

·综述·

## 牙菌斑pH值的动态变化及检测技术的研究进展

孟新慧 霍丽珺 雷雅燕

昆明医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科 650000

通信作者:雷雅燕,Email:yayanlei@aliyun.com



扫码阅读电子版

**【摘要】** 龋病是发生在牙齿硬组织的慢性感染性疾病,其发生、发展与菌斑pH值密切相关。牙菌斑pH值为衡量菌斑生物膜致龋力的重要指标,通过菌斑pH值的动态变化及菌斑pH值检测技术的研究,可以了解菌斑的产酸代谢情况,比较食物、菌斑的潜在致龋力、个体的龋易感性等,对龋病的防治有重要意义。本文重点综述菌斑pH值的动态变化,以及菌斑检测技术的相关研究。

**【关键词】** 龋病; 牙菌斑; pH值; 动态变化

**基金项目:** 云南省科技计划[2017FE467(-145)]

**引用著录格式:** 孟新慧,霍丽珺,雷雅燕. 牙菌斑pH值的动态变化及检测技术的研究进展[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2021, 15(1):54-57.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.01.009

### Dynamic changes of dental plaque pH and research progress of detection techniques

Meng Xinhui, Huo Lijun, Lei Yayan

Department of Operative Dentistry, Preventive Dentistry and Endodontics, The Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China

Corresponding author: Lei Yayan, Email:yayanlei@aliyun.com

**【Abstract】** Dental caries is a chronic infectious disease that occurs in the hard tissue of teeth, and its occurrence and development is closely related to the pH value of dental plaque. Therefore, the pH value is an important index to measure the cariogenic ability of plaque biofilm. Through the dynamic changes of plaque pH and the study of plaque pH detection technology, we can understand the acid metabolism of plaque. Comparing the potential cariogenic ability of food and plaque, individual caries susceptibility is of great significance for the prevention and treatment of dental caries. This paper focuses on the dynamic changes of plaque pH and the related research of plaque detection technology.

**【Key words】** Dental caries; Dental plaque; pH determination; Dynamic change

**Fund program:** Science and Technology Planning Project of Yunnan Province[2017FE467(-145)]

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.01.009

龋病的发生、发展呈渐进的不可逆过程,可引起牙髓病、根尖周病和颌骨炎症等一系列并发症,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。龋病的发生、发展与牙菌斑生物膜内pH值密切相关。牙菌斑生物膜内为一个稳定的微生态环境,细菌在其内进行一系列的代谢活动<sup>[2]</sup>。菌斑pH值并非是固定不变的,其变化受菌斑大小、成熟程度等影响。通过对菌斑pH值动态变化的研究,可为龋病的防治提供新思路。但牙菌斑体量微小,对其pH值的检测技术要求较高。本文就菌斑pH值动态变化及其检测技术研究进展做一综述。

#### 一、菌斑pH值的动态变化

1. 菌斑pH值的三维分布:菌斑结构高度复杂,胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)在完整的菌斑生物膜中分布不均匀和(或)具有不同的结构<sup>[3]</sup>。研究表明,菌斑生物膜复杂的三维结构形成了菌斑内不均匀的酸性微环境<sup>[4]</sup>。Vroom等<sup>[5]</sup>使用双光子激发显微镜显示了完整的口腔生物膜内pH值的变化,发现微环境呈异质性。Hwang等<sup>[6]</sup>使用pH响应荧光团和多光子共聚焦荧光显微镜测绘技术检测三维菌斑结构中的pH空间分布,该研究将菌斑从上至下分为“上、中、下”三个部分,其横截面分为“内层、中层、外层”三部分。在模拟口腔唾液缓冲的中性溶液中孵育菌斑后,牙菌斑上层从内层到外层的酸基本都被中和,而其底层大部分区域仍为酸性。牙菌斑内层pH值从上至下的变化,低pH( $\leq 4.7$ )区域可维持到40  $\mu\text{m}$ 的高度,超过50  $\mu\text{m}$ 后pH值随着高度的增加而逐渐上升。在中层区域,pH值变化显示出与内层区域相似的模式,但在大于50  $\mu\text{m}$ 的高度后(与中心区域相比)pH值更高,这表明靠近底部(<40  $\mu\text{m}$ )和靠近微菌落中心的区域对缓冲液中和作用的抵抗力增加。在外层区域,pH逐渐但持续地随着高度的升高而增加,这表明微菌落结构的外围可更快的被pH 7.0的缓冲液中和。Xiao等<sup>[4]</sup>的研究也发现了相似的结果。研究显示,在中性唾液环境中,牙菌斑中的EPS能促使局部形成酸性核心,保护菌斑酸性微环境,即使菌斑被缓冲液中和亦能快速恢复低pH值<sup>[4]</sup>。

2. 不同大小菌斑pH值的变化:Hwang等<sup>[6]</sup>对扩散数字模型的研究表明,在唾液环境中,由于菌斑酸环境的平衡时间与扩散距离的平方成正比,且中性唾液在扩散过程中与附近的酸反应,在菌斑的中心和底部酸性更强,需要更长时间中和较大的微菌落的内部酸环境。因此,酸性核心在较大的微菌落中更为明显。以往的研究表明,由于菌斑EPS具有扩散屏障的作用,限制带电离子在生物膜内外渗透,从而影响唾

液的中和作用。而不带电荷的溶质(如蔗糖)则很容易扩散到生物膜中,被产酸菌利用产酸<sup>[7]</sup>。提示,较大菌斑的酸性核心及抗中和能力比较小菌斑强。

3. 不同阶段菌斑pH值的变化:Schlafer等<sup>[8]</sup>采用比率计量型染料半萘甲酸-4F 5-(-6)羧酸(Seminaphthor-hodafluor-4F 5-(and-6) Carboxylic Acid, C-SNARF-4)测量比较了年轻菌斑(30或48 h)和成熟菌斑(120 h)的pH值变化。30 h的菌斑在加入葡萄糖后pH下降很快。同时,生物膜不同区域的酸化速率不同,证明了生物膜内存在不同的pH微环境。随着唾液的流动,30 h生物膜的平均pH上升到接近中性。相反,在添加葡萄糖后,120 h菌斑的产酸速度较慢,表明成熟生物膜的代谢活性降低。然而,120 h的生物膜在唾液流动的动态条件下继续酸化。唾液流动45 min后,平均pH降至接近静态条件下30 h生物膜的水平。120 h菌斑的高度与30 h的菌斑在同一范围内,推测对葡萄糖和唾液刺激的不同反应与生物膜高度无关,生物膜的显微图像显示在120 h的生物膜中细胞密度增加,提示生物膜的成熟和伴随的EPS的发展有可能更好地保护生物膜中的酸性微环境。Chida等<sup>[9]</sup>的研究则表明,随着生物膜时间的增长,产酸能力增强(148 h > 96 h > 48 h)。推测原因主要有两方面:(1)随着生物膜时间的增长,EPS的成熟和细胞密度的增加可以促进酸的产生和保存<sup>[6]</sup>;(2)细胞活力的下降可能会降低成熟生物膜的产酸潜力。然而,在碳水化合物反复暴露的条件下,随着时间的推移,生物膜的产酸和耐酸能力不断提高<sup>[10]</sup>。亦有研究认为,不同成熟程度菌斑内优势菌不同从而导致菌斑pH值的不同变化<sup>[11]</sup>。

## 二、菌斑pH值检测技术

随着对菌斑pH研究的深入,菌斑pH值的检测方法逐渐增多。基于菌斑pH值动态变化的特点,理想的检测技术应具备以下4个条件:(1)简单方便,容易操作;(2)不破坏菌斑生理结构;(3)能检测菌斑内不均匀的酸环境;(4)能动态监测菌斑pH变化。下面就主要的几种检测技术的优缺点做一总结。

1. 电极检测技术:对菌斑pH值的检测有很多电极检测技术<sup>[4]</sup>,这些技术各有优缺点。

(1)菌斑采样技术(Plaque sampling):用棉签、刮匙等器械从受测者口腔内采集菌斑后,在一定时间内用电极测定pH值<sup>[12]</sup>。该技术的优点:①设备简单,容易操作;②结果可靠。缺点:①破坏菌斑生理结构;②受测者需在采样前48 h避免刷牙,才能采集到具有一定厚度的菌斑<sup>[13]</sup>;③不适合监测水平pH梯度<sup>[8]</sup>;④不能动态监测菌斑pH值。

(2)直接接触技术(Touch method):将电极直接插入牙菌斑生物膜内测菌斑pH<sup>[14]</sup>,该技术除有菌斑采样法的优势外还有其他优点:①可测试生理条件下菌斑的pH;②可连续监测菌斑pH值<sup>[15]</sup>。主要缺点为:①菌斑生理结构破坏<sup>[16]</sup>;②不能用于金属修复体附近的牙<sup>[17]</sup>;③检测结果为菌斑内平均pH值,不能反映菌斑不均匀的酸环境。

(3)埋藏电极遥测技术(Telemetric system):将电极埋入

义齿内,再将义齿戴入口内,以测试在电极表面形成的菌斑pH值<sup>[18]</sup>。该技术的优点:①未破坏菌斑的生理结构;②可连续监测菌斑形成过程中的pH值<sup>[17]</sup>。主要缺点为:①要求受测者口内有足够的空间放入电极;②不能用于金属修复体附近的牙<sup>[17]</sup>;③检测结果为菌斑内平均pH,不能反映菌斑内不均匀的酸环境。

(4)人工菌斑技术(Artificial plaque measurement):该技术是用电极直接测试人工菌斑模型的pH值。该技术的优点为可人为控制菌斑的代谢条件<sup>[19]</sup>。主要缺点为:①人工菌斑与口内菌斑有区别<sup>[19]</sup>;②检测结果为菌斑内平均pH,不能反映菌斑不均匀的酸环境。

2. pH试纸技术(pH indicator strips):pH试纸技术是用pH试纸接触受测部位的菌斑10 s,根据pH试纸的颜色与pH颜色指数方案进行比较,从而获得菌斑pH值。该技术的优点:①使用简便;②适合于椅旁临床使用。主要缺点为:pH的读数受测试者的主观影响,不能动态监测菌斑pH,也不能检测菌斑内不均匀的酸环境,该方法的适用性及可靠性还有待进一步研究<sup>[20]</sup>。

3. 激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)技术:CLSM通过激光发射装置发射激光从而激发荧光染料及荧光探针,再通过计算机采集荧光图像,对荧光染料的pH相关发射量进行量化。CLSM还可进行三维重建<sup>[21]</sup>,可以在虚拟空间的任意角度观察和分析细胞、组织的三维空间结构<sup>[22]</sup>。然而CLSM的点扫描特性导致该技术存在光漂白的缺点<sup>[22]</sup>,并且CLSM渗透深度被限制在20~40 μm,从而影响到对菌斑垂直pH梯度的监测<sup>[5]</sup>。基于CLSM测量菌斑pH的技术主要有荧光寿命成像技术、与右旋糖酐偶联的pH敏感染料技术、比率计量型染料C-SNARF-4技术和二氧化硅纳米传感器技术等。

(1)荧光寿命成像技术(fluorescence life-time imaging, FLIM):该技术利用荧光衰减时间的差异在荧光图像中产生对比来测量菌斑pH值<sup>[23]</sup>。该技术的优点:①对菌斑无机械干扰;①可在菌斑的多个位置快速评估pH值,进行动态监测<sup>[8]</sup>;③可以检测菌斑内不均匀的酸环境。主要缺点为:①技术复杂,昂贵;②探针响应受到生物膜环境的影响<sup>[5]</sup>;③探针浓度过高,荧光自猝灭;探针浓度过低,生物膜自发荧光影响pH值的量化,难选择探针的合适浓度<sup>[24]</sup>;④执行荧光寿命成像所需的设备普遍不可用<sup>[25]</sup>。

(2)与右旋糖酐偶联的pH敏感染料技术:该技术通过分子探针与右旋糖酐偶联,并将偶联后的右旋糖酐直接结合到菌斑EPS基质中<sup>[25]</sup>,根据双波长荧光团的光强度比来测量牙菌斑pH值<sup>[26]</sup>。该技术除荧光寿命成像技术的优点外,还有其测量结果不受荧光探针浓度影响的优点。主要缺点为:①染料在菌斑中的扩散受到限制,从而染料的亮度和光稳定性受到限制<sup>[27]</sup>;②光激发可能引起细胞毒性<sup>[28]</sup>;③染料可能干扰pH探针的灵敏度<sup>[8]</sup>。

(3)比率计量型染料C-SNARF-4技术:该染料在生物膜基质中提供依赖于pH的双光谱发射,并在酸性条件下在细

菌细胞中富集。该技术除了具有右旋糖酐偶联的优点外,还有:①C-SNARF-4尺寸小,易于扩散到生物膜中<sup>[27]</sup>;②C-SNARF-4具有使普通细菌染色和pH敏感基质染色的双重染色特性,可在不使用额外或参考染色的情况下测量pH,避免了pH敏感染料和参考染料的差异漂白,以及由于不同染料光谱重叠造成的问题<sup>[8]</sup>。主要缺点为:需对pH敏感的染料进行细致的校准,还需评估生物膜成分对染料荧光发射的影响<sup>[29]</sup>。

(4)二氧化硅纳米传感器技术:该技术将pH敏感的荧光染料包裹在二氧化硅的外壳中,既保留了比率计量型染料的优点,又避免了其缺点<sup>[28]</sup>。该技术的优点还有:①二氧化硅具有良好的生物相容性<sup>[30]</sup>;②染料共价掺入到二氧化硅基质中显著提高了染料亮度和光稳定性<sup>[27]</sup>。主要缺点为:①探针颗粒必须与生物膜胞外基质紧密混合并停留在其中,技术难度高;②二氧化硅的颗粒直径影响到染色的效果及均匀程度<sup>[27]</sup>。

4. 双光子激光显微镜技术(two-photon excitation microscopy, TPE):该技术类似CLSM,但TPE中使用了较长波长的激发光,具有比CLSM更高的穿透率,从而避免了CLSM对菌斑垂直梯度检测的缺点。同时探针的光漂白减少,使得双光子激光显微镜更实用于生物膜的深入成像研究<sup>[31]</sup>。

### 三、小结

牙菌斑pH值为衡量菌斑生物膜致龋力的重要指标,通过菌斑pH的动态变化的研究可以了解菌斑的产酸代谢情况,进一步调控菌斑pH,降低菌斑致龋性,为龋病的防治提供新思路。目前的菌斑pH的检测技术均可检测菌斑的pH值,但激光共聚焦技术及TPE能对菌斑pH值的动态监测及菌斑内pH值的三维分布的检测有较明显的优势。研究者可根据实验要求及实验目的综合考虑,选择合适的检测技术。

利益冲突 所有作者均声明无利益冲突

### 参 考 文 献

[1] Sampaio - Maia B, Caldas IM, Pereira ML, et al. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2016, 97: 171-210. DOI: 10.1016/bs.aambs.2016.08.002.

[2] Koo H, Yamada KM. Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 42: 102-112. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.05.005.

[3] Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(4): e1002623. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002623.

[4] Xiao J, Hara AT, Kim D, et al. Biofilm three-dimensional architecture influences in situ pH distribution pattern on the human enamel surface [J]. *Int J Oral Sci*, 2017, 9(2): 74-79. DOI: 10.1038/ijos.2017.8.

[5] Vroom JM, De Grauw KJ, Gerritsen HC, et al. Depth penetration

and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3502-3511. DOI: 10.1089/oli.1.1999.9.359.

[6] Hwang G, Liu Y, Kim D, et al. Simultaneous spatiotemporal mapping of in situ pH and bacterial activity within an intact 3D microcolony structure [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32841. DOI: 10.1038/srep32841.

[7] Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm [J]. *J Dent Res*, 2013, 92(12): 1065-1073. DOI: 10.1177/0022034513504218.

[8] Schlafer S, Baelum V, Dige I. Improved pH-ratiometry for the three-dimensional mapping of pH microenvironments in biofilms under flow condition [J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 152: 194-200. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.08.007.

[9] Chida R, Igarashi K, Kamiyama K, et al. Characterization of human dental plaque formed on hydrogen-ion-sensitive field-effect transistor electrodes [J]. *J Dent Res*, 1986, 65(3): 448-451. DOI: 10.1177/00220345860650031501.

[10] Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process [J]. *Caries Res*, 2008, 42(6): 409-418. DOI: 10.1159/000159604.

[11] Takeshita T, Yasui M, Shibata Y, et al. Dental plaque development on a hydroxyapatite disk in young adults observed by using a barcoded pyrosequencing approach [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8136. DOI: 10.1038/srep08136.

[12] Franklin S, Masih S, Thomas AM. Effect on oral pH changes and taste perception in 10-14-year-old children, after calcium fortification of a fruit juice [J]. *Eur Arch Paediatr Den*, 2015, 16(6): 483-489. DOI: 10.1007/s40368-015-0198-4.

[13] Fatemeh M, Marjan S, Homa S, et al. CPP-ACP: Effect on Dental Plaque Acidity after Water Rinsing Following Topical Fluoride Therapy [J]. *J Clin Pediatr Dent*, 2017, 41(1): 22-26. DOI: 10.17796/1053-4628-41.1.22.

[14] 刘鲁川,岳松龄,吕太平. 微型pH电极直接测试人牙菌斑pH的应用研究 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 1998, 8(3): 159-161. DOI: 10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent.1998.03.004.

[15] Joshi VS, Sheet PS, Cullin N, et al. Real-time metabolic interactions between two bacterial species using a carbon-based pH microsensor as a scanning electrochemical microscopy probe [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(20): 11044-11052. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03050.

[16] Kalhan TA, Lin YT, Kalhan AC, et al. Dental plaque pH in predicting caries relapse after general anaesthesia-an exploratory study [J]. *Int Dent J*, 2019, 69(6): 419-427. DOI: 10.1111/idj.12508.

[17] Bowen WH. The Stephan Curve revisited [J]. *Odontology*, 2013, 101(1): 2-8. DOI: 10.1007/s10266-012-0092-z.

[18] Newman P, MacFadyen EE, Gillespie FC, et al. An in-dwelling electrode for in-vivo measurement of the pH of dental plaque in man [J]. *Arch Oral Biol*, 1979, 24(7): 501-507. DOI: 10.1016/0003-9969(79)90128-6.



- [19] Liu Y, Ren Z, Hwang G, et al. Therapeutic Strategies Targeting Cariogenic Biofilm Microenvironment [J]. *Adv Dent Res*, 2018, 29(1):86-92. DOI:10.1177/0022034517736497.
- [20] Carlén A, Hassan H, Lingström P. The 'strip method': a simple method for plaque pH assessment [J]. *Caries Res*, 2010, 44(4): 341-344. DOI:10.1159/000315273.
- [21] 侯燕鸣, 胡剑江, 王毅. 激光扫描共聚焦显微镜技术及其在生物医学领域中的应用 [J]. *国际中医中药杂志*, 2010, 32(6): 567-569. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2010.06.050.
- [22] 孙学俊, 闫喜中, 郝赤. 激光共聚焦扫描显微镜技术简介及其应用 [J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(1): 1-9, 14. DOI:10.3969/j.issn.1671-8151.2016.01.001.
- [23] Schmitta FJ, Thaab B, Junghansa C, et al. eGFP-pHsens as a highly sensitive fluorophore for cellular pH determination by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837(9): 1581-1593. DOI:10.1016/j.bbabi.2014.04.003.
- [24] Chang CW, Sud D, Mycek MA. Fluorescence lifetime imaging microscopy [J]. *Methods Cell Biol*, 2007, 81: 495-524. DOI: 10.1016/S0091-679X(06)81024-1.
- [25] Klein MI, Duarte S, Xiao J, et al. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(3): 837-841. DOI:10.1128/AEM.01299-08.
- [26] DePedro HM, Urayama P. Using LysoSensor Yellow/Blue DND-160 to sense acidic pH under high hydrostatic pressures [J]. *Anal Biochem*, 2009, 384(2): 359-361. DOI: 10.1016/j.ab.2008.10.007.
- [27] Lawrence JR, Swerhone GDW, Kuhlicke U, et al. In situ evidence for metabolic and chemical microdomains in the structured polymer matrix of bacterial microcolonies [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2016, 92(11): fiw38. DOI: 10.1093/femsec/fiw183.
- [28] Burns A, Ow H, Wiesner U. Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology [J]. *Chem Soc Rev*, 2006, 35(11): 1028-1042. DOI:10.1039/B600562b.
- [29] Schlafer S, Garcia JE, Greve M, et al. Ratiometric imaging of extracellular pH in bacterial biofilms with C-SNARF-4 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(4): 1267-1273. DOI:10.1128/AEM.02831-14.
- [30] Ru F, Du P, Lu X. Efficient ratiometric fluorescence probe utilizing silicon particles/gold nanoclusters nanohybrid for "on-off-on" bifunctional detection and cellular imaging of mercury (II) ions and cysteine [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1105: 139-146. DOI:10.1016/j.aca.2020.01.020.
- [31] Ryu J, Kang U, Kim J, et al. Real-time visualization of two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy using a wavelength-tunable femtosecond pulsed laser [J]. *Biomed Opt Express*, 2018, 9(7): 3449-3463. DOI:10.1364/BOE.9.003449.

(收稿日期:2020-06-27)

(本文编辑:王嫚)