甜茶甙对口腔变异链球菌生长及致龋性影响的实验研究

杨淑银，岳二丽，郭留云，陆珂，杨梦宇

郑州大学第一附属医院牙周科，河南 郑州 450052

［摘要］**目的：**探讨甜茶甙对口腔变异链球菌（*S.mutans*）生长及致龋性的影响，为龋齿的防治提供新思路。**方法：***S.mutans*被处理后于恒温厌氧环境下培养，检测菌液OD值筛选最小抑菌浓度（MIC），并确定0.625、1.25、2.5、5 mg/mL为工作浓度。检测工作浓度下甜茶苷和木糖醇培养*S.mutans*菌液pH、疏水率、黏附力、水不溶性多聚糖（WIG）合成力及葡萄糖基转移酶（GTF）活性指标——总蛋白含量、还原糖量、GTF酶活力及比活力，并比较分析。**结果：**甜茶甙≥0.625 mg/mL时可明显抑制*S.mutans*菌的生长，其MIC为10 mg/mL；与木糖醇组及对照组相比，加入甜茶甙后*S.mutans*的产酸、黏附力、疏水率及WIG、还原糖量、GTF酶活力、比活力均降低，总蛋白含量增高（$P<0.05$），且均具有浓度依懒性。与对照组相比，木糖醇组仅在浓度≥2.5 mg/mL时对*S.mutans*的疏水率、黏附力及WIG、还原糖量、酶活力、比活力有明显抑制作用（$P<0.05$），但对产酸能力和总蛋白含量无明显影响（$P>0.05$）。**结论：**甜茶甙可有效抑制*S.mutans*的生长、产酸、黏附、WIG合成及GTF活性等致龋特性，其与浓度相关，同浓度下效果优于木糖醇。

［关键词］变异链球菌；甜茶甙；木糖醇；致龋性；葡萄糖基转移酶

［中图分类号］R781.1 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）07-0009-06

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.07.002

Experimental Study on the Effect of Rubusoside on the Growth and Cariogenicity Induced by Streptococcus Mutans

YANG Shuyin, YUE Erli, GUO Liuyun, LU Ke, YANG Mengyu

Abstract: Objective: To investigate the effects of rubusoside on the growth and cariogenicity of streptococcus mutans (*S.mutans*), and to provide a new idea for the prevention and treatment of dental caries. **Methods:** *S.mutans* was treated and cultured in a constant temperature and anaerobic environment, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the OD value of bacterial solution, and 0.625, 1.25, 2.5 and 5 mg/mL were determined as working concentrations. pH, hydrophobicity, adhesion, biosynthesis of water-insoluble polysaccharide (WIG) and glucosyltransferase (GTF) activity indexes including total protein content, reducing sugar content, GTF activity and specific activity of *S.mutans* cultured with rubusoside or xylitol at working concentration were detected and compared. **Results:** The growth of *S.mutans* was significantly inhibited by rubusoside at concentration≥0.625 mg/mL, and its MIC was 10 mg/mL. Compared with the control group and xylitol group, acid production, hydrophobicity, adhesion, WIG, reducing sugar content, GTF activity and specific activity of *S.mutans* were decreased after addition of rubusoside, and the total protein content was increased($P<0.05$). Compared with the control group, xylitol group had obvious inhibitory effects on hydrophobic rate, adhesion and WIG, reducing sugar

［收稿日期］2022-11-26
［修回日期］2023-01-18
［基金项目］河南省高等学校重点科研计划项目（20B320053）
［作者简介］杨淑银（1983-），男，主治医师，E-mail：ssyuyy@126.com。
［通信作者］郭留云（1964-），女，主任医师，E-mail：gyylys@126.com。

content，enzyme activity and specific activity of *S.mutans* only when the concentration was ⩾ 2.5 mg/mL ($P<0.05$)，but had no significant effects on acid-producing capacity and total protein content ($P>0.05$). **Conclusion**：Rubusoside can effectively inhibit the growth，acid production，adhesion，WIG synthesis and GTF activity of *S.mutans*，which is better than xylitol at the same concentration.

Keywords：Streptococcus mutans；Rubusoside；Xylitol；Cariogenicity；Glucosyltransferase

变异链球菌(*S.mutans*)是目前公认的最主要口腔致龋菌，其致龋机制多与产酸、黏附和代谢过程密切相关[1]。因此，干扰 *S.mutans* 生长、降低其产酸、黏附、水不溶性多聚糖(WIG)合成能力及葡萄糖糖基转移酶(GTF)活性是预防龋齿的关键手段之一。近年来，研究发现部分天然甜味剂对 *S.mutans* 具有一定抑菌作用，如麦芽糖醇、赤藓糖醇以及木糖醇等，为龋齿预防提供了新的思路[2-3]。其中，木糖醇目前被认为是甜味剂中防龋特性最好的一种，已被证实可有效抑制 *S.mutans* 生长和代谢，主要通过破坏 *S.mutans* 的生物膜结构促使其产酸、黏附能力、定值能力降低，减少菌群数量，从而减弱其致龋性[4-5]。木糖醇仅能达到抑制 *S.mutans* 生长但无法杀灭，因而需要长期连续使用，一旦间断则会造成 *S.mutans* 生长活力的反弹，因而防龋效果也有待提高。甜茶甙是从中药材甜茶中提取出的一种二萜糖体，属于天然高效甜味剂，具有抗菌、抗炎、调节血糖及血脂等作用，少部分研究报道甜茶甙可明显降低口腔 *S.mutans* 总蛋白含量和 GTF 活力，有效抑制 *S.mutans* 的生长，且可以削弱其产酸、黏附等致龋能力[6-7]，但目前尚缺乏大量的研究证实，尤其是与木糖醇相比是否具有明显的优势？至今未有明确结论。因此，本研究进一步明确甜茶甙对口腔 *S.mutans* 的生长抑制作用，拟通过比较其与木糖醇对 *S.mutans* 致龋性的影响差异，为龋病的防治和药物开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料 *S.mutans*(ATCC 25175)购自上海酶研生物科技有限公司。甜茶甙(纯度≥98%)购自成都曼思特生物科技有限公司，木糖醇(纯度＞99%，北京索莱宝科技有限公司)；脑心浸液肉汤(BHI)培养基(固体和液体)、硫酸铵、蒽酮、考马斯亮蓝(北京索莱宝生物有限公司)。

1.2 *S.mutans* 培养与分组 将冻存的 *S.mutans* 接种于 BHI 固体琼脂培养基上，80% N_2、10% H_2、10% CO_2及 37 ℃厌氧培养 24 h，挑取单菌落于 BHI 琼脂板上划线，相同条件下培养 24 h，观察细菌形态、大小等，确认 *S.mutans* 纯度。之后挑取单菌落接种于 BHI 液体培养基中培养 24 h，收集细菌，紫外分光光度计测 600 nm 处的光密度值(OD)，计算细菌浓度，并用 BHI 培养液调整菌悬液浓度为 1×10^7 CFU/mL，备用。按 1∶10 将细菌悬液接种于试管中，分别加入终浓度为 0、0.313、0.625、1.25、2.5、5、10、20 mg/mL 的经 BHI 稀释的甜茶甙培养 24 h 检测 *S.mutans* 生长变化情况，并根据结果选取 *S.mutans* 的工作浓度。按每管 1 mL 菌液将细菌分为对照组、空白组、木糖醇组和甜茶甙组，其中甜茶甙组和木糖醇组分别加入 0.625、1.25、2.5、5 mg/mL 甜茶甙或木糖醇，对照组加入等体积的 BHI 溶液；空白组常规培养。每组设置 5 个平行管。

1.3 *S.mutans* 产酸能力检测 调整上述各组细胞 pH=7.04 后，置于 37 ℃及 80% N_2、10% H_2、10% CO_2的厌氧条件下培养 24 h，室温离心，取上清，用 pH 计测量各组上清液 pH 值，实验重复 3 次，求平均值，计算 pH 值变化量(△pH)=$pH_{0\,h}-pH_{24\,h}$。

1.4 碳氢化合法检测 *S.mutans* 表面疏水率 分别取 5mL PUM 缓冲液($K_2HPO_4\cdot3H_2O$ 22.2 g+KH_2PO_4 7.26 g+尿素 1.8 g+$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.2 g，蒸馏水定容 1 L，pH=7.1)加入各组菌液中，混匀后 37 ℃水浴箱 15 min，取各组混合液 5 mL 于新试管中，滴加十六烷，超声震荡 15 s，室温静置，待水油充分分层，弃油层。紫外分光光度计检测 660 nm 处吸光度(A 值)，重复 3 次求平均值，计算 *S.mutans* 表面疏水率=($A_{加入十六烷后}-A_{加入十六烷前}$)/$A_{加入十六烷后}$。

1.5 *S.mutans* 黏附力检测 将各组菌液试管呈 30°水平放置于厌氧环境中(37 ℃及 80% N_2、10% H_2、10% CO_2)培养 48 h，弃菌液，NaOH 溶液洗脱黏附在

试管壁上的 *S.mutans*，2 500 r/min 离心 15 min（离心半径 13.5 cm），收集细菌，并加入 0.9%氯化钠溶液混匀，测定 540 nm 处 A 值，重复 3 次，求平均值，计算黏附抑制率=1−$A_{实验组}/A_{空白组}$。

1.6　GTF 活性及 WIG 含量测定　取各组培养 48 h 的菌液，室温离心，收集上清，并加入硫酸铵，4 ℃过夜，之后离心弃上清，加入 PBS 透析至无氨气检出，室温离心得游离型 GTF 粗酶，采用考马斯亮蓝法检测总蛋白含量。另取各组 GTF 粗酶与含 5%体积蔗糖的 PBS 缓冲液混匀，置于 37 ℃厌氧环境中培养 1 h 后迅速放入 100 ℃水浴中 10～15 min 终止反应，加入双蒸水，室温离心。蒽酮法测定各组沉淀物中 WIG 含量，DNS 法测定上清液中还原糖含量，计算酶活力（GTF 活力单位定义为标准条件下反应 1 h，每分钟从蔗糖释放 1 μmol 还原糖所需的酶量），沉淀物暂存于 4 ℃冰箱中待检。酶比活力=酶活力/总蛋白量。

1.7　统计学方法　以上获得数据录入 EXCEL 并汇总，用 SPSS21.0 软件所得数据进行分析。所有数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两独立样本间检验采用 t 检验，单因素方差分析检验多组间差异性。以 $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2　结果

2.1　甜茶甙对 *S.mutans* 的生长的影响　不同甜茶甙浓度分别培养 24 h 后 *S.mutans* 的生长情况见图 1。*S.mutans* 混悬液 $OD_{600\ nm}$ 值随甜茶甙浓度的增加而逐渐降低，其中，0.313 mg/mL 与 0 mg/mL 比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），0.625 mg/mL 的 $OD_{600\ nm}$ 明显低于 0 mg/mL 时（t=3.172，P=0.034），提示甜茶甙浓度≥0.625 mg/mL 对 *S.mutans* 生长具有明显的抑制作用。10、20、40 mg/mL 时菌液均呈透明清亮、无沉淀，三者 $OD_{600\ nm}$ 比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），提示甜茶甙对 *S.mutans* 的最小抑菌浓度（MIC）约为 10 mg/mL，50%MIC 为 5 mg/mL。因此，本研究选择 0.625、1.25、2.5、5 mg/mL 浓度进行后续实验。

2.2　各组 *S.mutans* 产酸能力比较　见图 2。不同浓度的木糖醇和甜茶甙作用 *S.mutans* 24 h 后，菌液 pH 值均出现不同程度的下降，且甜茶甙组△pH 明显低于木糖醇组及对照组（$P<0.05$），但木糖醇组与对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。甜茶甙组内△pH 比较，与 0.625 mg/mL 组相比，1.25、2.5、5 mg/mL 组明显降低（$P<0.05$）；与 1.25mg/mL 组比较，2.5 mg/mL 和 5 mg/mL 组降低（$P<0.05$），且 2.5 mg/mL 和 5 mg/mL 组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

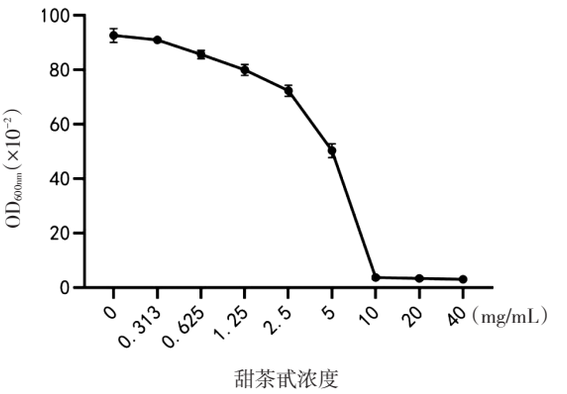
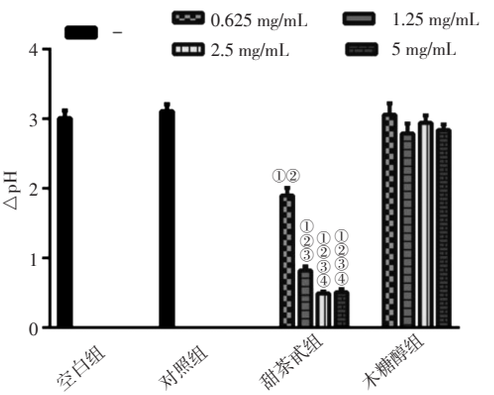


图 1　不同浓度的甜茶甙对 *S.mutans* 混悬液 OD 值变化情况



注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与同浓度木糖醇组比较，$P<0.05$；③与甜茶甙 0.625 mg/mL 组比较，$P<0.05$；④与甜茶甙 1.25 mg/mL 组比较，$P<0.05$

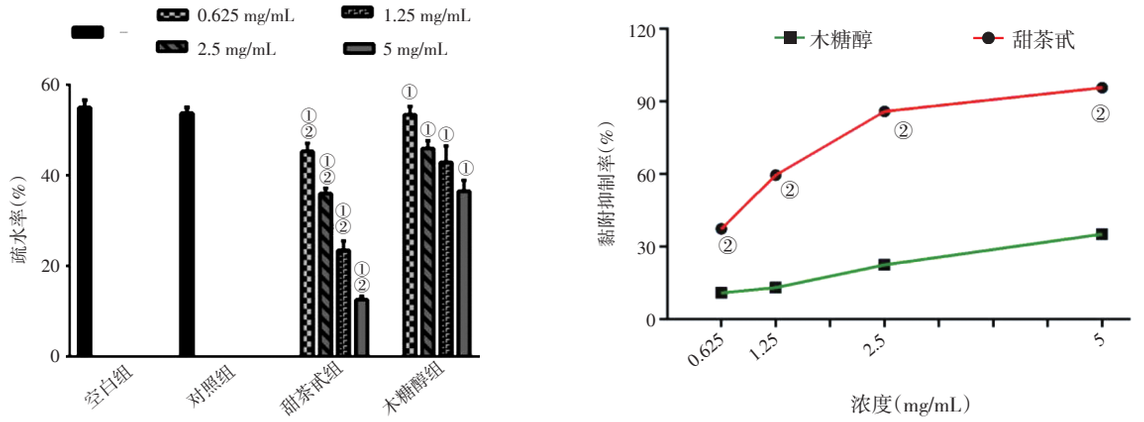
图 2　各组 *S.mutans* 产酸能力比较

2.3　*S.mutans* 表面疏水率及黏附抑制率比较　见图 3。甜茶甙组、木糖醇组 *S.mutans* 表面疏水率均随其浓度的增加不断下降，黏附抑制率不断升高。与对照组比较，甜茶甙组和木糖醇组疏水率均明显降低（$P<0.05$）；与同浓度木糖醇组比较，甜茶甙组疏水率降低，黏附抑制率升高（$P<0.05$）。

2.4　各组 *S.mutans* WIG 含量比较　见图 4。甜茶甙组及木糖醇组 *S.mutans* WIG 含量均随其浓度的增加不断下降，组间比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与对照组相比，2.5、5 mg/mL 木糖醇组和 1.25、2.5、5 mg/mL 甜茶甙组 WIG 含量均降低（$P<0.05$）；与木糖醇组比较，甜茶甙组各同等浓度下 WIG

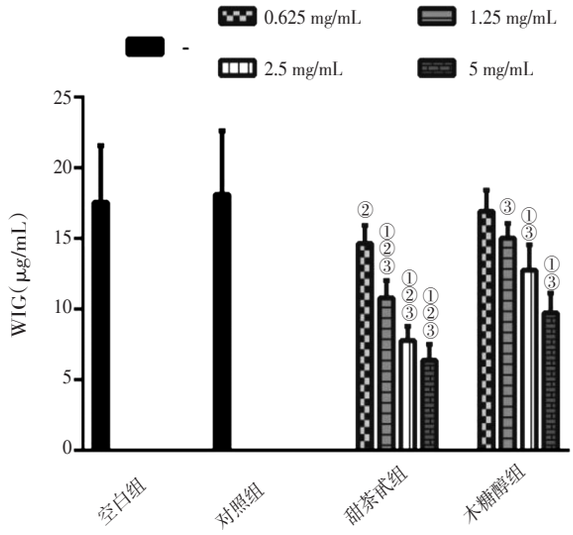
含量均明显降低（$P<0.05$），且具有剂量依赖性。

2.5　各组 *S.mutans* 总蛋白、还原糖、GTF 酶活力及比活力比较　见图 5。与对照组相比，2.5、5 mg/mL 木糖醇组和各浓度甜茶甙组还原糖量、酶活力及比活力均显著降低（$P<0.05$），甜茶甙组各浓度下总蛋白均升高（$P<0.05$）；与同浓度木糖醇组相比，甜茶甙组以上各指标改变更明显（$P<0.05$），且具有剂量依赖性。



注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与同浓度木糖醇组比较，$P<0.05$

图 3　*S.mutans* 表面疏水率及黏附抑制率比较



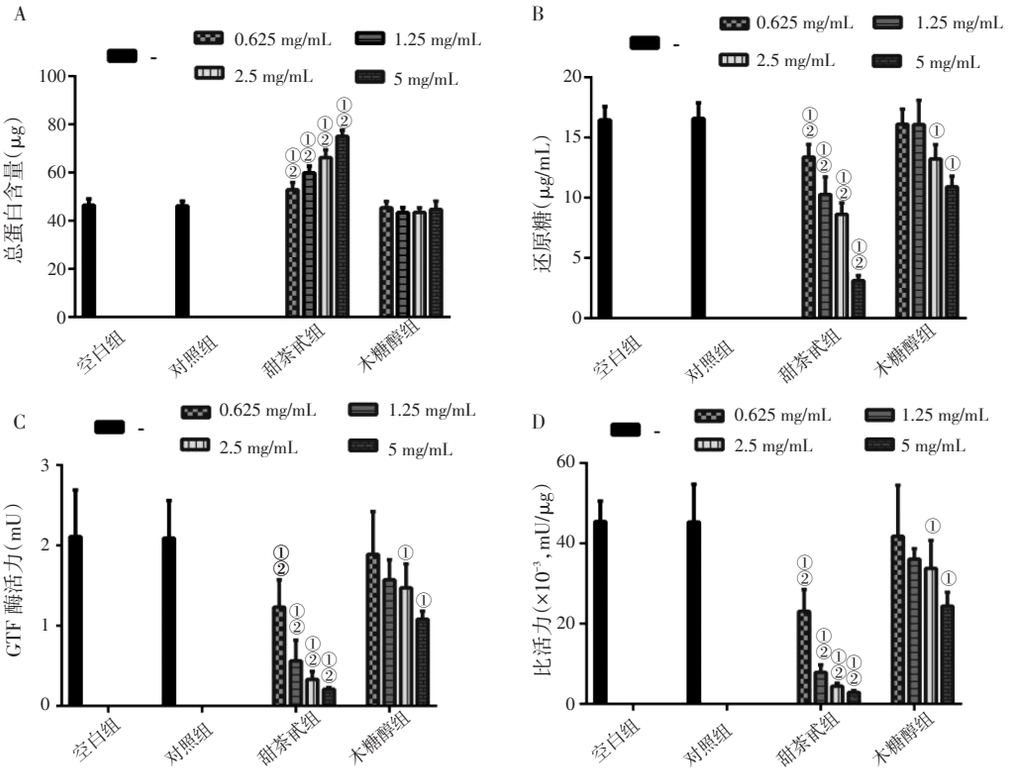
注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与同浓度木糖醇组比较，$P<0.05$；③与本组前一浓度比较，$P<0.05$

图 4　各组 *S.mutans* WIG 含量比较

3　讨论

S.mutans 是公认的主要致龋菌，致龋性主要表现在对表面的黏附能力、自身合成细胞多糖的能力以及产酸耐酸能力。*S.mutans* 一方面通过直接与牙齿黏附形成生物膜，在短时间内发酵食物残渍、产酸腐蚀牙齿表面，致使牙齿内矿物质溶解流失。另一方面代谢产生大量 GTF 促进 WIG 合成，介导细菌聚集定植于牙齿表面，进一步促进病菌黏附，形成牙菌斑覆盖于牙表层阻止酸性物质扩散，促使龋齿发生和进展[8]。少数研究表明合适浓度的甜茶甙可有效抑制 *S.mutans* 的生长，减轻其致龋性，但效果评价不够全面[9-10]。因此，本研究通过体外培养 *S.mutans* 探讨甜茶甙对其生长和致龋特性的具体影响。实验结果显示甜茶甙对 *S.mutans* 生长的 MIC 约为 10 mg/mL，当浓度≥0.625 mg/mL 时已具备明显的抑菌效果。既往研究发现在微生物实验中多采用低于 50% MIC 浓度并进行 2 倍稀释后（1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC 等）作为药物对细菌特性研究的工作浓度[11]，因此本研究选择 0.625、1.25、2.5、5 mg/mL 作为工作浓度进一步考察甜茶甙对 *S.mutans* 产酸、黏附、合成 WIG 的能力及 GTF 活性的影响。

产酸能力是衡量口腔致龋菌致龋能力的特性之一，一般情况下口腔内 pH 值常维持在 6.6～7.1 的范围内，但在菌斑形成微环境的情况下，唾液和牙龈沟中的缓冲液不能顺利的渗透到菌斑内部而发挥作用，以致 pH 下降。随着龋齿菌的生长繁殖，酸性代谢产物不断堆积致使菌斑微环境进一步酸化，而 *S.mutans* 通过调节酸适应性继续生长循环代谢，致使



注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与同浓度木糖醇组比较，$P<0.05$。A. *S.mutans* 总蛋白变化情况；B. *S.mutans* 还原糖变化情况；C. *S.mutans* GTF 酶活力变化情况；D. *S.mutans* 比活力变化情况。

图 5　各组 *S.mutans* 总蛋白、还原糖、GTF 酶活力及比活力比较

龋齿发生和进展[12]。因此研究认为产酸是 *S.mutans* 致龋性的重要因子，控制其产酸能力是抑制龋齿发生的关键环节[13]。本研究中，甜茶甙组 pH 变动量明显低于等浓度的木糖醇组，且组内比较发现与 0.625 mg/mL 组相比，1.25、2.5、5 mg/mL 组 pH 变动量明显更低，2.5、5 mg/mL 组与 1.25 mg/mL 组比较 pH 变动量也显著性降低，但 2.5、5 mg/mL 组之间比较无明显差异。说明甜茶甙对 *S.mutans* 产酸能力的抑制作用较木糖醇更强，但甜茶甙浓度达到 2.5 mg/mL 后，*S.mutans* 产酸能力对浓度不再具有依懒性。

S.mutans 的黏附能力是指变异链球菌通过细菌表面蛋白（黏附素）与生物膜中受体成分之间特异性结合而促使细菌定植在牙面上的现象，是细菌定植生存微环境形成的必要条件，也是 *S.mutans* 致龋的先决条件[14]。因此本研究检测了 *S.mutans* 黏附能力的变化，结果显示甜茶甙对 *S.mutans* 黏附抑制率明显高于木糖醇，并随着甜茶甙浓度的升高而升高，在 5 mg/mL 时黏附抑制率达 95%以上。另外研究认为 *S.mutans* 表面蛋白与其疏水性有关，即表面蛋白可通过立体化学识别牙面受体和疏水反应而介导黏附作用，疏水蛋白与获得性膜中的疏水基团结合是细菌的非依懒性黏附作用之一，表面疏水性越强细菌黏附力越强[15]。因此疏水作用是体现黏附能力的重要指标。本研究中发现甜茶甙和木糖醇表面疏水率均明显下降，并随作用浓度的增大而降低，且甜茶甙作用效果更优，进一步说明甜茶甙对 *S.mutans* 黏附能力的抑制作用更强，且具有浓度依懒性。既往研究表明 *S.mutans* 的选择性黏附与细胞壁主要成分脂磷壁酸和肽聚糖有关，脂磷壁酸是细胞壁上 GTF 的受体，促使 GTF 合成胞外多糖，进而促进细菌间的相互聚集并黏附在牙釉质上[16]。结合本研究结果推断甜茶甙对 *S.mutans* 的黏附作用的抑制主要可能是针对表面蛋白，降低 GTF 活性影响脂磷壁酸与受体结合能力及调控表面疏水率，从而促使 *S.mutans* 黏附能力降低。

GTF 是目前公认的 *S.mutans* 等致龋菌的毒力因子，可利用食物中的蔗糖合成胞外多糖，而胞外多糖是黏附的关键因素之一，WIG 的大量合成是龋齿菌生长的一种保护方式，同时也是牙菌斑聚集和发展的重要因素[17]。因此本研究检测 GTF 活性和 WIG 含量，结果显示甜茶甙和木糖醇组 *S.mutans* WIG 含量均随其浓度的增加不断下降，但甜茶甙在浓度为 0.625 mg/mL 时总蛋白含量、还原糖量、GTF 酶活力及比活力均已出现明显降低现象，WIG 含量在 1.25 mg/mL 时出现明显降低，且以上指标均随着甜茶甙浓度的增加而依次降低，而木糖醇组 WIG 含量、还原糖量、GTF 酶活力及比活力却在 2.5 mg/mL 时才开始明显降低，且同等浓度下甜茶甙组以上各指标变化更为明显。这可能是因为甜茶甙破坏了酶蛋白分子中的盐键、氢键和疏水键等蛋白的空间构想所引起的一系列变化。值得注意的是我们还检测了还原糖和总蛋白。这是因为在口腔中还原糖一般是指蔗糖的代谢产物，还原糖减少说明龋齿菌代谢降低，致龋性减弱。而且既往研究有报道甜茶甙水解产物中含有 18 种氨基酸，而这些氨基酸可能被 *S.mutans* 作为底物合成蛋白质，从而导致甜茶甙组总蛋白含量增高[18]。本研究结果中验证了这一结论，但具体哪种氨基酸效应还需进一步研究。

综上所述，本研究认为甜茶甙优于木糖醇，可有效抑制致龋菌 *S.mutans* 的生长及产酸、黏附及 GTF 活性等致龋特性，其作用效果与浓度相关，为临床预防龋齿提供了新选择。但本研究仍有一些局限性，如未设置充分的梯度浓度，且仅进行了体外实验等，因此，关于其临床应用浓度及安全性尚需进一步的大量实验证实。

[参考文献]

[1] CUI T，LUO W，XU L，et al. Progress of Antimicrobial Discovery Against the Major Cariogenic Pathogen Streptococcus mutans[J]. Curr Issues Mol Biol，2019，32：601-644.

[2] 李秀娟，钟滨，徐华兴，等. 麦芽糖醇口香糖对口腔三种致龋菌的抑制作用[J]. 实用口腔医学杂志，2010，26(1)：79-82.

[3] 杨秀娟，姚军. 赤藓糖醇和木糖醇对变异链球菌黏附的影响[J]. 国际口腔医学杂志，2012，39(2)：155-158.

[4] 赵玉国，丁勇，王树青，等. 木糖醇对口腔龋齿的预防作用研究[J]. 现代食品，2018(15)：58-61.

[5] DECKER E M，KLEIN C，SCHWINDT D，et al. Metabolic activity of Streptococcus mutans biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose[J]. Int J Oral Sci，2014，6(4)：195-204.

[6] KIM J，NGUYEN T，JIN J，et al. Anti-cariogenic Characteristics of Rubusoside[J]. Biotechnol Bioprocess Eng，2019，24(2)：282-287.

[7] CHU J，ZHANG T，HE K. Cariogenicity features of Streptococcus mutans in presence of rubusoside[J]. BMC Oral Health，2016，16(1)：54.

[8] LEMOS J A，PALMER S R，ZENG L，et al. The Biology of Streptococcus mutans[J]. Microbiol Spectr，2019，7(1)：1-13.

[9] 胡楠，熊兴耀. 甜茶苷对变形链球菌致龋能力的影响[J]. 中草药，2014，45(12)：1743-1746.

[10] 黄丽微. 甜茶甙对变形链球菌作用的体外实验研究[D]. 南宁：广西医科大学，2010.

[11] 孙艳伟，刘雅丽，赵晓雪，等. 柠檬精油对变异链球菌产酸及乳酸脱氢酶活性影响的实验研究[J]. 口腔医学研究，2018，34(1)：27-31.

[12] 陈凤英，曾彩霞，程祥荣. 三种义齿稳固剂的pH值及其对变形链球菌生长的影响[J]. 北京口腔医学，2020，28(1)：16-19.

[13] WANG S，WANG Y，WANG Y，et al. Theaflavin-3，3′-Digallate Suppresses Biofilm Formation，Acid Production，and Acid Tolerance in Streptococcus mutans by Targeting Virulence Factors[J]. Front Microbiol，2019，10：1705.

[14] 王玲，刘瑶，韩林秀，等. HtrA对乳牙变异链球菌产酸、黏附的体外研究[J]. 西南医科大学学报，2019，42(6)：507-511.

[15] ZHANG M，YU Z，LO E. A New pH-Responsive Nano Micelle for Enhancing the Effect of a Hydrophobic Bactericidal Agent on Mature Streptococcus mutans Biofilm[J]. Front Microbiol，2021，12：761583.

[16] TU Y，LING X，CHEN Y，et al. Effect of S.Mutans and S.Sanguinis on Growth and Adhesion of P. Gingivalis and Their Ability to Adhere to Different Dental Materials[J]. Med Sci Monit，2017，23：4539-5445.

[17] DENG Y，YANG Y，ZHANG B，et al. The vick gene of streptococcus mutans mediates its cariogenicity via exopolysaccharides metabolism[J]. Int J Oral Sci，2021，13(1)：45.

[18] 张罗丹，凌均棨，童忠春. 游离氨基酸对变异链球菌生长及生物膜形成的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志，2014，24(6)：313-316.

（责任编辑：吴凌，李海霞）