

## 研究报告

## 桑酮 G 对变异链球菌生长和生物被膜形成的影响

邹文海, 达春瑶, 肖颖欣, 龚志港, 刘祝祥\*

吉首大学 生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000

邹文海, 达春瑶, 肖颖欣, 龚志港, 刘祝祥. 桑酮 G 对变异链球菌生长和生物被膜形成的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 350-362.

ZOU Wenhai, DA Chunyao, XIAO Yingxin, GONG Zhigang, LIU Zhuxiang. Effects of kuwanon G on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 350-362.

**摘要:**【背景】变异链球菌(*Streptococcus mutans*)是导致龋齿的主要病原体, 含氟产品虽然能治疗龋齿, 但是会对人体造成危害。【目的】推动植物源抗龋齿药物的进一步开发利用, 研究桑酮 G 对变异链球菌生长和生物被膜形成的影响。【方法】通过微量稀释法、平板计数法测定桑酮 G 对变异链球菌浮游菌的抗菌作用; 通过 pH 计测量桑酮 G 对变异链球菌糖酵解产酸的影响; 采用结晶紫染色测量生物被膜形成量; 使用苯酚硫酸法测量水不溶性多糖的含量并通过激光扫描共聚焦显微镜观察胞外 DNA 量来评估桑酮 G 对生物被膜形成的影响; 用逆转录实时荧光定量 PCR 测量生物被膜中毒力基因的 mRNA 水平。【结果】桑酮 G 对变异链球菌的最小抑菌浓度为 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最低杀菌浓度为 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 高浓度桑酮 G 对变异链球菌呈现较强的杀菌效果; 桑酮 G 能抑制生物被膜中 *gtfB*、*gtfC*、*gtfD*、*ldh*、*comD*、*vicK*、*atpF* 和 *gpbB* 的表达, 降低水不溶性多糖的合成, 抑制生物被膜的形成, 并降低生物被膜中胞外 DNA 含量及生物被膜的形成量, 同时还对变异链球菌的产酸耐酸能力产生负面影响。【结论】桑酮 G 能通过降低毒力基因的 mRNA 水平, 使得生物被膜的黏附力降低, 结构变得松散, 对生物被膜形成起到抑制作用, 期望能够为植物源天然产物的进一步应用提供一定的理论基础。

**关键词:** 桑酮 G; 变异链球菌; 生物被膜; 胞外多糖

资助项目: 国家自然科学基金(31660003); 湖南省自然科学基金(2020JJ4501); 湘西自治州科技计划(201739)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31660003), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ4501), and the Science and Technology Program of Xiangxi Autonomous Prefecture (201739).

\*Corresponding author. E-mail: liuzhuxiang@126.com

Received: 2024-04-02; Accepted: 2024-05-07; Published online: 2024-05-31

## Effects of kuwanon G on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*

ZOU Wenhai, DA Chunyao, XIAO Yingxin, GONG Zhigang, LIU Zhuxiang\*

College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan, China

**Abstract:** [Background] *Streptococcus mutans* stands as the primary pathogen responsible for dental caries. Despite the definite efficacy in treating dental caries, fluoride-containing products pose potential risks to human health. [Objective] We investigated the effects of kuwanon G on the growth and biofilm formation of *S. mutans*, aiming to facilitate the development of plant-derived anti-caries medications. [Methods] The microdilution and plate counting methods were employed to study the effects of kuwanon G on the viability and acid tolerance of planktonic *S. mutans*. Furthermore, the influence of kuwanon G on the acid production by glycolysis in *S. mutans* was gauged by a pH meter. Quantification of biofilm formation was executed via crystal violet staining, and the content of water-insoluble polysaccharides was determined by the phenol-sulfuric acid method. Additionally, laser scanning confocal microscopy was employed to observe the quantity of extracellular DNA, elucidating the effects of kuwanon G on biofilm development. Real-time fluorescence quantitative PCR was employed to assess the mRNA levels of virulence genes in the biofilm. [Results] Kuwanon G showed the minimum inhibitory concentration of 8  $\mu\text{g/mL}$  and the minimum bactericidal concentration of 64  $\mu\text{g/mL}$  against *S. mutans*. Notably, at higher concentrations, kuwanon G exhibited a potent bactericidal effect on *S. mutans*. Kuwanon G suppressed the expression of *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *ldh*, *comD*, *vicK*, *atpF*, and *gbpB* in the biofilm milieu, thereby diminishing the synthesis of water-insoluble polysaccharides and impeding biofilm formation. Furthermore, it reduced the content of extracellular DNA in the biofilm matrix and curtailed the overall extent of biofilm formation. Moreover, kuwanon G adversely affected the acid production and acid tolerance of *S. mutans*. [Conclusion] Kuwanon G can down-regulate the mRNA levels of virulence genes to inhibit the adhesion and loosen the structure of the biofilm, thus exerting inhibitory effects on biofilm formation. This study offers a theoretical basis for further applications of plant-derived natural products.

**Keywords:** kuwanon G; *Streptococcus mutans*; biofilm; extracellular polysaccharide

变异链球菌(*Streptococcus mutans*)作为口腔链球菌中的主要病原体,具备多种机制使其在口腔环境中生存并引发龋齿。其毒力因子具有如产酸性、耐酸性、葡聚糖聚合物的产生能力,以及形成生物被膜的能力<sup>[1]</sup>,不仅能加剧口腔环境的酸化,还能促进龋齿的形成。目前预防龋齿的口腔护理产品主要依赖于氟化物、洗必

泰<sup>[2]</sup>。然而,长期使用不仅可能导致口腔生态失衡,还会对人体健康造成一定的危害<sup>[3]</sup>。因此,植物源天然防龋药物的开发和应用成为当下研究热点之一。

桑酮 G 是从桑枝、桑皮根中提取出来的一种四羟基黄酮和间苯二酚类化合物,相关研究表明桑酮 G 具有抗炎、镇喘、抗癌、治疗心血管

疾病、缓解神经性疾病等生物活性<sup>[4-6]</sup>。

当前关于桑酮 G 抑菌的主要研究进展是对不同致病菌的抑菌活性及抑菌机制的探究。如 Park 等<sup>[7]</sup>研究桑酮 G 对一些常见口腔菌株的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 结果表明桑酮 G 对变异链球菌、血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)、索布里努斯链球菌(*Streptococcus sobrinus*)的 MIC 为 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 同时使用扫描电子显微镜观察到桑酮 G 处理后, 细菌表面明显崩解, 细胞壁边缘不清, 初步判断桑酮 G 可能通过影响细胞壁或细胞质, 抑制或阻碍细胞生长。Pang 等<sup>[8]</sup>研究桑酮 G 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的影响, 研究结果表明桑酮 G 能够破坏细胞膜和抑制细胞磷脂酸生物合成。Wei 等<sup>[9]</sup>研究表明桑酮 G 能作为广谱细菌  $\beta$ -葡糖苷酶抑制剂, 减轻  $\beta$ -葡糖苷酶对肠胃的毒性。Wu 等<sup>[10]</sup>研究表明桑酮 G 能通过形成氢键和静电相互作用靶向耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)的细胞质膜中的磷脂酰甘油和心磷脂, 通过破坏质子动力和膜通透性起到杀死细菌的目的, 并在体外表现出快速的杀菌活性, 难以产生耐药性, 同时通过动物实验发现桑酮 G 能促进感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌小鼠的伤口愈合。综上, 桑酮 G 不仅具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤等作用, 还具有一定的抗菌活性, 展现出良好的应用潜力。

然而, 桑酮 G 对龋齿的主要致病菌变异链球菌的毒力特征及生物被膜形成的影响鲜有报道, 缺乏深入的研究, 这极大限制了桑酮 G 在口腔护理产品中的应用。针对这种不足, 本研究旨在评价桑酮 G 对变异链球菌的生长和生物被膜形成的影响, 为桑酮 G 对抗致龋菌并进一步利用植物源活性物质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

变异链球菌(*S. mutans*) ATCC 25715, 北纳生物科技公司。唾液涂层的制备参考文献<sup>[11]</sup>并进行修改, 收集健康人未受刺激的唾液, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 的条件下离心 30 min, 收集上清液后使用无菌 0.22  $\mu\text{m}$  针头式过滤器进行过滤除菌, 再添加至孔板中静置 30 min 后去除唾液。

### 1.2 主要试剂和仪器

桑酮 G (分子式为  $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{O}_{11}$ , CAS 号为 75629-19-5)由吉首大学魏华提供<sup>[12]</sup>, HPLC 纯度 $\geq 97\%$ ; 二甲基亚砜, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 结晶紫, 索莱宝生物科技有限公司; qPCR 预混液和 MightyScript Plus cDNA 第一链合成试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; TRIzol 试剂和 PI 染料, 赛默飞世尔科技有限公司。

高速冷冻离心机和紫外分光光度计, 艾本德股份公司; 全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司; pH 计, 上海佑科仪器仪表有限公司; StepOne<sup>TM</sup> 荧光定量 PCR 仪, 应用生物系统公司; 激光扫描共聚焦显微镜, 北京世纪索尼科技有限公司。

### 1.3 培养基

脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基, 广东环凯生物科技有限公司; 脑心浸液蔗糖(brain heart infusion sucrose, BHIS)培养基(g/L): BHI 37.0, 蔗糖 10.0。

### 1.4 细菌培养

挑取单菌落接种于 BHI 液体培养基当中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温培养, 用于桑酮 G 对变异链球菌(*S. mutans*)浮游菌作用的检测。将处于对数生长期的菌液( $OD_{600}=0.6$ )经 BHIS 培养基稀释到  $1\times 10^6$  CFU/mL 进行生物被膜实验。培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ 。

## 1.5 MIC 和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)的测定

采用微量肉汤稀释法测定 MIC 和 MBC<sup>[13]</sup>。使用 1% DMSO 稀释桑酮 G 纯品, 采用半倍稀释法使得桑酮 G 的最终浓度在 4–128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。将培养过夜至对数生长期的菌液稀释至  $1 \times 10^6$  CFU/mL 后加入 96 孔板中, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  桑酮 G 和 100  $\mu\text{L}$  菌液。同时用 1% DMSO 及无菌水分别作为溶剂对照和阴性对照, 只含有 BHI 培养基的作为空白对照。37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h 后, 空白对照组清澈透明, 阴性对照组孔内细菌明显生长。观察每组实验结果, 培养液澄清透明的最小药物浓度为 MIC。然后从所有澄清的菌液中吸取 10  $\mu\text{L}$  涂布于 BHI 平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 48 h。将 BHI 平板上未形成可见菌落时培养基中含有的最低药物浓度, 称为 MBC。

## 1.6 桑酮 G 对 *S. mutans* 生长曲线和杀菌曲线的影响

将不同浓度的桑酮 G 加入盛有菌悬液 ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) 的锥形瓶中, 使其终浓度分别为 1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC 和 MIC<sup>[14]</sup>。在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的恒温振荡条件下培养。使用新鲜培养基作为空白对照组, 并使用 1% DMSO 作为溶剂对照组。在培养过程中, 在 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 取样, 通过酶标仪测量培养物的  $OD_{600}$  值, 监测细菌的生长情况。为了研究桑酮 G 对 *S. mutans* 的杀菌效果, 将培养到对数生长期( $OD_{600} \approx 0.6$ )的 *S. mutans* 菌悬液加入含有桑酮 G 的 BHI 培养基中, 使得桑酮 G 的终浓度分别为 5MIC 和 10MIC。然后, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的恒温振荡条件下培养。每隔 30 min 通过梯度稀释涂布平板法计数形成菌落的单位(CFU/mL), 以测量细菌的存活率<sup>[1]</sup>。

## 1.7 糖酵解 pH 的测定

将培养到对数生长期的菌悬液洗涤重悬于含有 1% 葡萄糖的 PBS 中<sup>[15]</sup>。设置浓度为 1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC、MIC 和 2MIC 的桑酮 G 缓冲液为实验组, 以空白缓冲液为对照组, 并使用 1 mol/L NaOH 将混合物的初始 pH 值都调节至 7.0, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温振荡培养 2 h。在孵育过程中每隔 30 min 取样, 使用 pH 计检测培养物上清液 pH 值的变化。

## 1.8 耐酸性测量

将培养到对数生长期( $OD_{600} \approx 0.6$ )的 *S. mutans* 菌悬液在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 的条件下离心 2 min 收集菌体。然后加入等量酸性 BHI (pH 5.0) 溶液重悬<sup>[16]</sup>。将重悬后的菌液分装到含有不同浓度桑酮 G 的无菌 1.5 mL 离心管中, 桑酮 G 的终浓度分别为 1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC、MIC 和 2MIC。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后对培养液进行梯度稀释, 并取 100  $\mu\text{L}$  涂布于 BHI 平板。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后对每个平板进行活菌计数。

## 1.9 桑酮 G 对变异链球菌生物被膜的影响

### 1.9.1 结晶紫实验

将培养过夜的 *S. mutans* 菌悬液在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 的条件下离心 2 min 收集菌体, 然后使用 BHIS 培养基进行稀释<sup>[17]</sup>, 调节其菌浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。取菌悬液 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中, 同时加入不同浓度的桑酮 G 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 使其终浓度分别为 1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC 和 MIC。在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温静置厌氧培养 24 h 后丢弃浮游细胞, 并用 PBS 轻轻洗涤 1 次。随后使用甲醇固定 15 min, 然后用 1% 结晶紫染色处理 15 min。再次用无菌蒸馏水轻轻冲洗, 然后加入无水乙醇, 振荡 30 min 以溶解染料。最后, 将溶解液转移至新的 96 孔板中, 使用酶标仪测定  $OD_{595}$  以定量生物被膜。

### 1.9.2 水不溶性多糖含量的测量

采用苯酚硫酸法依照文献[18]的方法测定水不溶性多糖。将培养过夜的 *S. mutans* 菌悬液在 4 °C、8 000 r/min 的条件下离心 2 min, 收集菌体。然后使用 BHIS 培养基进行稀释, 调节其菌浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。将菌悬液添加至含唾液涂层的 24 孔板中, 再加入不同浓度的桑酮 G, 使桑酮 G 的终浓度分别为 1/8MIC、1/4MIC、1/2MIC 和 MIC。同时, 将只含有菌液的孔作为对照组, 只含有 BHIS 的孔作为空白对照组, 37 °C 恒温静止厌氧孵育 24 h。培养结束后, 去除上清液, 收集孔底和孔壁的生物被膜, 并将其转移至 1.5 mL 的离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。然后, 将沉淀悬浮于 300  $\mu$ L 1 mol/L NaOH 溶液中, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 获得上清液用于水不溶性多糖分析。将 900  $\mu$ L 无水预冷乙醇加入 300  $\mu$ L 上清液中, 然后在 -20 °C 保存 30 min 以沉淀水不溶性多糖。通过 12 000 r/min 离心 30 min 收集水不溶性多糖, 并用 2 mL 1 mol/L NaOH 将其重悬。以葡萄糖为标准品, 使用苯酚硫酸法进行测定, 结果以每毫克生物被膜干重所占水不溶性多糖的含量表示。

### 1.9.3 激光扫描共聚焦显微镜观察生物被膜

将灭菌的 8 mm 盖玻片(圆形)放入含 24 孔板中, 制备唾液涂层。然后加入 1 mL 含有不同浓度桑酮 G 的菌悬液, 使桑酮 G 终浓度分别为 1/4MIC、1/2MIC 和 MIC。在厌氧环境下静置培养 24 h 后, 用无菌 PBS 轻轻洗涤盖玻片, 晾干。接着, 用 500 nmol/L PI 染液避光染色 15 min, 再次洗涤并晾干。将盖玻片置于载玻片上, 用激光扫描共聚焦显微镜记录 5 个随机位置的图像堆栈<sup>[19]</sup>。使用 10 倍物镜记录激光扫描共聚焦显微镜数据集。观察每个样本时, 激光扫描共聚焦显微镜的激发激光强度、背景水平、对比

度和电子变焦均保持不变。

### 1.10 桑酮 G 对 *S. mutans* 毒力基因表达的测量

通过逆转录实时荧光定量 PCR (reverse-transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 来评估生物被膜中 *gtfB*、*gtfC* 和 *gtfD* 等毒力基因 mRNA 水平上的转录情况。将菌悬液用 BHIS 液体培养基稀释成  $1 \times 10^6$  CFU/mL 添加至含唾液涂层的 24 孔板中, 然后再加入不同浓度的桑酮 G, 使其终浓度分别为 1/4MIC 和 1/2MIC, 同时以 0.1% DMSO 为对照组, 静置厌氧培养 24 h<sup>[20]</sup>。培养完成后去除上清液, 刮取生物被膜, 重悬至 PBS 中 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体。

RNA 提取使用 TRIzol 法: 首先, 使用 100  $\mu$ L 溶菌酶(20.0 mmol/L Tris, pH 8.0; 2.0 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, 12.0 g/L Triton, 终浓度为 20.0 mg/mL) 重悬菌体, 37 °C 恒温水浴 30 min, 然后加入 900  $\mu$ L TRIzol 振荡混匀, 枪头吹打均匀直至无明显沉淀为止, 室温静置 10 min。加入 200  $\mu$ L 氯仿, 上下剧烈振荡 30 s 后静置 5 min。然后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液移至新的 RNase-free 离心管, 加入等量预冷乙醇颠倒混匀, -20 °C 静置 5 min 沉淀 RNA。4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上液。随后用 1 mL 75%乙醇 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 进行洗涤, 重复此步骤 2 次。室温干燥后用适量的 RNase-free 水溶解 RNA 沉淀。

以提取的总 RNA 为模板, 使用 MightyScript Plus cDNA 第一链合成试剂盒进行 cDNA 合成。首先, 在 PCR 管中加入 3  $\mu$ L 5 $\times$ DNA digester Mix, 2  $\mu$ g RNA, 并用 RNase-free 水补足至 15  $\mu$ L, 混合均匀置于水浴锅中 42 °C 孵育 10 min, 随后置于冰上, 再加入 5  $\mu$ L 4 $\times$ III M-MLV PT MIX, 振荡混匀, 将 PCR 管放入离心机中短暂离心, 使反应液沉聚于管底, 随后在 PCR 仪中进行逆转

录, 反应条件: 25 °C 5 min, 55 °C 5 min, 85 °C 5 min。

cDNA 合成后进行实时定量 PCR 分析。使用 *S. mutans* ATCC 25175 的 16S rRNA 基因作为内参基因, 检测 *gtfB*、*gtfC* 和 *gtfD* 等毒力基因在 mRNA 水平上的相对表达情况。引物序列参考文献[18], 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。PCR 反应体系: 2×SGExcel Fast SYBR Green 5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL, DNA 模板(5 μmol/L) 1 μL, RNase-free 水补足 10 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 60 °C 20 s, 共 40 个循环。使用 StepOne™ 荧光定量 PCR 仪进行荧光检测, 设置 3 组重复。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 mRNA 的相对表达量。

### 1.11 数据分析

所有试验重复 3 次, 试验结果使用 SPSS

表 1 实时定量 PCR 的特定引物

Table 1 Specific primers of quantitative real-time PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')
16S-F	CCTACGGGAGGCAGCAGTAG
16S-R	CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA
<i>gtfB</i> -F	GGTCACTGGTGCTCAATCAAT
<i>gtfB</i> -R	AAGCGTAAGTTCCATCTTCATTCT
<i>gtfC</i> -F	TCAGACAACACCTTCCTTCCTA
<i>gtfC</i> -R	GAGCACCAGTGACCATATAACC
<i>gtfD</i> -F	GCCTTTTTACGCTTGTGTTGT
<i>gtfD</i> -R	CCATATTCATATTCTCCGCC
<i>gpbB</i> -F	AGCAGCGGCAGGATATAGAG
<i>gpbB</i> -R	ACCAACCACGGTAGTTACCAATA
<i>ldh</i> -F	TTGCTCGTATCACTAAGGCTATTC
<i>ldh</i> -R	GGGCTGACCGATAAAGACTTC
<i>atpF</i> -F	TTGATAACGCTAAGGAACTGGTA
<i>atpF</i> -R	AACGCTTGATAGGGCTTCTG
<i>vicK</i> -F	GAAGTGGGACACCATTAACTTC
<i>vicK</i> -R	ATGCGATTAGTCTCATCAAGTGATACC
<i>comD</i> -F	ATGGTCTGCTGCCTGTTG
<i>comD</i> -R	CGATCATATAGGTGGTTA

26.0 统计软件分析和处理数据, 采用 Tukey 法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)

MIC 指抑制细菌可见生长的药物的最低浓度<sup>[21]</sup>, 而 MBC 指的是杀死所有细菌的药物的最低浓度<sup>[19]</sup>。这 2 个指标常被用来评估药物的抑菌或杀菌能力。通常, MIC 和 MBC 的数值越小, 表明该药物对微生物的抑制作用或杀菌作用越强。观察实验组孔内液体清澈, 无浑浊沉淀生长的最低浓度为 8 μg/mL, 平板培养 48 h 后实验组为 64 μg/mL 的平板没有菌落产生, 即桑酮 G 对 *S. mutans* 的 MIC 为 8 μg/mL, MBC 为 64 μg/mL。

### 2.2 桑酮 G 对 *S. mutans* 生长的影响

桑酮 G 对 *S. mutans* 的生长曲线影响见图 1A, 对照组 *S. mutans* 约 3 h 进入对数生长期, 12 h 开始趋于平稳, MIC 组的 *S. mutans* 约 6 h 开始进入生长对数期, 生长受到抑制。桑酮 G 对 *S. mutans* 的杀菌曲线影响见图 1B, 高浓度的桑酮 G 对 *S. mutans* 具有非常强的抑制效果, 添加 10MIC 桑酮 G 的菌液在 120 min 时已全部失活, 较低浓度的桑酮 G 的杀菌曲线出现了拖尾现象, 杀菌速度随着时间的延长而减缓。

### 2.3 桑酮 G 对 *S. mutans* 产酸的影响

*S. mutans* 具有广泛的碳水化合物代谢的能力, 能够迅速代谢来自宿主饮食中的碳水化合物, 这使得它能在牙齿表面生存和繁殖并使 pH 值下降酸腐牙齿。以葡萄糖为底物, 研究桑酮 G 对 *S. mutans* 糖酵解产酸的影响(图 2)。经过 2 h 的 pH 值检测, 1/2MIC、MIC、2MIC 桑酮 G 处理的最终 pH 值分别为 5.21、5.92、6.79, 而对照组的最终 pH 值为 4.83。2MIC、MIC、

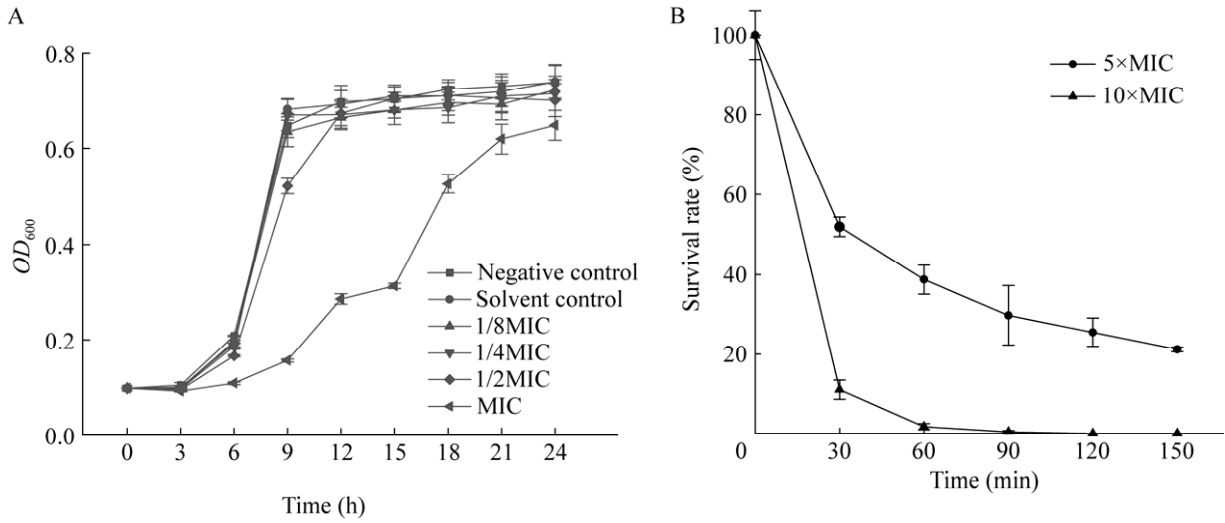


图1 桑酮 G 对变异链球菌的生长的影响 A: 生长曲线; B: 杀菌曲线。

Figure 1 Effects of kuwanon G on *S. mutans* growth. A: Growth curve; B: Sterilization curve.

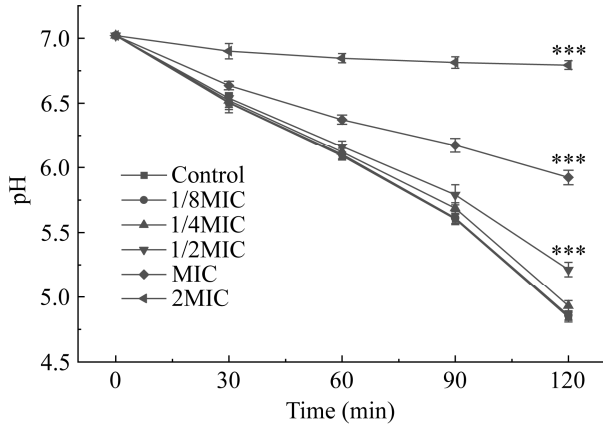


图2 桑酮 G 对变异链球菌产酸能力的影响

Figure 2 Effects of kuwanon G on acid production by *S. mutans*. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

1/2MIC 处理过后的最终 pH 值与对照组之间存在极显著性差异( $P < 0.001$ )。表明桑酮 G 对 *S. mutans* 的产酸具有抑制作用, 并呈现浓度依赖性。

#### 2.4 桑酮 G 对 *S. mutans* 耐酸的影响

产酸细菌代谢有机物形成酸性环境后, *S. mutans* 能在酸性环境下生存也是其主要毒性特征之一。为了研究桑酮 G 对 *S. mutans* 耐酸性

的影响, 采用平板计数法测量 *S. mutans* 在 pH 5.0 的条件下孵育 2 h 后的菌落数(图 3)。结果显示, 相较于对照组, 桑酮 G 处理后 *S. mutans* 在酸性环境中的存活率下降。1/4MIC 桑酮 G 就能显著降低 *S. mutans* 的存活率( $P < 0.01$ ), 随着浓度的升高, 存活率进一步下降。1/2MIC–2MIC 的桑酮 G 能极显著地降低 *S. mutans* 的存活率( $P < 0.001$ ), 其中 2MIC 浓度的桑酮 G 使得 *S. mutans* 的存活率降低至 3%。

#### 2.5 桑酮 G 对 *S. mutans* 生物被膜的影响

##### 2.5.1 桑酮 G 对 *S. mutans* 生物被膜形成量的影响

结晶紫实验是一种常用的方法, 基于结晶紫染料与细菌生物被膜中的多糖结构之间的相互作用。该染料会与生物被膜中的多糖结合并沉积在细菌表面, 导致细菌生物被膜的颜色变化。因此, 通过测量这种颜色变化的程度, 可以定量评估药物对细菌生物被膜形成量的影响。通过结晶紫实验评价桑酮 G 对生物被膜形成量的影响, 结果显示(图 4), 1/4MIC 浓度的

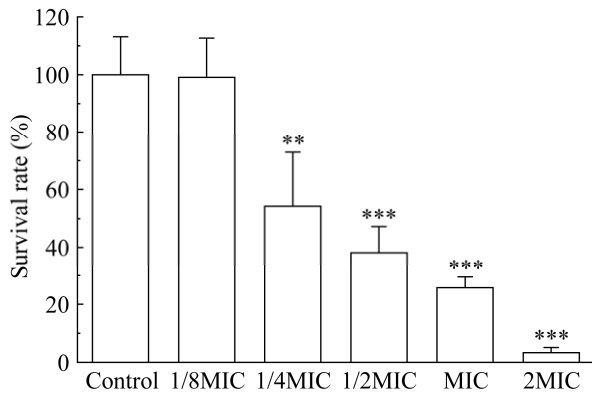


图3 桑酮 G 对变异链球菌耐酸性的影响  
Figure 3 Effects of kuwanon G on the acid tolerance of *S. mutans*. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

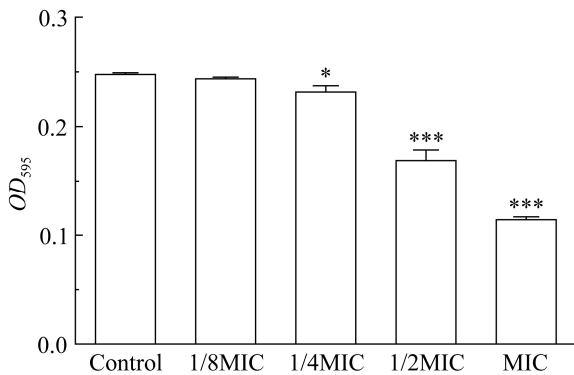


图4 桑酮 G 对变异链球菌生物被膜形成量的影响  
Figure 4 Effects of kuwanon G on the formation of biofilms by *S. mutans*. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

桑酮 G 处理组较对照组生物被膜形成量减少 ( $P < 0.05$ )。随着桑酮 G 浓度的升高,生物被膜形成量进一步下降,呈现浓度依赖性。当桑酮 G 浓度为 1/2MIC–1MIC 时,抑制效果尤为明显 ( $P < 0.001$ )。

### 2.5.2 桑酮 G 对生物被膜中水不溶性多糖含量的影响

水不溶性葡聚糖是细胞外基质的主要成分,相较于水溶性葡聚糖,其更有助于变形链球菌和其他口腔细菌黏附到牙齿表面,并有助于形成成熟的牙菌斑。多糖能与硫酸反应生成羟甲基糖,苯酚与羟甲基糖反应生成黄色化合

物,其吸光度与多糖的含量成正比关系,通过测量产生的色素在特定波长下的吸光度,可以间接确定多糖的含量。通过苯酚硫酸法测量桑酮 G 对水不溶性多糖含量的影响,如图 5 所示,1/4MIC 浓度的桑酮 G 能显著抑制水不溶性多糖的合成 ( $P < 0.01$ ),1/2MIC–1MIC 浓度的桑酮 G 能极显著抑制水不溶性多糖的合成 ( $P < 0.001$ )。同时,随着桑酮 G 浓度的增加,其抑制效果呈现浓度依赖性。

### 2.5.3 激光扫描共聚焦显微镜观察桑酮 G 对生物被膜形成的影响

胞外 DNA (extracellular DNA, eDNA)是生物被膜中的组成部分,具有重要的功能,对生物被膜的形成、稳定性和功能发挥起着关键的作用<sup>[22]</sup>。PI 染料作为一种荧光探针,能够与 DNA 结合并发出红色荧光。本实验中在生物被膜形成前添加桑酮 G 混合培养至成熟的生物被膜,再进行 PI 染色,标记 eDNA,在激光扫描共聚焦显微镜下观察生物被膜中的 eDNA,反映桑酮 G 对生物被膜形成的影响。实验结果如图 6 所示,不同浓度的桑酮 G 与 *S. mutans* 培养形成的

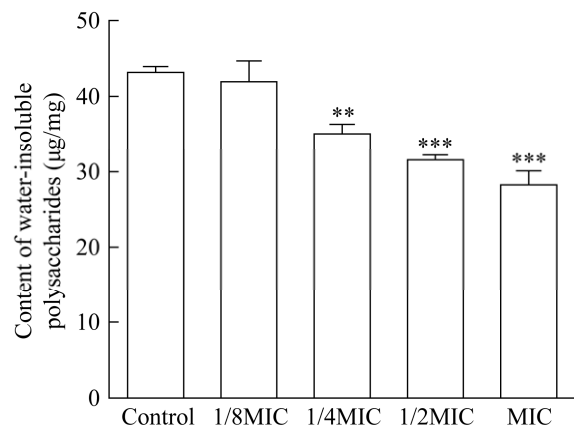


图5 桑酮 G 对生物被膜中水不溶性多糖含量的影响

Figure 5 Effects of kuwanon G on the content of water-insoluble polysaccharides in biofilms. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .



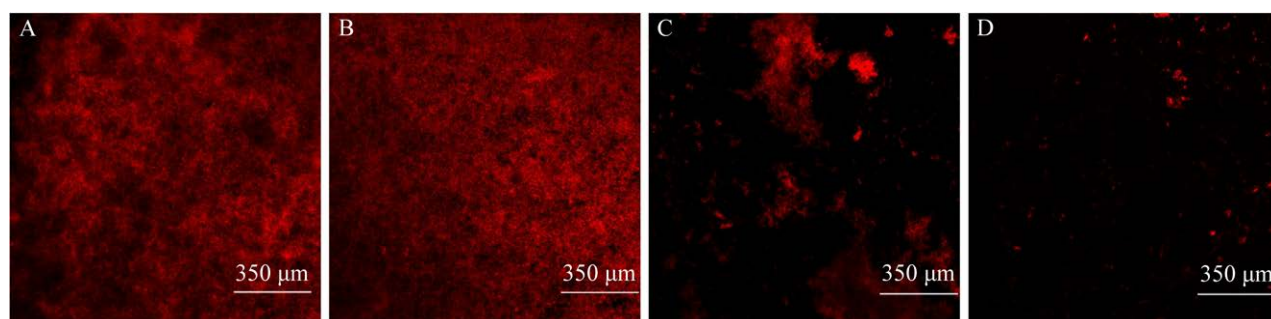


图 6 桑酮 G 对变异链球菌生物被膜形成的影响

Figure 6 Effects of kuwanon G on the formation of biofilms by *S. mutans*. A: Control (0 µg/mL); B: 1/4MIC (2 µg/mL); C: 1/2MIC (4 µg/mL); D: 1MIC (8 µg/mL).

生物被膜中，eDNA 含量明显减少。对照组生物被膜经染色后聚集程度高且生物被膜较厚，而与桑酮 G 共同培养后，生物被膜变薄且稀疏松散。当桑酮 G 浓度为 1MIC 时，与对照组相比，玻片上几乎未形成结构化的生物被膜。

## 2.6 桑酮 G 对毒力基因和双组分信号转导系统基因表达的影响

葡聚糖由葡萄糖基转移酶 Gtfs 合成，是牙菌斑形成的关键，它与其他细菌提供结合位点并维持生物被膜结构。变形链球菌主要分泌 3 种 GTF，即 GtfB、GtfC 和 GtfD，分别由基因 *gtfB*、*gtfC* 和 *gtfD* 编码。GtfB 合成水不溶性葡聚糖，GtfD 合成水溶性葡聚糖，而 GtfC 不仅合成水溶性葡聚糖还合成水不溶性葡聚糖<sup>[23]</sup>。*gbpB* 基因编码葡聚糖结合蛋白 B (glucan binding protein B, GBP B)，对葡聚糖具有亲和力，介导口腔细菌聚集，促进细菌黏附和生物被膜成熟<sup>[24]</sup>。*ldh* 编码乳酸脱氢酶，乳酸脱氢酶以丙酮酸为底物产生乳酸，是使环境中的 pH 下降的关键因素。*atpF* 编码 H<sup>+</sup> 转移 F-ATP 酶，它能够使质子转移并促使 ATP 的合成，在细菌细胞内建立起质子梯度，用来维持细胞内环境的 pH 稳定，对细菌耐酸具有重要意义。VicRK 是 *S. mutans* 中

一个重要的双组分信号转导系统(two-component signal transduction system, TCSTS)。VicK 是一种蛋白激酶，在该信号转导系统中起到接收外部信号(如环境变化)并传导给下游组件的作用，VicRK 对细菌应对氧化应激、适应各种环境变化、保证生存能力及致病性具有非常重要的作用<sup>[25]</sup>。ComDE 是一种重要的群体感应系统，涉及能力调节和细菌素生产，对细胞间通信至关重要，它调控细菌在生物被膜中的适应和应激反应，感知环境波动，并调节生理活动如生物被膜形成<sup>[26]</sup>。通过 RT-qPCR 对变形链球菌形成生物被膜中的 6 个毒力基因和 2 个 TCSTS 中基因的表达进行了定量(图 7)。在 1/4MIC 浓度桑酮 G 的作用下，*gtfC*、*atpF*、*gbpB* 基因的表达下降( $P < 0.05$ )，*gtfD* 基因的表达显著下降( $P < 0.01$ )，*ldh*、*comD* 基因的表达极显著下降( $P < 0.001$ )。当桑酮 G 的浓度提升至 1/2MIC 时，*gtfC* 基因的表达下降( $P < 0.05$ )，*gtfB*、*gtfD*、*atpF*、*vicK* 基因的表达显著下降( $P < 0.01$ )，*ldh*、*gbpB*、*comD* 基因的表达极显著下降( $P < 0.001$ )。结果表明 1/4MIC 和 1/2MIC 的桑酮 G 对其毒力基因及双组分信号转导系统均有抑制作用。

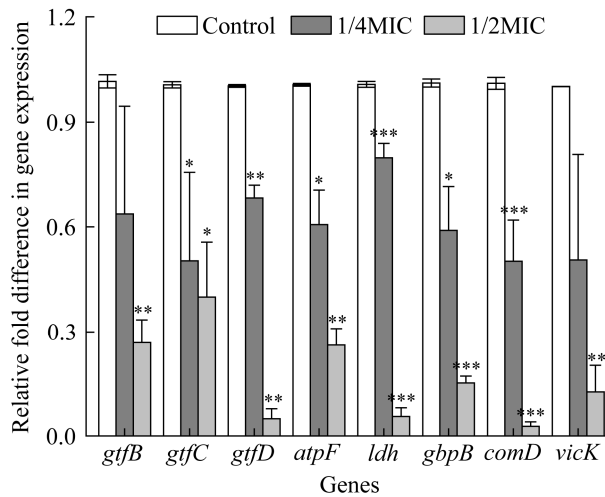


图 7 桑酮 G 处理后 *gtfB*、*gtfC*、*gtfD*、*atpF*、*ldh*、*gbpB*、*comD* 和 *vicK* 的相对表达量

Figure 7 The relative expression of *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *atpF*, *ldh*, *gbpB*, *comD* and *vicK* after kuwanon G treatment. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 3 讨论与结论

在本研究中，我们深入探讨了桑酮 G 对 *S. mutans* 生长、产酸、耐酸能力、生物被膜形成及其相关基因表达的影响。我们确定桑酮 G 对 *S. mutans* ATCC 25175 的 MIC 和 MBC 分别为 8  $\mu\text{g/mL}$  和 64  $\mu\text{g/mL}$ ，MIC 结果与 Park 等<sup>[7]</sup>的研究结果一致。不同浓度桑酮 G 下的 *S. mutans* 生长曲线和杀菌曲线表明，MIC 浓度的桑酮 G 能够抑制 *S. mutans* 的生长，推迟对数期的到来，高浓度的桑酮 G 对 *S. mutans* 的杀菌效果显著，10MIC 的桑酮 G 能在 30 min 内使 *S. mutans* 存活率下降 70%。

生物被膜是在牙齿表面形成的由微生物群落组成的生态环境，主要由多糖和胞外 DNA 组成的自产胞外聚合物(extracellular polymeric substrates, EPS)基质组成<sup>[27]</sup>。它能够帮助细菌更好地适应外界环境，增加细菌对传统抑菌剂的抗性<sup>[28]</sup>。葡聚糖由葡萄糖基转移酶(Gtfs)合

成是建立牙菌斑的关键，它为其他细菌提供结合位点并维持生物被膜结构。*gtfB*、*gtfC*、*gtfD* 分别编码 GtfB、GtfC、GtfD，本研究发现桑酮 G 能抑制 *gtfB*、*gtfC*、*gtfD*、*gbpB* 的表达，意味着它可以减少可溶性和不溶性葡聚糖的形成以及细菌的聚集。其中 GtfB 合成的水不溶性多糖是细胞外基质的主要成分，有助于口腔细菌黏附到牙齿表面形成牙菌斑。研究表明 *gtf* 基因缺陷的变形链球菌在体内的致龋性远低于野生型菌株，特别是 *gtfB*、*gtfC* 缺陷的变异链球菌<sup>[29]</sup>。通过苯酚硫酸法测量生物被膜中水不溶性多糖的含量发现，在相同生物被膜干重的条件下，1/4MIC 浓度的桑酮 G 就能降低生物被膜中水不溶性多糖的含量( $P < 0.01$ )，并且随着浓度的升高呈现浓度依赖性。同时通过 PI 染液对 eDNA 进行染色发现，与 1/2MIC 浓度的桑酮 G 共同孵育形成的生物被膜中 eDNA 的含量明显减少，生物被膜变薄、稀疏松散、不完整，当桑酮 G 浓度为 1MIC 时，与对照组相比，玻片上几乎未形成结构化生物被膜。张耀超<sup>[30]</sup>关于落叶松脂醇-4- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷抗生物被膜形成的研究发现，50  $\mu\text{g/mL}$  落叶松脂醇-4- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷能显著降低 *gtfB*、*gtfC* 等基因的表达并对生物被膜形成产生抑制作用。Wu 等<sup>[31]</sup>关于天然化合物氧化白藜芦醇对变形链球菌的影响中发现，250  $\mu\text{g/mL}$  氧化白藜芦醇能抑制 *gtfB*、*gtfC* 等基因的表达抑制水不溶性多糖的产生，使得细胞外多糖的结构和完整性发生了改变，生物被膜变得更薄、更疏松、更不完整。在 Wang 等<sup>[19]</sup>关于茶黄素-3,3'-二没食子酸酯对 *S. mutans* 毒力特征的研究中发现，茶黄素-3,3'-二没食子酸酯能够降低生物被膜当中 eDNA 的含量和水不溶性多糖的含量。在本研究中发现桑酮 G 能够下调生物被膜中 *gtfB*、*gtfC*、*gtfD* 等基因的表达，降低水不溶性多糖的含量，对生物被膜的形成

起的抑制作用使得 eDNA 的含量减少, 生物被膜的形成量降低。

除了形成生物被膜的能力外, *S. mutans* 的糖代谢产酸和耐酸能力也是抗龋剂的关键靶向目标<sup>[32]</sup>。*S. mutans* 具有广泛的碳水化合物代谢的能力, 能够迅速代谢来自宿主饮食中的碳水化合物, 这使得它能在牙齿表面生存和繁殖并产生酸。临界 pH 值(pH 5.0–5.5)对于牙釉质脱矿和再矿化之间的平衡非常重要。如果因酸积累而导致周围溶液的 pH 值低于临界 pH 值, 牙齿就会脱矿质, 随后就会引发龋齿<sup>[33]</sup>。以底物为葡萄糖测量 *S. mutans* 糖酵解 pH 下降发现, 随着桑酮 G 浓度的增加, pH 下降的初始速率逐渐减小, MIC 浓度的桑酮 G 的最终 pH 值高于牙齿腐坏临界 pH 值(pH 5.0–5.5), 同时在不影响 *S. mutans* 正常生长的浓度下, 发现 1/2MIC 浓度的桑酮 G 也能降低游离 *S. mutans* 的产酸能力。在测量耐酸性时发现在桑酮 G 的作用下, pH 5.0 时会降低 *S. mutans* 的存活率, 此外, 糖酵解 pH 下降测定中的最终 pH 值也反映了酸耐受性。实时定量 PCR 显示桑酮 G 能够降低生物被膜当中 *ldh*、*atpF* 基因的 mRNA 转录水平, 这些发现都表明桑酮 G 会破坏 *S. mutans* 的产酸性、耐酸性, 从而防止牙齿被酸腐坏。

在生物被膜形成的过程中, *S. mutans* 需要多种不同的基因, 通过一系列的调控来控制黏附、生物被膜形成能力。VicRK 信号转导系统已知可控制 *gtf* 基因和生物被膜形成, *vicK* 的缺陷会导致 *S. mutans* 的 *gtfB*、*gtfC*、*gtfD*、*gbpB* 等基因表达下调, 葡聚糖合成和生物被膜形成减少, 形成的生物被膜疏松、EPS 更薄<sup>[34]</sup>。ComDE 对生物被膜相关基因如 *gtfB*、*gtfC* 和 *gbpB* 有正向调节作用, ComDE 途径失活则导致生物被膜缺陷<sup>[26]</sup>。通过实时定量 PCR 结果发现, 1/2MIC 的桑酮 G 能显著抑制 *vicK*、*comD* 的

mRNA 水平, 这意味着它可以通过下调 *vicK*、*comD* 的表达, 进而对其他的毒力基因及生物被膜形成起到抑制作用。Viszwapriya 等<sup>[15]</sup>在研究桦木醇对 *S. mutans* 的影响时发现, 240  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的桦木醇能够靶向抑制 *vicRK* 和 *gtf* 基因从而抑制 *S. mutans* 的致龋特性。本研究同样也发现桑酮 G 能够抑制 *vicK*、*comD* 和 *gtf* 基因的 mRNA 转录水平, 从而对其黏附、产酸、耐酸和生物被膜的形成产生抑制作用。

不同的天然产物对 *S. mutans* 的毒力特征的影响不尽相同。本文从毒力基因的表达、产酸性、耐酸性及对生物被膜的抑制作用等方面探讨了桑酮 G 对 *S. mutans* 毒力特征的影响, 桑酮 G 可以抑制 *vicK*、*comD*、*gtfs* 等基因的表达, 降低生物被膜中水不溶性多糖的含量, 从而使得生物被膜变得稀疏松散、不完整, 同时还能破坏 *S. mutans* 的产酸性和耐酸性, 多方位对 *S. mutans* 致龋特征产生抑制效果。相关研究表明<sup>[10]</sup>, 桑酮 G 对 HepG2 和 Vero 细胞具有一定的细胞毒性,  $IC_{50}$  值分别为 114.8、92.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而其  $Hly_{50}$  值为 19.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。尽管如此, 低浓度的桑酮 G 可能不会对口腔黏膜和细菌产生明显影响, 但是会降低 *S. mutans* 的毒力特征。然而, 将其用于口腔洗漱用品需要进一步的安全性评估, 以确保其在口腔环境中的安全性和有效性。综合考虑其对 *S. mutans* 毒力特征的影响, 将其加入牙膏、漱口水和口香糖中或与氟化物联合使用可能是预防和治疗牙菌斑的更好策略, 但有必要在动物模型上进行疗效, 以指导实际使用。

## REFERENCES

- [1] KONG JH, XIA K, SU XQ, ZHENG X, DIAO CH, YANG XF, ZUO XB, XU J, LIANG XL. Mechanistic insights into the inhibitory effect of theaflavins on virulence factors production in *Streptococcus mutans*[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 102.
- [2] FILOCHE SK, SOMA K, SISSONS CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with

- chlorhexidine digluconate[J]. *Oral Microbiology and Immunology*, 2005, 20(4): 221-225.
- [3] ZHU JY, CHU WL, LUO J, YANG JJ, HE LB, LI JY. Dental materials for oral microbiota dysbiosis: an update[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 900918.
- [4] GAN WJ, GAO CL, ZHANG WQ, GU JL, ZHAO TT, GUO HL, ZHOU H, XU Y, YU LL, LI LF, GUI DK, XU YH. Kuwanon G protects HT22 cells from advanced glycation end product-induced damage[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2021, 21(5): 425.
- [5] LIU XX, ZHANG XW, WANG K, WANG XY, MA WL, CAO W, MO D, SUN Y, LI XQ. Kuwanon G attenuates atherosclerosis by upregulation of LXR $\alpha$ -ABCA1/ABCG1 and inhibition of NF $\kappa$ B activity in macrophages[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2018, 341: 56-63.
- [6] JIN SE, HA H, SHIN HK, SEO CS. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of kuwanon G and morusin on MC/9 mast cells and HaCaT keratinocytes[J]. *Molecules*, 2019, 24(2): 265.
- [7] PARK KM, YOU JS, LEE HY, BAEK NI, HWANG JK. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 84(2/3): 181-185.
- [8] PANG DR, LIAO ST, WANG WF, MU LX, LI EN, SHEN WZ, LIU F, ZOU YX. Destruction of the cell membrane and inhibition of cell phosphatidic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: an explanation for the antibacterial mechanism of morusin[J]. *Food & Function*, 2019, 10(10): 6438-6446.
- [9] WEI B, YANG W, YAN Z X, ZHANG Q W, YAN R. Prenylflavonoids sanggenon c and kuwanon G from mulberry (*Morus alba* L.) as potent broad-spectrum bacterial  $\beta$ -glucuronidase inhibitors: biological evaluation and molecular docking studies[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 48: 210-219.
- [10] WU SC, HAN F, SONG MR, CHEN S, LI Q, ZHANG Q, ZHU K, SHEN JZ. Natural flavones from *Morus alba* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via targeting the proton motive force and membrane permeability[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(36): 10222-10234.
- [11] TAKENAKA S, ODA M, DOMON H, OHSUMI T, SUZUKI Y, OHSHIMA H, YAMAMOTO H, TERAOKA Y, NOIRI Y. Vizantin inhibits bacterial adhesion without affecting bacterial growth and causes *Streptococcus mutans* biofilm to detach by altering its internal architecture[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 480(2): 173-179.
- [12] 刘一涵, 田云刚, 王建霞, 郭洪伟, 魏华. 响应曲面法优化桑白皮中3个成分的提取工艺[J]. *中国现代中药*, 2020, 22(7): 1100-1107.
- LIU YH, TIAN YG, WANG JX, GUO HW, WEI H. Optimization of extraction technology of three components in Mori cortex by response surface methodology[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2020, 22(7): 1100-1107 (in Chinese).
- [13] 刘梓萱, 杨芳, 唐双焱, 金建明, 肖俊松, 吴华. 有机栽培龙脑百里香精油对白色念珠菌体外抑菌活性的研究[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(2): 642-654.
- LIU ZX, YANG F, TANG SY, JIN JM, XIAO JS, WU H. *In vitro* inhibitory activity of organic *Thymus vulgaris* CT borneol essential oil against *Candida albicans*[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(2): 642-654 (in Chinese).
- [14] 何学文, 戴雨芸, 李欣越, 何泾正, 李超, 程娇, 尹立子. 肉桂醛体外对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌机制[J]. *江西农业大学学报*, 2020, 42(1): 150-156.
- HE XW, DAI YY, LI XY, HE JZ, LI C, CHENG J, YIN LZ. Antibacterial mechanism of cinnamaldehyde on *Salmonella typhimurium* in vitro[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2020, 42(1): 150-156 (in Chinese).
- [15] VISZWAPRIYA D, SUBRAMENIUM GA, RADHIKA S, PANDIAN SK. Betulin inhibits cariogenic properties of *Streptococcus mutans* by targeting *vicRK* and *gtf* genes[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(1): 153-165.
- [16] 张一博, 张仲, 董千雨, 蔡锦林, 周慧灵, 王学润, 李雨庆, 王国庆. 桂皮醛对口腔链球菌多菌种生物膜的抑制作用[J]. *现代预防医学*, 2023, 50(7): 1304-1309, 1332.
- ZHANG YB, ZHANG Z, DONG QY, CAI JL, ZHOU HL, WANG XR, LI YQ, WANG GQ. Inhibitory effect of cinnamaldehyde on multi-species biofilm of oral streptococci[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2023, 50(7): 1304-1309, 1332 (in Chinese).
- [17] COFFEY BM, ANDERSON GG. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1149: 631-641.
- [18] GUAN CR, CHE FA, ZHOU HX, LI YW, LI YR, CHU JP. Effect of rubusoside, a natural sucrose substitute, on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic potential and virulence gene expression *in vitro*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): e01012-20.
- [19] WANG S, WANG Y, WANG Y, DUAN ZH, LING ZX, WU WZ, TONG SM, WANG HM, DENG SL. Theaflavin-3,3'-digallate suppresses biofilm formation, acid production, and acid tolerance in *Streptococcus mutans* by targeting virulence factors[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1705.
- [20] HE ZY, HUANG ZW, JIANG W, ZHOU W. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde on *Streptococcus mutans* biofilms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2241.
- [21] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3: 163-175.
- [22] LIAO SM, KLEIN MI, HEIM KP, FAN YW, BITOUN JP, AHN SJ, BURNE RA, KOO H, BRADY LJ, WEN ZT. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(13): 2355-2366.
- [23] BOWEN WH, KOO H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms[J]. *Caries Research*, 2011, 45(1): 69-86.
- [24] FUJITA K, TAKASHIMA Y, INAGAKI S, NAGAYAMA K, NOMURA R, ARDIN AC, GRÖNROOS L, ALALUUSUA S, OOSHIMA T, MATSUMOTO-NAKANO M. Correlation of biological

- properties with glucan-binding protein B expression profile in *Streptococcus mutans* clinical isolates[J]. Archives of Oral Biology, 2011, 56(3): 258-263.
- [25] LEI L, LONG L, YANG X, QIU Y, ZENG YL, HU T, WANG SD, LI YQ. The VicRK two-component system regulates *Streptococcus mutans* virulence[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2019, 32: 167-200.
- [26] KAUR G, BALAMURUGAN P, PRINCY SA. Inhibition of the quorum sensing system (ComDE pathway) by aromatic 1,3-di-m-tolylurea (DMTU): cariostatic effect with fluoride in wistar rats[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 313.
- [27] CASTILLO PEDRAZA MC, NOVAIS TF, FAUSTOFERRI RC, QUIVEY RG Jr, TEREKHOV A, HAMAKER BR, KLEIN MI. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms[J]. Biofouling, 2017, 33(9): 722-740.
- [28] KUANG XY, CHEN V, XU X. Novel approaches to the control of oral microbial biofilms[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 6498932.
- [29] YAMASHITA Y, BOWEN WH, BURNE RA, KURAMITSU HK. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model[J]. Infection and Immunity, 1993, 61(9): 3811-3817.
- [30] 张耀超, 左艳萍, 周芳, 唐成芳, 张琳梅. 落叶松脂醇-4-β-D-吡喃葡萄糖苷抑制变异链球菌生长和生物膜形成的作用研究[J]. 微生物学报, 2020, 60(7): 1479-1487.
- ZHANG YC, ZUO YP, ZHOU F, TANG CF, ZHANG LM. Effect of lariciresinol-4-beta-D-glucopyranoside on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(7): 1479-1487 (in Chinese).
- [31] WU JY, FAN Y, WANG XY, JIANG XG, ZOU J, HUANG RJ. Effects of the natural compound, oxyresveratrol, on the growth of *Streptococcus mutans*, and on biofilm formation, acid production, and virulence gene expression[J]. European Journal of Oral Sciences, 2020, 128(1): 18-26.
- [32] BANAS JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*[J]. Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library, 2004, 9: 1267-1277.
- [33] PANDIT S, CHANG KW, JEON JG. Effects of *Withania somnifera* on the growth and virulence properties of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at sub-MIC levels[J]. Anaerobe, 2013, 19: 1-8.
- [34] DENG YL, YANG YM, ZHANG B, CHEN H, LU YY, REN SR, LEI L, HU T. The *vicK* gene of *Streptococcus mutans* mediates its cariogenicity via exopolysaccharides metabolism[J]. International Journal of Oral Science, 2021, 13: 45.