al. The distribution of *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus cristatus* and *Streptococcus oralis* in oral cavity[J]. Chin J Microecol, 2017, 29(4): 423-444. (in Chinese)

[20] 王晴萱, 刘俊超. 具核梭杆菌通过 Toll 样受体促进口腔鳞状细胞癌发生发展的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(12): 1471-1473.
WANG Qingxuan, LIU Junchao. The effect of *Fusobacterium nucleatum* in promoting the development of OSCC through Toll-like receptors[J]. Chin J Microecol, 2015, 27(12): 1471-1473. (in Chinese)

[21] Xiao E, Mattos M, Gustavo H, et al. Diabetes enhances IL-17 expression and alters the oral microbiome to increase its pathogenicity[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 22(1): 120-128.

[22] Singh H, Torralba MG, Moncera KJ, et al. Gastro-intestinal and oral microbiome signatures associated with healthy aging [J]. Gero Sci, 2019, 41(6): 907-921.

[23] Yu TC, Guo F, Yu Y, et al. *Fusobacterium nucleatum*, promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy[J]. Cell, 2017, 170(3): 548-563.

[24] Dominy SS, Lynch C, Ermini F, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors[J]. Sci Adv, 2019, 5(1): eaau3333.

收稿日期: 2019-11-26 修回日期: 2020-05-15 本文编辑: 李兵