

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00393

· 论 著 ·

激光共聚焦扫描显微镜观察变异链球菌高致龋力临床株与标准株合成胞外多糖能力差异

黄晓晶*, 江山, 陈 帅

福建医科大学附属口腔医院牙体牙髓科, 福州 350002

[摘要] **目的** 了解变异链球菌(简称变链菌)593 号高致龋力临床分离株在生物膜状态不同时期与标准株 ATCC 25175(均为血清型 c)合成胞外多糖的能力差异。**方法** 在聚苯乙烯塑料片上分别形成 3、12、20 h 变链菌生物膜标本,采用异硫氰酸荧光素标记的伴刀豆球蛋白 A 对合成的胞外多糖进行染色,用激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)观察。采用静置法培养形成黏附生长的细菌,蒽酮法测定 3~24 h 其合成胞外多糖的量。**结果** 胞外多糖与染料结合后发出绿色荧光,各时间段 593 号临床株绿色荧光的分布较 ATCC 25175 标准株更致密和广泛。3~20 h 593 号临床株合成水溶性葡聚糖能力强于标准株 ($P<0.05$);3~16 h 593 号临床株合成水不溶性葡聚糖能力强于标准株 ($P<0.05$);其他时间两者合成胞外多糖的能力差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 在生物膜形成过程中两菌株合成胞外多糖的模式相同,均随时间延长而合成量增加,但在生物膜形成早期(3~16 h)高致龋力临床株表现出不同于标准株的胞外多糖合成模式,其更强的合成胞外多糖能力可能是其具高致龋力的原因之一,提示研究致龋机制时使用临床株作为研究样本较标准株更为敏感。

[关键词] 变异链球菌;生物膜;激光共聚焦扫描显微镜;胞外多糖;临床株

[中图分类号] R 781.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)04-0393-06

Confocal laser scanning microscopy for observing difference in synthesizing exopolysaccharide by highly cariogenic clinical and standard strains of biofilm *Streptococcus mutans*

HUANG Xiao-jing*, JIANG Shan, CHEN Shuai

Department of Endodontology, Affiliated Stomatological Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350002, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To observe the different abilities in synthesizing exopolysaccharides between biofilm cells of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) clinical isolate 593 and standard stain *S. mutans* ATCC 25175 (serotype c). **Methods** *S. mutans* biofilm specimens were formed on the polystyrene plastic sheets for 3, 12 and 20 h. The exopolysaccharides was stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated concanavalin A and were visualized by confocal laser scanning microscopy. The amounts of exopolysaccharides produced by adhesive *S. mutans* in 3-24 h were determined by the anthrone method. **Results** The green fluorescence in strain 593 group was stronger and wider than that in the *S. mutans* ATCC 25175 group, with significant differences found for the amounts of water-soluble glucans during 3-20 h and water-insoluble glucans during 3-16 h ($P<0.05$). **Conclusion** The synthesis of exopolysaccharides during formation of biofilm increases with time in both clinical and standard strains of *S. mutans*. However, the stronger synthesizing ability of strain 593 in the early biofilm formation stage (3-16 h) may be the reason for its higher cariogenic ability, indicating that the clinical isolates may be more sensitive in studying the mechanism of caries pathogenesis.

[Key words] *Streptococcus mutans*; biofilms; confocal laser scanning microscopy; exopolysaccharide; clinical isolates

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4): 393-398]

变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*, 变链菌)是最主要的致龋菌,对其研究已深入到分子和蛋白水平,1999 年获得了变链菌 GS-5 菌株的物

理图和遗传图^[1],2002 年完成了对变链菌 UA159 菌株的全基因组测序^[2]。然而,这些研究成果,包括以往的许多研究结果^[3-4]都是基于对变链菌标准株

[收稿日期] 2010-09-24

[接受日期] 2011-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30500564),福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(NCETFJ-0612). Supported by National Natural Science Foundation of China(30500564), and Program for New Century Excellent Talents of Higher Institutions in Fujian Province(NCETFJ-0612).

[作者简介] 黄晓晶,博士,副教授、主任医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0591-83736434, E-mail: hxiaoj@163.com

研究所得出的。研究表明,不同个体菌斑中定植的变链菌菌株的基因型和致龋力均不同,也可能不同于标准株,尤其是高龋患者口内定植的变链菌临床株^[5-9]。因此,本研究采用异硫氰酸荧光素标记的伴刀豆球蛋白 A (fluorescein isothiocyanate-conjugated concanavalin A, FITC-ConA) 标记生物膜中的胞外多糖,用激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM) 观察其分布情况,结合蒽酮法分析胞外多糖分泌量,从定性和定量两个方面探讨高致龋力临床株和标准株在生物膜形成各时期合成胞外多糖的量及分布情况,并对两者的异同进行比较分析。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 TPY 培养液(自行配制;含质量体积分数 1.5% 胰蛋白胨、0.4% 酵母提取物、1% 葡萄糖、0.6% KH_2PO_4 、0.2% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、0.2% Na_2CO_3 、0.2% NaCl , pH 7.0), FITC-ConA (美国 Molecular Probes 公司), 丙酮(广东省汕头市西陇化工厂), 葡聚糖、蒽酮(上海生工生物工程技术服务有限公司)。

YQX-II 厌氧培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司), 聚苯乙烯培养皿(德国 Dow Corning 公司), 全自动酶联免疫测定仪(德国 Human 公司), Zeiss LSM510 型 CLSM(德国 Zeiss 公司), 水平旋转仪(江苏康健医疗用品有限公司), 细胞刮(墨西哥 Corning 公司)。

1.2 实验菌株 变链菌标准株 ATCC 25175 由四川大学华西口腔医学院龋病研究室惠赠, 变链菌 593 号临床株由本课题组于四川大学华西口腔医学院龋病研究室分离、鉴定及保存; 593 号临床株分离自高龋患者, 经 4 个经典的体外致龋实验(黏附、产胞外多糖、产酸、耐酸)证实 593 号临床株具高致龋力^[5-8]。

1.3 细菌培养 将变链菌菌株复苏、传代厌氧培养(37℃、80% N_2 、10% CO_2 、10% H_2) 48 h, 经镜检证实为纯培养后用 PBS 调节菌浓度至 D_{630} 为 1.0, 以 5% 体积接种于预热 37℃、含 1% 蔗糖的 TPY 培养液中配制成标准菌液备用。

1.4 CLSM 观察生物膜状态变链菌胞外多糖分布情况

1.4.1 生物膜标本制备 在直径 100 mm 的培养皿内放入环氧乙烷灭菌的 1 cm×1 cm 聚苯乙烯塑料片, 取标准菌液 20 ml 于培养皿中, 厌氧静置培养 3、12、20 h。每个时间点培养 4 个标本。实验设立背景对照, 即将空白聚苯乙烯片放入 TPY 培养液中

静置培养 24 h。

1.4.2 荧光染液的配制 FITC-ConA 溶于 0.1 mol/L NaHCO_3 溶液中(pH 8.3), 配制浓度为 10 mg/L。FITC-ConA 可与细菌合成的胞外多糖特异结合发出绿色荧光。

1.4.3 生物膜荧光染色与封片 将上述生物膜标本取出, 用 PBS 冲洗 2 次以去除表面松散黏附的细菌。取 200 μl 上述荧光染液滴于生物膜标本上, 在室温、黑暗环境中孵育 30 min 后, 加入 200 μl PBS 终止反应。背景对照组同法染色。

黑暗环境下, 在生物膜标本上滴加 1 滴 p-苯二胺抗淬灭剂(90% 甘油, 10% PBS, 其中 p-苯二胺浓度为 2~7 mmol/L, pH 8.5~9.0) 及 1 滴 PBS 后盖上盖玻片, 4℃ 避光保存并及时送检。

1.4.4 CLSM 观察 将上述染色好的生物膜标本倒置于 CLSM 下观察。每个生物膜标本由外(生物膜游离的一面)向内(生物膜和聚苯乙烯片相贴的一面)逐层沿 Z 轴(步距为 1 μm) 扫描。通过 Zeiss LSM 专业软件处理, 得到生物膜中胞外多糖分布的断层扫描图像, 经组合后得到生物膜中胞外多糖分布的三维图像。观察条件: 氩激光(514~488 nm), 物镜 20×, 物镜 10×, 水镜 63×, 目镜 10×。

1.4.5 图像分析 应用 ImageJ 图像分析软件计算连续扫描图像的最内层、中间层及最外层绿光面积, 其分别代表生物膜内层、中间层及外层的胞外多糖的密度。按公式计算胞外多糖密度: 每层胞外多糖密度 = 每层绿光面积(μm^2)/每层生物膜面积(μm^2)。

1.5 生物膜状态变链菌合成水溶性和水不溶性葡聚糖能力检测

1.5.1 生物膜状态变链菌培养 取标准菌液 20 ml 于直径 100 mm 的聚苯乙烯培养皿中, 每个培养时间各 6 个培养皿, 每菌株共 36 个样本。分别各取 3 个培养皿置于水平旋转仪, 50 转/min 进行摇动培养以获得全浮游生长的细菌, 另 3 个培养皿静置培养以获得大部分黏附生长的细菌, 之后放入厌氧箱中分别培养 3、6、12、16、20、24 h。

1.5.2 生物膜状态变链菌量测定 分别收集不同培养时间摇动培养浮游状态的变链菌和静置培养浮游状态的变链菌, 4℃、3 000×g 离心 15 min。用细胞刮刮取静置培养黏附于培养皿底部的生物膜状态细菌, 并重悬于去除浮游细菌后的培养上清液中, 再 4℃、3 000×g 离心 15 min, 然后分别计算摇动培养浮游状态、静置培养浮游状态、静置培养生物膜状态细菌菌量。

1.5.3 生物膜状态不同时期变链菌合成水溶性和水

不溶性葡聚糖含量的测定及合成能力计算 合并属于同一培养皿的细菌与培养液,4℃、3 000×g 离心 20 min,弃上清液。变链菌沉淀物用 5 ml PBS 洗 2 次,3 000×g 离心 20 min,合并上清液,蒽酮法测定水溶性葡聚糖含量。水洗后的变链菌加 0.4 mol/L NaOH 溶液 5 ml 洗涤 3 次,3 000×g 离心 20 min,合并上清液,蒽酮法测定水不溶性葡聚糖含量。

浮游状态细菌合成胞外多糖的能力=合成胞外多糖的量/浮游状态细菌的量;生物膜状态细菌合成胞外多糖的能力=(静置培养中细菌合成胞外多糖的量-浮游状态细菌合成胞外多糖的能力×静置培养中浮游状态细菌的量)/生物膜状态细菌的量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行数据处理,运用单因素方差分析法比较变链菌临床株和标准株间,以及不同培养时间生物膜状态变链菌合成葡聚糖的能力在各组间的差别,用 SNK 法进行两两比较。检验水平(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 变链菌生物膜状态胞外多糖分布 CLSM 观察
2.1.1 变链菌生物膜状态不同时期胞外多糖分布情况 CLSM 镜下(图 1),两菌株出现相似的分布情况:3 h 时暗视野下可见绿色荧光,且呈小片状、不均匀稀疏分布,相互间有较大空隙;12 h 时绿色荧光明显增多,呈团块状并相互连接,分布较广泛,相互间空隙减小,似地图状;20 h 时绿色荧光基本充满整个视野,团块状相互融合并呈复杂的网络状结构,似云雾状或棉絮状。但各时期两菌株的荧光分布亦存在差异:593 号临床株绿色荧光的强度较标准株更强,分布也更广泛、致密。实验中设立背景对照,即空白聚苯乙烯片荧光染色后,CLSM 镜下未观察到荧光物质存在。

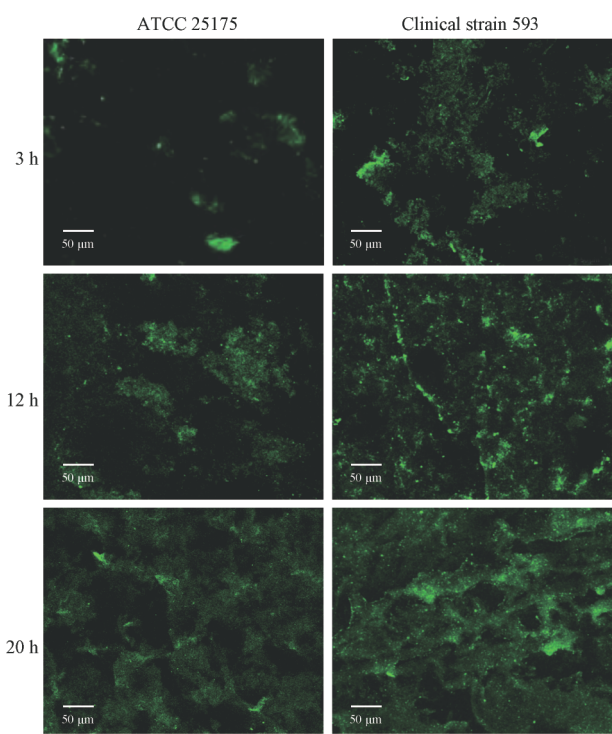


图 1 变链菌 ATCC 25175 标准株和 593 号临床株的生物膜胞外多糖染色 CLSM 观察
Fig 1 Observation of exopolysaccharides in biofilm of *S. mutans* ATCC 25175 and clinical strain 593 under confocal laser scanning microscope (CLSM)

2.1.2 胞外多糖分布的三维结构重建 将培养 20 h 的变链菌生物膜扫描图像应用 Zeiss LSM 专业软件进行三维重建(图 2),发现两菌株胞外多糖分布三维重建结构均是表面凹凸不平、不均匀的立体结构。但是二者重建结构亦存在差异:593 号临床株的沟壑状结构更明显,胞外多糖更致密,呈团块状;而标准株的结构相对平坦,胞外多糖比较稀疏。

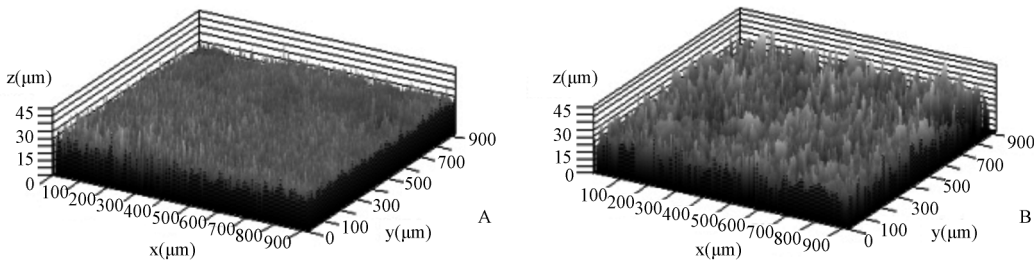


图 2 变链菌 ATCC 25175 标准株和 593 号临床株培养 20 h 时生物膜胞外多糖分布的三维结构重建图
Fig 2 Three-dimension images of biofilm exopolysaccharides distribution in *S. mutans* ATCC 25175(A) and clinical strain 593 (B) cultured for 20 h

2.1.3 不同时期变链菌生物膜胞外多糖的密度 培养不同时间后各层面胞外多糖密度见表 1,两菌株各层面培养 3 h 时的胞外多糖的密度均最

低,随培养时间延长,胞外多糖密度逐渐增加;培养 3 h 与培养 12、20 h 时的两菌株各层面胞外多糖密度比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而培养 12 h

与培养 20 h 之间的胞外多糖密度差异则无统计学意义($P>0.05$)。培养相同时间时各层面的 593 号临床株的胞外多糖密度均高于标准株($P<0.05$)。

表 1 两菌株不同培养时间生物膜各层面胞外多糖密度
Tab 1 Exopolysaccharides density of *S. mutans* ATCC 25175 and clinical strain 593 in out, medium, and inner layers at different time points

($n=6, \bar{x}\pm s$)

Time <i>t</i> /h	Out layer		Medium layer		Inner layer	
	ATCC 25175	Clinical strain 593	ATCC 25175	Clinical strain 593	ATCC 25175	Clinical strain 593
3	0.03±0.07	0.08±0.10 [△]	0.21±0.06	0.26±0.10 [△]	0.02±0.03	0.06±0.06 [△]
12	0.20±0.08 [*]	0.26±0.09 ^{*△}	0.45±0.13 [*]	0.59±0.11 ^{*△}	0.11±0.09 [*]	0.19±0.02 ^{*△}
20	0.21±0.08 [*]	0.27±0.08 ^{*△}	0.52±0.15 [*]	0.62±0.11 ^{*△}	0.13±0.14 [*]	0.23±0.02 ^{*△}

^{*} $P<0.05$ vs cultured for 3 h; [△] $P<0.05$ vs *S. mutans* ATCC 25175

2.2 生物膜状态变链菌合成水溶性和水不溶性葡聚糖的能力

2.2.1 生物膜状态变链菌定植菌量测定结果 不同时期生物膜变链菌定植菌量见表 2,两菌株在 3~20 h 定植菌量逐渐增加,6 h 时增长迅速,差异有统

计学意义($P<0.05$);24 h 定植菌量较 20 h 时稍有波动,差异无统计学意义($P>0.05$)。在不同时期,两菌株生物膜变链菌定植菌量均不相同,同一时期 593 号临床株的定植菌量均高于标准株($P<0.05$)。

表 2 不同时间段生物膜变链菌定植菌量(10^8 个/培养皿)
Tab 2 Biofilm cells of *S. mutans* ATCC 25175 and clinical strain 593 at different time points (10^8 /culture dish)

($n=6, \bar{x}\pm s$)

Group	Time of culture <i>t</i> /h					
	3	6	12	16	20	24
ATCC 25175	10.08±1.61	101.01±21.12 [*]	141.67±21.67 [*]	151.56±30.91 [*]	162.46±35.68 [*]	161.27±20.28 [*]
Clinical strain 593	18.42±1.91 ^{*△}	119.56±21.23 ^{*△}	156.24±23.56 ^{*△}	160.15±27.79 ^{*△}	169.89±21.23 ^{*△}	167.89±24.29 ^{*△}

^{*} $P<0.05$ vs cultured for 3 h; [△] $P<0.05$ vs *S. mutans* ATCC 25175

2.2.2 生物膜状态变链菌合成水溶性和水不溶性葡聚糖的含量测定结果 不同时期两菌株生物膜状态合成水溶性、水不溶性葡聚糖能力的总体趋势相似(图 3):水溶性胞外多糖的合成呈单峰曲线,12 h 时合成水溶性胞外多糖的能力最强;水不溶性胞外多糖的合成呈双峰曲线,3 h 时合成水不溶性胞外多糖能力最强,之后下降,6 h 后又逐渐增加,12 h 时

出现第 2 个合成高峰,之后合成量逐步下降并趋于稳定。但在相同时期,两菌株生物膜状态合成水溶性及水不溶性葡聚糖能力不同,经统计学分析显示:3~20 h,593 号临床株合成水溶性葡聚糖能力强于标准株($P<0.05$);3~16 h,593 号临床株合成水不溶性葡聚糖能力强于标准株($P<0.05$),其他时间差异无统计学意义。

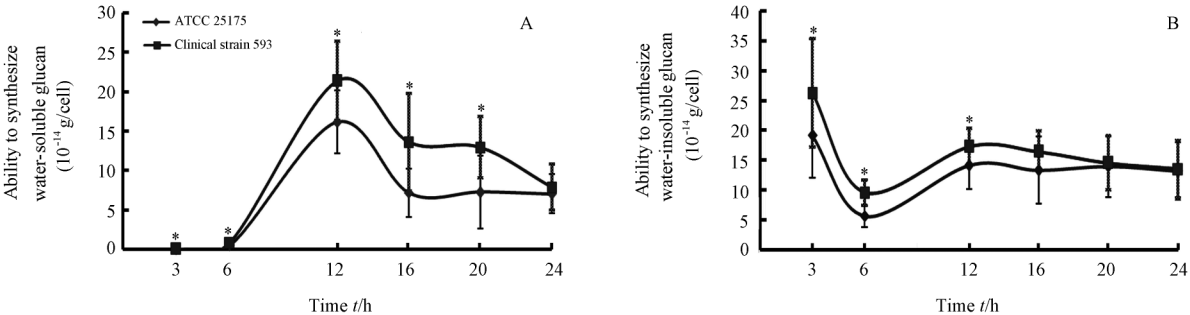


图 3 变链菌 ATCC 25175 标准株和 593 号临床株不同时期生物膜状态合成水溶性、水不溶性葡聚糖能力的变化
Fig 3 Synthesis of water-soluble and water-insoluble glucan by *S. mutans* ATCC 25175 (A) and clinical strain 593 (B) under biofilm condition at different time points

^{*} $P<0.05$ vs *S. mutans* ATCC 25175. $n=6, \bar{x}\pm s$

3 讨 论

特异性菌斑学说认为只有致龋菌斑在特定条件下才能致龋, 变链菌作为致龋菌斑中最主要的致龋菌而备受关注。许多研究已证实, 不仅高龋患者和无龋健康人口内定植的变链菌数量不同, 而且其基因型也存在差异^[9-13]。不仅如此, 即便是同一高龋患者, 其口内还常常定植有多种不同基因型和不同致龋力的变链菌^[5-8]。这些结果提示以往仅针对变链菌标准株的研究所获得的信息量可能有限。

为了明确标准株和临床株间是否存在差异及差异大小, 本实验选取同种血清型 c 的变链菌标准株 ATCC 25175 和具高致龋力的变链菌 593 号临床株进行研究, 比较两者在生物膜形成不同阶段合成胞外多糖的能力以及胞外多糖的分布情况。本研究利用 FITC-ConA 荧光染料可与胞外多糖特异结合发出绿色荧光的特性, 采用该染料染色生物膜中的胞外多糖, 通过 CLSM 进行断层扫描、成像、三维空间结构重建, 可真实再现生物膜各时期胞外多糖的三维分布情况^[14-15], 再结合蒽酮法的定量分析, 则可得到生物膜各时期胞外多糖的量和空间分布的整体信息, 从定性和定量的角度同时进行比较、分析。

CLSM 观察发现, 两菌株合成胞外多糖的模式相似: 在 3~20 h, 生物膜中变链菌合成胞外多糖的量(绿色荧光面积)逐渐增加, 最初呈稀疏、片状的散在分布, 此后片状相互融合形成团块状并相互连接, 20 h 即形成几乎充满整个视野的致密、复杂的网络状结构, 这与实验中发现 3~20 h 生物膜变链菌定植菌量逐渐增加相一致。胞外多糖的量随时间延长而增加的趋势提示胞外多糖可能是变链菌的黏附因子, 其对于生物膜的发展、形成和成熟起着重要作用。

研究发现, 胞外多糖中葡聚糖起主要的黏附作用^[16]。因此, 本实验采用蒽酮法进一步测定生物膜状态变链菌合成胞外多糖中葡聚糖的量: 发现在 3 h 时合成水不溶性葡聚糖能力最强, 这可能与生物膜形成早期需要大量水不溶性葡聚糖有关。水不溶性葡聚糖在细菌黏附过程中起重要作用, 其在生物膜形成早期起到类似黏接剂的作用^[17]。本研究发现, 593 号临床株的水不溶性葡聚糖合成能力明显强于标准株($P < 0.05$), 结合前期的研究结果即 593 号临床株的生物膜合成能力也明显强于标准株^[18], 因此推测合成水不溶性葡聚糖能力越强的菌株, 其形成生物膜的能力越强, 与文献^[17]报道一致。此假设也部分解释了 593 号菌株为何具有高致龋力。本研究结果还提示生物膜形成的早期阶段(如前 3 h)是

降低变链菌致龋力, 减少和防止龋病发生的最佳时间, 在此阶段可通过抑制水不溶性葡聚糖的合成, 减少变链菌生物膜的形成, 并影响其质量, 进而防龋。而在 12~24 h 时胞外多糖(葡聚糖)合成趋于稳定, 这说明当生物膜结构基本形成后, 胞外多糖的分泌量也趋于稳定, 此时主要起着骨架作用。

CLSM 和蒽酮法的测定结果均显示: 593 号临床株生物膜状态的合成胞外多糖能力均高于标准株($P < 0.05$)。同时, 实验中还发现 593 号临床株的定植菌量高于标准株, 这说明变链菌在生物膜中的定植可能与其胞外多糖合成能力存在一定的关系, 即胞外多糖合成能力越强, 变链菌越容易定植。分析其原因可能是因为高相对分子质量、多分支、黏性的胞外多糖可作为一种坚韧的三维支架, 其形成的网络状生物膜结构越致密, 生物膜厚度越大, 则生物膜结构越稳定^[19], 越有利于细菌在应激环境中生存^[20]和致龋, 同时可使其免受外部环境中一些不利因素, 如抗生素、抗体、表面活性剂、细菌的吞噬和外来物的掠食等危害^[21-22], 提示合成胞外多糖能力强的 593 号临床株的定植可能是导致宿主龋易感的原因之一。

本研究结果表明变链菌高致龋力临床株与标准株在合成胞外多糖能力上存在明显差异, 这有助于更好地理解此菌基因的复杂性和致龋毒力因子的特异性, 提示寻找可能存在的高致龋毒力特异基因或蛋白, 并针对其研发防龋疫苗等, 将具有更强的靶向性和效果, 为探寻更加有效地预测龋高危人群的方法提供思路。

[参 考 文 献]

- [1] Cappiello M G, Hantman M J, Zuccon F M, Peruzzi F, Amjad M, Piggot P J, et al. Physical and genetic map of *Streptococcus mutans* GS-5 and localization of five rRNA operons [J]. Oral Microbiol Immunol, 1999, 14: 225-232.
- [2] Ajdić D, McShan W M, McLaughlin R E, Savić G, Chang J, Carson M B, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 14434-14439.
- [3] 黄正蔚, 刘 正. 差异显示技术对变异链球菌生物膜基因表达差异的分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25: 777-780.
- [4] 徐蓉蓉, 葛剑平, 胡 涛, 岳松龄, 谭 红, 周学东. 不同生存状态下变形链球菌合成胞外多糖的研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2005, 21: 79-81.
- [5] 黄晓晶, 刘天佳, 陈 舟, 詹 玲, 杨锦波. 高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究 I 对唾液包被羟磷灰石的粘附实验[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18: 416-418.
- [6] 黄晓晶, 刘天佳, 杨锦波, 陈 舟, 刘建国. 高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究 II 合成细胞外多糖能力的实验研

- 究[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18: 419-421.
- [7] 黄晓晶, 刘天佳, 蔡志宇, 陈 舟, 杨锦波, 刘建国. 不同龋敏感者变形链球菌临床分离株产酸能力的研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35: 520-521.
- [8] 黄晓晶, 刘天佳, 蔡志宇, 杨锦波, 陈 舟, 刘建国. 变形链球菌体外耐酸能力的实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14: 427-429.
- [9] 黄晓晶, 刘天佳, 陈国弟, 辛军平, 陈 舟. 变形链球菌(血清型C)临床分离株 AP-PCR 基因分型[J]. 中华口腔医学杂志, 2001, 36: 281-284.
- [10] Yamashita Y, Tsukioka Y, Nakano Y, Shibata Y, Koga T. Molecular and genetic analysis of multiple changes in the levels of production of virulence factors in a subcultured variant of *Streptococcus mutans* [J]. FEMS Microbiol Lett, 1996, 144: 81-87.
- [11] Napimoga M H, Kamiya R U, Rosa R T, Rosa E A, Höfling J F, Mattos-Graner R O, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 7): 697-703.
- [12] Lembo F L, Longo P L, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues C R, Mayer M P. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children[J]. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22: 313-319.
- [13] Pieralisi F J, Rodrigues M R, Segura V G, Maciel S M, Ferreira F B, Garcia J E, et al. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active preschool children[J]. Int J Dent, 2010, 2010: 824976.
- [14] Habimana O, Meyrand M, Meylheuc T, Kulakauskas S, Briand R. Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes* [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 7814-7821.
- [15] Lal P, Sharma D, Pruthi P, Pruthi V. Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans* [J]. J Appl Microbiol, 2010, 109: 128-136.
- [16] Wen Z T, Suntharaligham P, Cvitkovitch D G, Burne R A. Trigger factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation[J]. Infect Immun, 2005, 73: 219-225.
- [17] Mattos-Graner R O, Smith D J, King W F, Mayer M P. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children [J]. J Dent Res, 2000, 79: 1371-1377.
- [18] 江 山. 变异链球菌生物膜致龋差异初步研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
- [19] Klein M I, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin A H, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development[J]. PLoS One, 2010, 5: e13478.
- [20] Xiao J, Koo H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms[J]. J Appl Microbiol, 2010, 108: 2103-2113.
- [21] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284: 1318-1322.
- [22] Liu Y, Wang L, Zhou X, Hu S, Zhang S, Wu H. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37: 33-38.

[本文编辑] 商素芳

· 消 息 ·

第七届长征脊柱外科学术论坛在沪举办

近日,由第二军医大学长征医院骨科、《脊柱外科杂志》主办的第七届长征脊柱外科学术论坛在沪举办,来自全国十几家顶级医院脊柱外科的著名专家以及国内 400 余位脊柱外科的教授参加了这次论坛。这次全国脊柱外科领域的高级盛会,探讨的主要内容以脊柱退变、创伤、肿瘤、矫形等疾患的外科治疗为主题,专家们总结了目前我国脊柱外科诊疗成绩及存在的问题,对一些新理论、新技术进行了前瞻性的探讨,同时对脊柱外科领域的热点问题进行了探讨。80 余位国内著名脊柱外科专家为大会作了精彩报告,展示了近年来国内外脊柱外科最新成果与进展,为广大脊柱外科医生切磋技艺、交流信息和总结经验提供了一个广阔的平台。

长征医院是我国最早开展颈椎手术的单位,目前,累计颈椎手术已达 23 000 余例,无论是颈椎手术例数、质量、还是效果上均达到全国先进水平。会议期间,长征医院脊柱外科展示的成就引起了专家的极大兴趣,专家们对此次会议意义和长征医院展示的成就给予了广泛赞誉。

此次全国性学术活动的举办,对于推动我国脊柱外科的研究与发展,推广和普及脊柱外科新技术起到了积极推动作用。