

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00885

木糖醇对口腔假丝酵母菌体外增殖及产酸的影响

郑艳¹, 邓旒², 康蕾¹, 李欣¹, 何祥一^{1*}, 车团结³

1. 兰州大学口腔医学院口腔医学研究所, 兰州 730000
2. 海南省人民医院口腔科, 海口 570311
3. 兰州大学生命科学院, 兰州 730000

[摘要] **目的** 初步研究木糖醇对口腔假丝酵母菌体外增殖及产酸的影响, 寻求新的预防口腔假丝酵母菌感染的方法。**方法** 对100例戴义齿患者的唾液样本进行假丝酵母菌的培养鉴定及分离纯化后, 观察4种常见致病性假丝酵母菌(白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌)在不同比例木糖醇替代葡萄糖(葡萄糖:木糖醇比例分别为4:1、3:2、2:3、1:4和0:5)沙氏培养液中的增殖和产酸情况, 了解木糖醇对不同假丝酵母菌生长增殖的抑制作用; 并在有氧和缺氧条件下, 比较白假丝酵母菌在含不同浓度(0%、5%、10%、15%、20%)的木糖醇培养液中培养6、12、24、48和72 h后木糖醇对白假丝酵母菌增殖与产酸抑制作用的差异。**结果** 与含葡萄糖和木糖醇的培养液相比, 仅含木糖醇的培养液中, 4种假丝酵母菌的 D_{600} 值均降低, 而pH值均升高($P < 0.05$)。与不含木糖醇的培养液相比, 在有氧条件下, 除含5%木糖醇48 h的pH值和 D_{600} 值、10%木糖醇48 h的 D_{600} 值、5%木糖醇72 h的 D_{600} 值变化不显著外, 其余各时间点含不同浓度木糖醇的白假丝酵母菌培养液 D_{600} 值均降低, pH值均升高($P < 0.05$), 而在缺氧条件下, 各时间点的白假丝酵母菌培养液 D_{600} 值均升高, pH值均降低($P < 0.05$)。**结论** 木糖醇对4种常见致病性假丝酵母菌的增殖和产酸都有明显的抑制作用, 提示木糖醇作为糖替代品和致病性假丝酵母菌抑制剂, 在口腔疾病的预防与保健中将发挥重要作用。

[关键词] 木糖醇; 假丝酵母属; 增殖; 产酸; 口腔保健

[中图分类号] R 780.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0885-05

In vitro effect of xylitol on proliferation and acid production of oral *Candida*

ZHENG Yan¹, DENG Ni², KANG Lei¹, LI Xin¹, HE Xiang-yi^{1*}, CHE Tuan-jie³

1. Department of Oral Medicine Research, School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China
2. Dental Department, The People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan, China
3. School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the *in vitro* effect of xylitol on the proliferation and acid production of oral *Candida*, and so as to explore new prophylaxis methods against oral fungal infection. **Methods** Pathogenic oral *Candida* were clinically harvested, cultured and purified in laboratory from the saliva of 100 patients wearing dentures. The proliferation and acid production of 4 types of commonly-seen *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*, were observed in Sabouraud's glucose medium, with glucose replaced by different concentrations of xylitol (ratios of glucose and xylitol being 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, and 0:5), so as to evaluate the inhibitory effect of xylitol on the growth of different kinds of *Candida*. At the same time, the proliferation and acid production of *C. albicans* were compared when cultured with different concentrations (5%, 10%, 15%, and 20%) of xylitol (experimental groups) for 6, 12, 24, 48, and 72 h under aerobic and anoxic conditions. **Results** The D_{600} values of four kinds of *Candida* in pure xylitol culture media were significantly lower and pH values were significantly higher compared with those in the glucose combined with xylitol culture media ($P < 0.05$). Under aerobic condition, compared with the group without xylitol, the pH values in the experimental groups with

[收稿日期] 2013-04-04 **[接受日期]** 2013-05-06

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项基金(lzujbky-2010-142), 兰州大学学生创新创业行动计划项目(2011511), 兰州大学口腔医学扶持基金[20121218(12)0653]. Supported by Fundamental Research Funds for the Central Universities (lzujbky-2010-142), Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Lanzhou University (2011511), and Supporting Funds for Oral Medicine of Lanzhou University (20121218[12]0653).

[作者简介] 郑艳, 硕士, 讲师. E-mail: zhengyan618@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0931-8915051, E-mail: xiangyihe@aliyun.com

different concentrations of xylitol were significantly higher and the D_{600} values were significantly lower ($P < 0.05$), except for the D_{600} values at 48 and 72 h with 5% xylitol, D_{600} value at 48 h with 10% xylitol, and pH value at 48 h with 5% xylitol. Under anoxic condition, D_{600} values were all significantly increased and the pH values were all significantly decreased at all time points in the experimental groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Xylitol can significantly inhibit the proliferation and acid production of the four common *Candida* species, suggesting that xylitol may serve as a substitute of sugar and inhibitor of pathogenic *Candida* and may play an important role in preventing and controlling oral infections of pathogenic *Candida*.

[Key words] xylitol; *Candida*; proliferation; acid production; oral health

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8): 885-889]

假丝酵母菌(*Candida*)在口腔中的定殖可以表现为无临床症状的健康带菌者或有临床体征的口腔假丝酵母菌病患者。近年来假丝酵母菌引起的感染病例不断增多,其中白假丝酵母菌(*Candida albicans*, *C. albicans*)的感染率最高、致病性最强^[1]。研究发现,pH值为3.0~8.0时有利于假丝酵母菌的生长与增殖,而假丝酵母菌在生长、增殖过程中可分解培养液中的碳水化合物产生酸和二氧化碳(CO_2),酸性环境又促进假丝酵母菌的定殖与发育^[2]。对于假丝酵母菌感染的治疗,临床上使用两性霉素B及制霉菌素等抗生素以及咪唑类药物,但这些药物停药后的复发率高,过久应用则可能引起严重的不良反应^[3]。由于误诊、药物耐受或者患者的免疫功能低下,侵入性的假丝酵母菌感染致死的现象逐渐增多,因此寻求新的预防真菌感染的方法变得非常迫切。

木糖醇作为一种天然五碳糖醇,是非致龋性的糖代替品,已有研究表明,木糖醇能够显著减少口腔假丝酵母菌代谢生成乙醛并且对口腔细菌的产酸有抑制作用^[4-5]。木糖醇也能有效地减少白假丝酵母菌的黏附力,并且白假丝酵母菌在体外形成菌丝与局部缺氧环境或 CO_2 分压过高密切相关^[6]。目前有关木糖醇对口腔致病性真菌生长增殖和产酸的作用鲜有报道。本研究旨在初步研究木糖醇对白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌(*Candida tropicalis*)、光滑假丝酵母菌(*Candida glabrata*)和克柔假丝酵母菌(*Candida krusei*)等4种口腔致病性假丝酵母菌增殖及产酸的影响,探索木糖醇在口腔假丝酵母菌病防治方面的可能作用,为临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 木糖醇(上海江莱生物科技有限公司), TE-Triton X-100 裂解液(上海抚生实业有限公司), PCR 试剂[*Taq* 酶、 $10\times$ buffer、dNTP 混合物(上海艺莎生物科技有限公司), 引物(上海生

工生物工程技术有限公司合成)], CHROMagar 假丝酵母菌显色培养基(法国 CHROMagar 公司), PCR 仪(MG96+型,杭州朗基科学仪器有限公司), 电泳仪(DYY-8c型,北京市六一仪器厂), 电子恒温培养箱(DNP-9162型,上海精宏实验设备有限公司), 实验室台式 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), 微需氧产气袋(日本三菱公司)。

1.2 采样方法 2007年8月至11月间,于兰州大学口腔医院用棉拭子法采集100例戴义齿患者的唾液(本研究得到兰州大学口腔医学院伦理委员会批准)。将取样后的棉拭子置于无菌生理盐水中,立即送实验室培养、分离、鉴定。

1.3 菌种培养与鉴定 将收集的样本以 $1\ 776\times g$ 离心10 min后去除上清液,再用1 mL 0.1 mol/L PBS (pH 7.2)垂悬。吸取50 μL 混悬液用推板法接种于 CHROMagar 假丝酵母菌显色培养基上,根据培养基使用说明,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h。参照我们前期研究^[1]的方法对假丝酵母菌进行 PCR 鉴定,阳性对照均采用4种国际标准菌株(白假丝酵母菌 CCUG32723、热带假丝酵母菌 ATCC750、光滑假丝酵母菌 ATCC90030、克柔假丝酵母菌 ATCC6258,由芬兰赫尔辛基大学惠赠),阴性对照采用灭菌的 PBS。

1.4 菌体分离、纯化 假丝酵母菌在 CHROMagar 培养基上传代3次,以分离、纯化。挑取在 CHROMagar 显色培养平板培养纯化的单菌落接种于3 mL 沙氏培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 48 h。

1.5 木糖醇部分或全部替代葡萄糖培养实验 用木糖醇逐步替代沙氏培养液中的葡萄糖,制备5种不同的培养液。1~5号培养液的葡萄糖:木糖醇比例分别为4:1、3:2、2:3、1:4和0:5。在每种培养液中以1:100的比例分别加入4种假丝酵母菌,根据预实验,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 48 h,测试 D_{600} 值和 pH 值。设2个平行组,实验重复5次。

1.6 白假丝酵母菌在含不同浓度木糖醇培养液中

的有氧及缺氧培养实验 将白假丝酵母菌菌液以 1 : 100 的比例接种于含有 0 (对照组)、5%、10%、15%、20% 木糖醇的沙氏培养液中, 分别于有氧 (空气中, 含 21% O₂、0.03% CO₂) 和缺氧 (微需氧产气袋, O₂、CO₂ 浓度均为 10% 左右) 条件下 37℃ 振荡培养。在 6、12、24、48 和 72 h 分别检测菌液的 D₆₀₀ 值和 pH 值。设 2 个平行组, 实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件包对实验数据进行统计学分析, 完全随机设计的多个样本间均数的比较采用单因素方差分析, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 假丝酵母菌的鉴定结果 37℃ 培养 48 h 后, CHROMagar 假丝酵母菌显色培养基上分离的显色菌株白假丝酵母菌显绿色、热带假丝酵母菌显蓝绿色、光滑假丝酵母菌显紫色、克柔假丝酵母菌显粉色 (图 1)。

2.2 木糖醇部分或全部替代葡萄糖培养结果 应用含 5 种不同比例木糖醇和葡萄糖的假丝酵母菌培养液分别对 4 种假丝酵母菌进行培养, 结果 (表 1) 发现与 1~4 号培养液相比, 只含木糖醇的 5 号培养液中 4 种菌的 D₆₀₀ 值降低 (P<0.05)、pH 值升高 (P<0.05)。与 1~3 号培养液相比, 木糖醇含量较高的 4 号培养液中白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌和光滑假丝酵母菌的 pH 值升高 (P<0.05)。



图 1 CHROMagar 假丝酵母菌显色培养基克隆化培养 48 h 结果

Fig 1 48 h cloning culture results in CHROMagar *Candida* media

Candida albicans (green), *Candida tropicalis* (blue green), *Candida glabrata* (purple), *Candida krusei* (pink), unknown *Candida* (white). Scale: 10 mm/square

2.3 有氧及缺氧条件下白假丝酵母菌不同浓度木糖醇培养液的 pH 值和 D₆₀₀ 值的变化 有氧条件下, 白假丝酵母菌的培养液, 除含 5% 木糖醇 48 h 的 pH 值, 5%、10% 木糖醇 48 h 的 D₆₀₀ 值, 5% 木糖醇 72 h 的 D₆₀₀ 值与未加木糖醇的对照组比较差异无统计学意义外, 其余各时间点含不同浓度木糖醇的培养液 pH 值均高于未加入木糖醇的对照组, 而 D₆₀₀ 值均低于对照组 (P<0.05)。缺氧条件下, 各时间点不同浓度木糖醇的白假丝酵母菌培养液 pH 值均低于对照组, 而 D₆₀₀ 值均高于对照组 (P<0.05)。见图 2。

表 1 4 种假丝酵母菌不同培养液 D₆₀₀ 值和 pH 值变化

Tab 1 D₆₀₀ and pH values in culture media of four kinds of *Candida*

n=5, $\bar{x} \pm s$

Culture media		<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
No. 1	pH	3.022±0.085	4.028±0.174	3.888±0.157	3.760±0.330
	D ₆₀₀	1.668±0.074	1.662±0.168	1.584±0.129	1.518±0.224
No. 2	pH	2.924±0.062	3.542±0.090	3.932±0.185	4.082±0.308
	D ₆₀₀	1.671±0.037	1.849±0.198	1.497±0.163	1.367±0.135
No. 3	pH	2.994±0.077	3.908±0.210	4.056±0.288	3.912±0.286
	D ₆₀₀	1.724±0.056	1.631±0.190	1.568±0.039	1.570±0.173
No. 4	pH	3.670±0.071 [△]	4.142±0.154 [△]	4.412±0.309 [△]	3.994±0.356
	D ₆₀₀	1.671±0.030	1.637±0.134	1.594±0.098	1.535±0.157
No. 5	pH	5.566±0.110*	5.364±0.184*	5.418±0.119*	5.240±0.029*
	D ₆₀₀	0.762±0.321*	0.184±0.186*	0.849±0.165*	0.974±0.263*

No. 1-5 culture media with ratios of glucose and xylital being 4 : 1, 3 : 2, 2 : 3, 1 : 4, and 0 : 5. *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. krusei*: *Candida krusei*. * P<0.05 vs No. 1-4 culture media; [△] P<0.05 vs No. 1-3 culture media

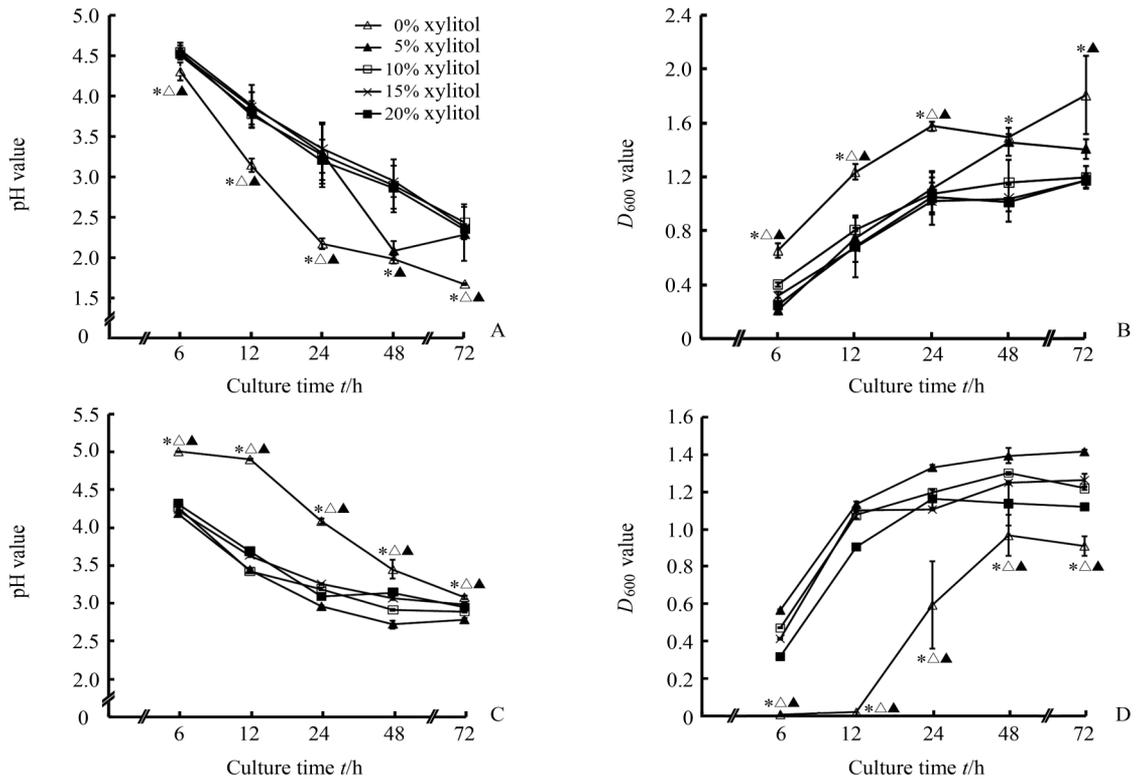


图2 有氧(A、B)及缺氧(C、D)条件下白假丝酵母菌各时间点不同浓度木糖醇培养液 pH 值和 D_{600} 值变化

Fig 2 pH and D_{600} values of *Candida albicans* in culture media containing different concentrations of xylitol at different time points under aerobic (A,B) and anoxic (C,D) conditions

* $P < 0.05$ vs 15% and 20% xylitol; $\Delta P < 0.05$ vs 5% xylitol; $\blacktriangle P < 0.05$ vs 10% xylitol. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

近年来,大剂量的抗生素、免疫抑制剂和激素的广泛应用使得真菌感染迅速增加,假丝酵母菌属已成为最常见的机会性感染病原菌,其菌血症的死亡率高达40%~60%^[7]。其中,白假丝酵母菌比例最高,致病性强,且能诱导体内某些正常细胞增殖^[8]。这可能与白假丝酵母菌对宿主细胞有很强的黏附性,且机体对真菌孢子发芽后的吞噬率和杀灭率均大为降低,特别是当菌丝 $> 20 \mu\text{m}$ 时根本不能被吞噬有关。Pizzo等^[9]研究显示碳水化合物的常规代谢产物如蔗糖、葡萄糖、麦芽糖或果糖可能是口腔假丝酵母菌病的一类危险因素,在蔗糖中生长的白假丝酵母菌的黏附作用增加最强,而热带假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌在葡萄糖中黏附力增长最快。Land等^[10]认为白假丝酵母菌在含少量葡萄糖的培养液中会转换成菌丝相。这些研究说明假丝酵母菌具有分解碳水化合物的代谢产物葡萄糖和蔗糖的作用,分解过程中会产酸,且对上皮组织造成一定的损害,同时,在葡萄糖和蔗糖作用下,假丝酵母菌的黏附力会增强,增强了假丝酵母菌的致病性。

木糖醇是从植物中提取出来的一种天然甜味剂,也是正常人体糖类代谢的中间体,不能被产酸菌发酵,长期摄入不会引起龋齿。有研究表明,经常食用酸性食物会增加口腔假丝酵母菌感染的风险^[11],但含漱木糖醇溶液后,牙面菌斑 pH 值不会降低^[12]。本研究采用木糖醇逐步替代培养液中的葡萄糖,观察假丝酵母菌在含有不同浓度木糖醇的培养液中与只含木糖醇的培养液中的 D_{600} 值和 pH 值的变化。结果显示含木糖醇培养液内4种假丝酵母菌的增殖下降。说明木糖醇不能为假丝酵母菌生长提供营养来源,假丝酵母菌的生长增殖受到明显的抑制。随着木糖醇替代葡萄糖的比例增大,培养液的 pH 值升高,说明木糖醇可以抑制假丝酵母菌的糖代谢产酸水平。

全球多中心监测统计资料表明,在系统性真菌感染病例中,白假丝酵母菌感染占43%~75%^[13]。酵母菌是兼性厌氧菌,在有氧和缺氧的环境中都能生长,本研究对白假丝酵母菌分别在有氧和缺氧环境中进行培养,以观察不同氧环境下木糖醇的抑菌效果。结果显示,在有氧条件下,与不含木糖醇的培养液相比,除含5%木糖醇的培养液培养48h的 pH 值和 D_{600} 值变化不显著之外,其他各时间点含不同

浓度木糖醇的沙氏培养液 pH 值均升高($P < 0.05$), 而 D_{600} 值均降低($P < 0.05$)。这说明在有氧条件下,木糖醇可以有效抑制白假丝酵母菌利用培养液中的葡萄糖进行增殖和产酸的能力。含 5% 木糖醇的培养液培养 48 h 的 pH 值和 D_{600} 值、5% 木糖醇的培养液培养 72 h 的 D_{600} 值、含 10% 木糖醇的培养液培养 48 h 的 D_{600} 值变化不显著,说明在有氧条件下,只有木糖醇达到一定浓度才能有效抑制白假丝酵母菌的增殖和产酸。在缺氧条件下,结果与有氧条件相反,说明在缺氧条件下,木糖醇溶液无论浓度如何,均不能有效发挥抑制白假丝酵母菌利用葡萄糖进行增殖和产酸的作用。此现象可能与白假丝酵母菌特殊的呼吸代谢方式有关。研究表明,缺氧发酵酵母样真菌,如白假丝酵母菌、产脲假丝酵母菌(*Candida utilis*)、近平滑假丝酵母菌(*Candida parapsilosis*)、耶罗威亚解脂酵母菌(*Candida lipolytica*)等^[14-15]存在一种抗氰呼吸(cyanide-resistant respiration, CRR)方式。这种呼吸方式可调节真菌细胞能量代谢,并可降低细胞内活性氧的生成,以适应环境条件的改变,增强真菌适应各种环境胁迫的能力。白假丝酵母菌线粒体氧化呼吸功能会在不同的氧环境下发生改变,耐药子代的线粒体氧化呼吸功能减弱,代偿性加强细胞质内糖酵解、乙醛酸循环等代谢途径以供能,从而使氟康唑不能有效促进其内源性活性氧升高,使其对氟康唑的敏感性下降^[16]。白假丝酵母菌适应氧化刺激的机制与真菌耐药性产生有关,因此备受学界关注。

总之,木糖醇对 4 种口腔致病性假丝酵母菌的增殖和产酸都有明显的抑制作用。在有氧条件下,一定浓度的木糖醇溶液对白假丝酵母菌的增殖及产酸都有显著的抑制作用;而在缺氧条件下,这种作用不明显。木糖醇作为糖替代品和假丝酵母菌抑制剂,在口腔疾病的预防和保健中将发挥重要的作用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 郑艳,栗震亚,何祥一,曹宝成.固定矫治器对青少年口腔念珠菌菌群的影响[J].实用口腔医学杂志,2008,24:401-405.

[2] 许力强,金辰,二川浩树,浜田泰三,白雪芹,高武.白色念珠菌在义齿软衬材料表面上发育的研究[J].现代口腔医学杂志,2000,14:394-396.

[3] Cornely O A, Ullmann A J, Karthaus M. Evidence-based assessment of primary antifungal prophylaxis in

patients with hematologic malignancies [J]. Blood, 2003,101:3365-3372.

[4] Uittamo J, Nieminen M T, Kaihovaara P, Bowyer P, Salaspuro M, Rautemaa R. Xylitol inhibits carcinogenic acetaldehyde production by *Candida* species [J]. Int J Cancer, 2011, 129:2038-2041.

[5] Sengun A, Sari Z, Ramoglu S I, Malko S, Duran I. Evaluation of the dental plaque pH recovery effect of a xylitol lozenge on patients with fixed orthodontic appliances [J]. Angle Orthod, 2004, 74:240-244.

[6] Carvalhinho S, Costa A M, Coelho A C, Martins E, Sampaio A. Susceptibilities of *Candida albicans* mouth isolates to antifungal agents, essential oils and mouth rinses [J]. Mycopathologia, 2012, 174:69-76.

[7] Edwards J E Jr, Bodey G P, Bowden R A, Büchner T, de Pauw B E, Filler S G, et al. International Conference for the Development of a Consensus on the Management and Prevention of Severe Candidal Infections [J]. Clin Infect Dis, 1997, 25:43-59.

[8] 张琳,车团结,史晓艳,何祥一.白假丝酵母菌对人脐静脉内皮细胞株 ECV304 细胞增殖的诱导作用 [J]. 华西口腔医学杂志, 2011, 29:289-293.

[9] Pizzo G, Giuliana G, Milici M E, Giangreco R. Effect of dietary carbohydrates on the *in vitro* epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* [J]. New Microbiol, 2000, 23:63-71.

[10] Land G A, McDonald W C, Stjernholm R L, Friedman L. Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: changes in respiratory activity of *Candida albicans* during filamentation [J]. Infect Immun, 1975, 12:119-127.

[11] Meurman J H. Functional foods/ingredients and oral mucosal diseases [J]. Eur J Nutr, 2012, 51 (Suppl 2): 31-38.

[12] Neff D. Acid production from different carbohydrate sources in human plaque *in situ* [J]. Caries Res, 1967, 1:78-87.

[13] Snyderman D R. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections [J]. Chest, 2003, 123 (5 Suppl): 500S-503S.

[14] Helmerhorst E J, Murphy M P, Troxler R F, Oppenheim F G. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans* [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1556:73-80.

[15] Milani G, Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart C M, Schreiber A Z, Vercesi A E, Sluse F E. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways [J]. FEBS Lett, 2001, 508:231-235.

[16] Ikner A, Shiozaki K. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response [J]. Mutat Res, 2005, 569 (1-2):13-27.