

论著·基础研究

Nd: YAG 激光对具核梭杆菌的杀灭作用

吴一凡, 宋忠臣, 束 蓉

上海交通大学医学院附属第九人民医院牙周科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011

[摘要] **目的**·观察 Nd: YAG 激光对具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 的杀灭效果。**方法**·使用结晶紫染色, 观察 Nd: YAG 激光对浮游状态 *F. nucleatum* 成膜能力的影响; 运用激光共聚焦显微镜扫描分析, 观察激光对单菌种生物膜中 *F. nucleatum* 活力的影响; 使用扫描电子显微镜技术, 观察激光对单菌种生物膜中 *F. nucleatum* 结构的破坏。**结果**·激光照射 15 s 对浮游状态下 *F. nucleatum* 成膜能力有抑制作用, 激光照射 35 s 对生物膜状态下 *F. nucleatum* 活力产生抑制。激光能破坏生物膜及生物膜中细菌的结构, 且随光照时间延长, 破坏程度增加。**结论**·Nd: YAG 激光能够抑制浮游状态 *F. nucleatum* 的成膜能力, 对单一菌种生物膜中细菌活力和细菌结构产生破坏, 从而达到杀菌效果。

[关键词] 牙周致病菌; 生物膜; Nd: YAG 激光; 体外实验

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.03.004 **[中图分类号]** R781.4 **[文献标志码]** A

Antibacterial effect of Nd: YAG laser on *Fusobacterium nucleatum*

WU Yi-fan, SONG Zhong-chen, SHU Rong

Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Department of Periodontology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the antibacterial effect of Nd: YAG laser on *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) *in vitro*. **Methods**·The laser effect on the biofilm formation ability of planktonic *F. nucleatum* were observed by crystal violet test; confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to detect the effect on the bacteria viability of mature biofilm; scanning electron microscopy (SEM) was performed to investigate the effect on the morphology of mature biofilm. **Results**·After 15 s radiation the biofilm formation ability of *F. nucleatum* went down. The viability of *F. nucleatum* in mature biofilm went down under 35 s irradiation. The deformation of mature biofilm and bacterium became distinguished with the irradiation time raised. **Conclusion**·Nd: YAG laser shows the inhibition of biofilm formation ability on planktonic *F. nucleatum*. The vitality of *F. nucleatum* in mature biofilm is depressed after laser radiation. Laser can destroy the construction of the mature biofilm and bacteria.

[Key words] periodontal pathogens; biofilm; Nd: YAG laser; *in vitro* experiment

慢性牙周炎是以菌斑为始动因子、牙周组织破坏为特征的多因素慢性炎症性疾病, 是导致成人失牙的主要原因。其中牙周致病菌, 如具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*)、牙龈卟啉单胞菌等在牙周炎的发生、发展中具有重要作用^[1-2]。具核梭杆菌属于革兰阴性菌, 在牙周炎患者中检出率明显高于正常人群, 被认为是革兰阴性菌和阳性菌之间交流的核心菌种^[3]。控制菌斑是牙周疾病防治的关键。传统的去除菌斑的方法包括机械性去除、局部消毒药物和全身抗菌药物的使用等^[1]。

自 1900 年 Maiman 发明了第一台激光仪器以来, 因其优秀的软硬组织切割能力和强力的止血消毒作用, 在口腔治疗方面的运用越来越广泛, 激光种类也日趋丰富。

1997 年美国食品药品监督管理局 (FDA) 提出 Nd: YAG 激光可作为牙龈沟内清创手段, 是 FDA 批准的第一种运用于牙周治疗的激光^[4]。Nd: YAG 激光属于固体激光的一种^[5], 这种近红外波长 (1 064 nm) 的激光容易被黑色素组织吸收; 而多数牙周优势致病菌则是能产生黑色素或者因聚集血红素和血红蛋白而呈现黑色的革兰阴性菌。

目前, 对于激光的研究多数集中在其对于浮游细菌的作用及临床应用方面^[6-9]。因此, 本实验通过观察 Nd: YAG 激光对具核梭杆菌单一菌种的生物膜的作用, 探讨 Nd: YAG 激光对于浮游细菌的成膜能力以及生物膜状态下的细菌活力和结构的抑制作用, 为进一步探讨 Nd: YAG 激光的生物学作用提供实验证据。

[基金项目] 国家自然科学基金 (81570977) (National Nature Science Foundation of China, 81570977)。

[作者简介] 吴一凡 (1991—), 男, 住院医师, 硕士生; 电子信箱: wuyifan10shanghai@163.com。

[通信作者] 束 蓉, 电子信箱: shurong1977@163.com。



1 材料与方法

1.1 实验材料

掺钕钇铝石榴石激光[丹麦(中国)牙科激光有限公司],实验细菌 *F. nucleatum* (ATCC 25586, 由上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔微生物实验室提供), 活死菌荧光染料 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen, 美国), 激光共聚焦显微镜 Leica TCS SP (徕卡显微系统有限公司, 德国), 扫描电子显微镜 (SEM) JSM-6360LV (JEOL, HITACHI, 日本)。

1.2 细菌培养及纯度鉴定

从 -80 ℃ 冰箱取出 *F. nucleatum* 的冻存管, 于超净台中溶解, 吸取 30 μL 菌液滴于固体培养基上, 四区划线法进行涂布, 厌氧培养箱中培养。厌氧培养箱气体成分为 75% 氮气、15% 氢气和 5% 二氧化碳, 培养温度为 37 ℃ 恒温。培养 24 ~ 36 h 可以形成菌落。使用革兰染色进行纯度鉴定。

1.3 激光对浮游 *F. nucleatum* 成膜能力的影响

结晶紫能够将细菌的细胞外基质染色, 通过酶标仪测量结晶紫染色的深度可以测定形成生物膜的量。如果实验组的测量值与对照组的差异具有统计学意义, 在结晶紫染色实验的检验精度下, 可以认为激光对于该浓度细菌的成膜能力产生了影响。

1.3.1 菌液稀释 文献^[10]报道 *F. nucleatum* 体外培养 24 ~ 36 h 能形成生物膜。具核梭杆菌接种至培养液中厌氧培养 24 ~ 36 h, 使用 BHI 培养液稀释菌液, 用紫外分光光度仪设定波长为 600 nm, 测量吸光度 $D(600\text{ nm})$ 。将 $D(600\text{ nm})$ 为 0.135 ~ 0.150 的混合溶液作为原液, 按 1:100 和 1:200 稀释原液后分别接种到 96 孔板, 每孔 200 μL。

1.3.2 实验分组 实验组(组 1 ~ 组 5)以激光照射菌液, 时间分别为 15、25、35、45、60 s, 每组 4 个复孔; 对照组(Con 组)菌液不作处理。

1.3.3 激光照射 激光设置无水无气模式, 功率 6 W。激光照射过程中, 96 孔板置于冰盒冷却。消毒后光导纤维伸入菌液当中划动, 注意不要触碰孔壁和孔底。按规定时间完成一个孔的光照后切去变性光纤, 用炭笔激活, 乙醇擦拭接触部分。待乙醇挥发后进行下一个培养孔的照射, 依次完成照射所有复孔。

1.3.4 结晶紫染色 光照结束后, 96 孔板置于厌氧培养箱继续培养。24 ~ 36 h 后取出, 进行结晶紫染色。设定酶标仪波长为 550 nm, 扫描 96 孔板导出读数。

1.4 激光对生物膜中 *F. nucleatum* 活力的影响

1.4.1 生物膜制备 用培养液稀释调节菌液浓度至 3×10^6 CFU/mL。接种菌液到 6 孔板中, 每孔 2 mL, 并于 6 孔板中放置高温高压灭菌后的盖玻片 (24 mm × 24 mm)。6 孔板放置于厌氧培养箱中培养 24 ~ 36 h, 制备生物膜。结晶紫染色确定生物膜制备完成。

1.4.2 实验分组 实验组中, 组 1 菌液仅进行激光纤维机械划动, 无激光照射; 组 2 ~ 组 5 菌液依次光照 25、35、45、60 s; 对照组(Con 组)菌液不作处理。

1.4.3 激光照射 激光设置无水无气模式, 功率 6 W。从培养箱中取出 6 孔板放置于冰盒中, 使用炭笔激活光导纤维后对实验组中盖玻片上的生物膜进行激光照射。照射过程中, 光导纤维接触生物膜并来回划动。按照预定时间完成一个孔中生物膜照射后, 使用切割刀切去焦黑变性的光导纤维, 用炭笔激活并用乙醇擦拭, 待乙醇挥发后进行下一孔照射。

1.4.4 激光共聚焦扫描 将荧光染料 SYTO 9、荧光染料 PI、磷酸缓冲液 (PBS) 按照 1.5:1.5:200 的体积比混合配制荧光染液 300 μL, 充分混匀后避光备用。

将激光照射后的 6 孔板小心弃去培养液, 无菌 PBS 洗 2 次, 小心弃去 PBS 后, 每孔加入 50 μL 配制好的荧光染液覆盖盖玻片上的生物膜, 于室温下避光孵育 15 min 后, 进行激光共聚焦显微镜扫描检测。记录影像以及相应的平均荧光强度。

1.5 激光对生物膜中 *F. nucleatum* 结构的作用

生物膜制备和实验分组同前。将激光照射后的 6 孔板培养液小心吸去, 加入无菌 PBS 清洗 2 次并弃去后, 采用 2.5% 戊二醛固定, 4 ℃ 冰箱过夜。去离子水与无水乙醇配制不同浓度乙醇溶液, 按照 30%、50%、70%、80%、90%、95% 各浓度从小到大依次梯度脱水 15 min, 最后采用 100% 乙醇脱水 30 min, 将盖玻片于超净台内风干。风干后的样本经过喷金处理后, 进行 SEM 检测。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。两两比较采用单因素方差分析和 LSD 法, $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌纯度鉴定

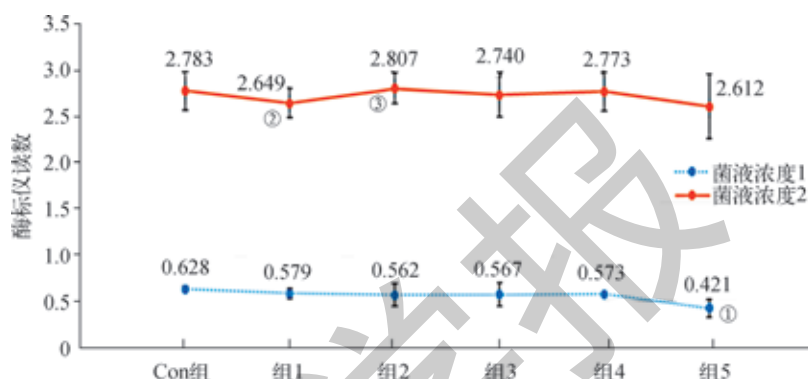
培养皿平板划线培养 *F. nucleatum* 24 ~ 36 h, 在 BHI 固体培养基上形成形态均一的单克隆菌落。菌落半透明、

扁平且中央凸起, 呈面包屑或玻璃屑状。未见其他形态菌落形成。革兰染色鉴定, 菌体呈红色、梭杆状、两端尖锐, 符合革兰阴性的染色特点以及形态特点, 且未见其他杂菌, 提示 *F. nucleatum* 为纯化的细菌。

2.2 激光对浮游 *F. nucleatum* 成膜能力的影响

使用结晶紫染色观察, 导出不同浓度的 *F. nucleatum* 在

不同激光照射时间下的读数并整理 (图 1)。在 *F. nucleatum* 浓度为 1.5×10^6 CFU/mL 时, Con 组和组 1、组 2、组 3、组 4 之间两两比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 组 5 与其余各组之间比较, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。在 *F. nucleatum* 浓度为 3×10^6 CFU/mL 时, Con 组与组 1、Con 组与组 2 之间比较, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 但组 1 与组 2 之间比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: 菌液浓度 1 为 1.5×10^6 CFU/mL; 菌液浓度 2 为 3×10^6 CFU/mL。菌液浓度 1 中, ^a $P=0.000$, 与 Con 组比较; 菌液浓度 2 中, ^a $P=0.035$, ^b $P=0.036$, 与 Con 组比较。

图 1 2 种浓度的浮游 *F. nucleatum* 在不同时间光照后的酶标仪读数

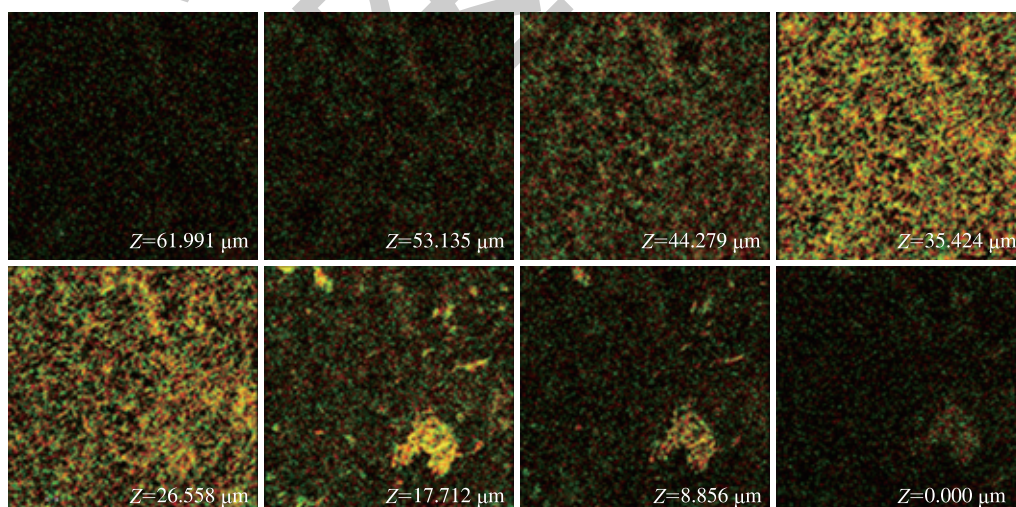
Fig 1 Microplate reader on two concentrations of planktonic *F. nucleatum* under at different raidation time

2.3 激光对生物膜中 *F. nucleatum* 活力的影响

记录每组的共聚焦显微镜影像, 测量载玻片上细菌的厚度。绿色荧光表示活菌, 红色荧光表示死菌, 混合荧光表示活菌和死菌拟合图像 (图 2, 图 3)。激光共聚焦显微镜观察发现, 不同垂直高度均能检测到 *F. nucleatum* 的存在且具有一定形态, 证明激光照射前细菌已经形成一定厚度的生物膜, 因此能够进行进一步实验。此外, 记录每组不同视野下的单视野的平均荧光强度, 绿色荧光的强度与

红色荧光强度的比值代表活菌和死菌数量的比值, 比值越大表示活菌数量越多 (图 4)。荧光强度改变, 表明从 Con 组到组 5 中随激光照射时间的延长, 生物膜中活菌数量减少, 死菌数量增加, 总的细菌数量减少, 生物膜变得稀薄。

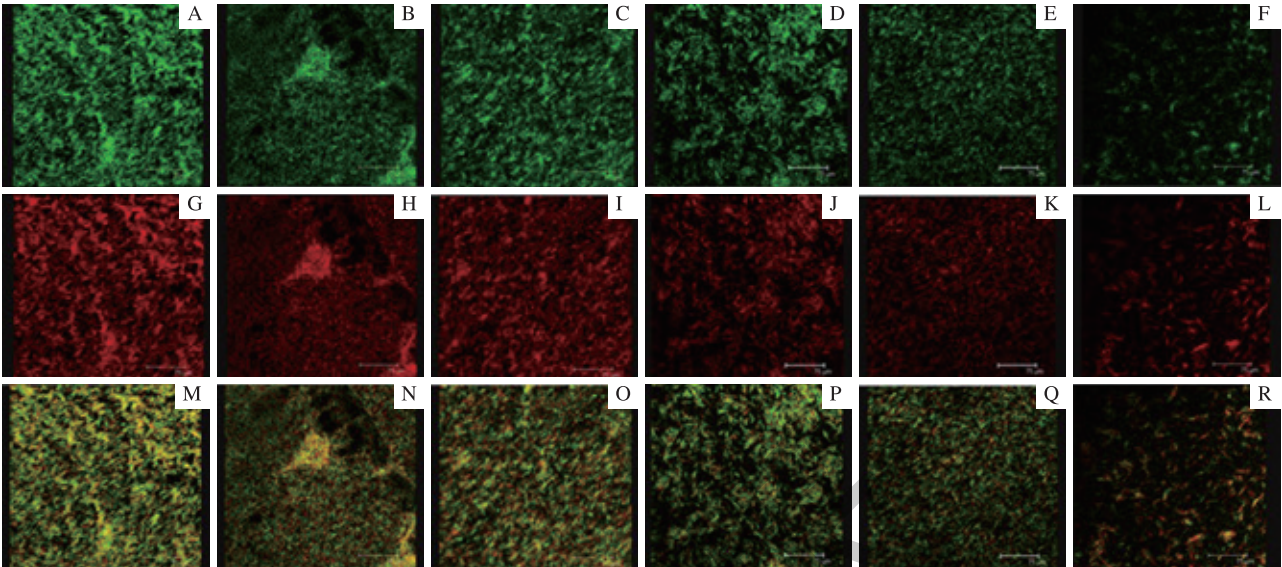
Con 组分别与组 3、组 4、组 5 进行两两比较, 差异均有统计学意义 ($P=0.004$, $P=0.001$, $P=0.000$); 组 3 与组 4 比较, 差异无统计学意义 ($P=0.749$)。



注: Z 值为垂直高度。

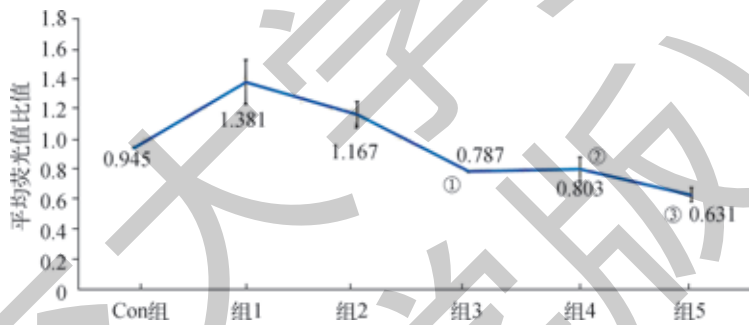
图 2 激光共聚焦显微镜观察激光照射前不同垂直高度 *F. nucleatum* 的水平层面图 ($\times 200$)

Fig 2 Horizontal views of *F. nucleatum* under in different layer through confocal laser scanning microscopy before laser radiation ($\times 200$)



注：A ~ F 表示绿色荧光染色的生活状态细菌；G ~ L 表示红色荧光染色的死亡状态的细菌；M ~ R 表示红色荧光和绿色荧光拟合后图像。

图 3 不同光照时间下激光共聚焦扫描显微镜观察 *F. nucleatum* 生物膜 (×200)
Fig 3 *F. nucleatum* biofilm at different radiation time by confocal laser scanning microscope (×200)



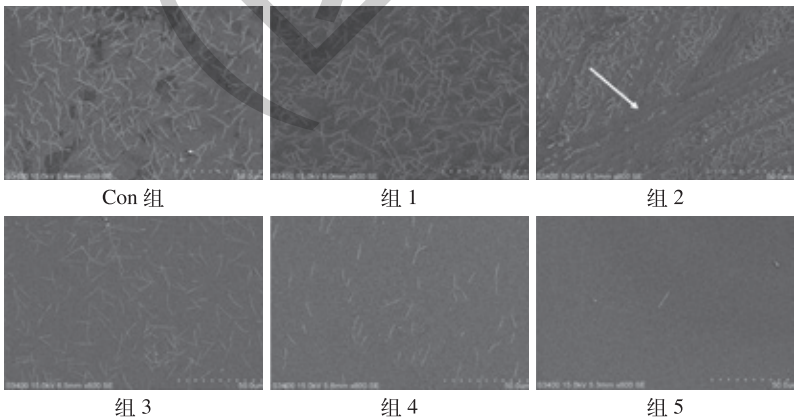
注：① $P=0.004$ ，② $P=0.001$ ，③ $P=0.000$ ，与 Con 组比较。

图 4 不同激光照射时间下的平均荧光值比值
Fig 4 Ratio of average fluorescence value of *F. nucleatum* at different radiation time

2.4 激光对生物膜中 *F. nucleatum* 结构的作用

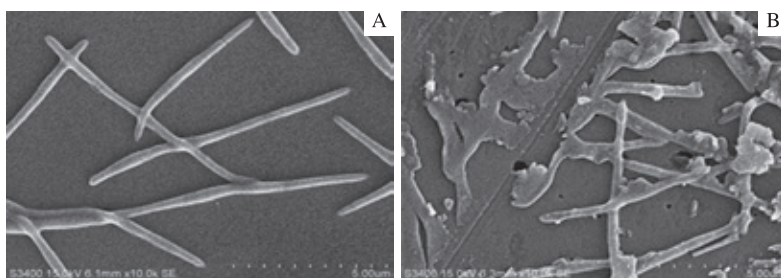
SEM 观察生物膜中 *F. nucleatum* 的形态 (图 5)。Con 组分布均匀，组 1 仅有形态紊乱，组 2 ~ 组 5 有菌体及生

物膜形态破坏，细菌减少。局部可以观察到生物膜中的细菌在激光作用下的形态破坏 (图 6)。



注：Con 组中可见 *F. nucleatum* 菌体完整，分布均匀；组 1 仅机械划动，菌体完整，但分布不均匀；组 2 ~ 5 随光照时间延长，生物膜中完整的细菌数减少，变形、破坏的细菌数增加且总细菌数减少。箭头示菌体发生破坏、消失；界限分明表明接触式激光在接触部位产生杀菌效果，而非接触部位则没有。

图 5 SEM 观察不同光照时间对 *F. nucleatum* 生物膜的影响 (×800)
Fig 5 SEM images of *F. nucleatum* biofilm at different radiation time (×800)



注: A. 组 1 可见细菌形态完整, 表明仅机械划动对细菌形态没有破坏作用; B. 组 2 可见光导纤维划过路径上菌体被破坏, 在交界处可见部分被破坏的菌体, 在途径之外细菌菌体基本完整。箭头处可见载玻片出现破坏, 痕迹与激光运动轨迹一致。

图 6 *F. nucleatum* 生物膜中随机选取一个划痕交界位点的 SEM 观察 ($\times 10\ 000$)

Fig 6 SEM images of one random spot on fiber moving route in *F. nucleatum* biofilm ($\times 10\ 000$)

3 讨论

F. nucleatum 属于黄色复合体, 与中晚期牙周炎关系紧密^[11], 参与牙周菌斑生物膜的形成, 而且可以通过修饰其他口腔致病菌表面结构, 增强细菌抵抗能力。现有临床研究^[12-14]以及体外研究^[7]表明, Nd: YAG 激光能使细菌发生汽化, 细胞壁破裂, 蛋白质发生变性、凝固、坏死, 从而杀死细菌, 改善探诊深度及临床附着丧失, 改变革兰阳性和阴性菌的数量及比例等临床指标; 但对于 Nd: YAG 激光作用于牙周致病菌的体外细菌生物膜的研究较少。本实验通过体外构建 *F. nucleatum* 单一菌种的生物膜, 探讨 Nd: YAG 激光对于生物膜以及生物膜中细菌的作用及可能的作用机制, 为该激光的临床应用提供实验室数据支持。

本实验结果显示, 当菌液浓度为 3×10^6 CFU/mL 时, 光照 15 s 就可以抑制浮游细菌形成生物膜的能力, 敏感度高。生物膜状态的 *F. nucleatum* 受激光照射 35 s 后, 活菌数减少、死菌数增加, 与对照组相比, 差异具有统计学意义。生物膜中杀菌所需光照阈值更高, 表明牙周致病菌在

生物膜状态下, 对于外界不利因素的抵抗能力比浮游状态更强^[15]。临床研究^[16]显示, 激光能量输出达到某一阈值时, 对生物膜状态中 *F. nucleatum* 能产生抑制作用。

本实验发现, 接触式的 Nd: YAG 激光主要的杀菌机制是激光的光化学作用导致菌体破坏、消失, 可以观察到盖玻片上与光导纤维运动轨迹一致的划痕, 猜测接触式激光在破坏生物膜和细菌的同时可能穿透菌斑生物膜对牙周袋内壁产生破坏作用。Ting 等^[17]的临床研究发现, 激光能够去除有炎症的袋内壁上皮, 而不损伤健康的袋内壁上皮。有体外研究^[18]发现, 使用 Nd: YAG 激光照射配合超声洁治, 可利于牙周炎患牙治疗后的结缔组织附着; 但是, Dilsiz 等^[19]的实验却提出了相反的观点, 即认为激光辅助根面处理并不能提高结缔组织附着能力。故 Nd: YAG 激光的穿透性需要更多的研究证实。

综上所述, Nd: YAG 激光达到光照阈值后能抑制浮游状态 *F. nucleatum* 形成生物膜的能力, 也能够对单一菌种生物膜状态的 *F. nucleatum* 产生杀灭作用。激光可对 *F. nucleatum* 生物膜的结构造成破坏, 继而产生杀菌作用, 可以作为牙周病非手术治疗的辅助治疗工具。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Martelli FS, Fanti E, Rosati C, et al. Long-term efficacy of microbiology-driven periodontal laser-assisted therapy[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(3): 423-431.
- [2] Thurnheer T, Belibasakis GN, Bostanci N. Colonisation of gingival epithelia by subgingival biofilms *in vitro*: role of "red complex" bacteria[J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(9): 977-986.
- [3] Han YW. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen[J]. Curr Opin Microbiol, 2015, 23: 141-147.
- [4] Akpınar A, Tokar H, Lektremur Alpan A, et al. Postoperative discomfort after Nd: YAG laser and conventional frenectomy: comparison of both genders[J]. Aust Dent J, 2016, 61(1): 71-75.
- [5] Chatterjee S, Chaubey KK, Arora VK, et al. Lasers in oral soft tissue surgical therapy: a review[J]. J Adv Res Biol Sci, 2014, 6(2): 176-183.
- [6] Gutknecht N, van Betteray C, Ozturan S, et al. Laser supported reduction of specific microorganisms in the periodontal pocket with the aid of an Er, Cr: YSGG laser: a pilot study[J]. Sci World J, 2015 (3/4): 450258.
- [7] Kranendonk A, van der Reijden W, van Winkelhoff A, et al. The bactericidal effect of a Genius Nd: YAG laser[J]. Int J Dent Hyg, 2010, 8(1): 63-67.
- [8] Cobb CM. Commentary: is there clinical benefit from using a diode or neodymium: yttrium-aluminum-garnet laser in the treatment of periodontitis?[J]. J Periodontol, 2016, 87(10): 1117.
- [9] Annaji S, Sarkar I, Rajan P, et al. Efficacy of photodynamic therapy and lasers as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a clinical and microbiologic short term study[J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(2): ZC08.
- [10] Fontana CR, Song X, Polymeri A, et al. The effect of blue light on periodontal biofilm growth *in vitro*[J]. Lasers Med Sci, 2015, 30(8): 2077-2086.
- [11] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25(2): 134-144.
- [12] 吴一凡, 束蓉. Nd: YAG 激光对牙周致病菌作用的研究进展 [J]. 口腔生物

医学, 2016, 7 (2): 87-89.

- [13] Pirnat S, Lukac M, Ihan A. Study of the direct bactericidal effect of Nd: YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria[J]. Lasers Med Sci, 2011, 26(6): 755-761.
- [14] Giovannacci I, Mergoni G, Meleti M, et al. Postoperative discomfort in oral soft tissue surgery: a comparative perspective evaluation of Nd: YAG Laser, quantic molecular resonance scalpel and cold blade[J]. Minerva Stomatol, 2015, 64(1): 9-20.
- [15] Sgolastra F, Severino M, Petrucci A, et al. Nd: YAG laser as an adjunctive treatment to nonsurgical periodontal therapy[J]. Lasers Med Sci, 2014, 29(3): 887-895.
- [16] Park JH, Lee JK, Um HS, et al. A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm[J]. J Periodontal Implant Sci, 2014, 44(2): 79-84.
- [17] Ting CC, Fukuda M, Watanabe T, et al. Morphological alterations of periodontal pocket epithelium following Nd: YAG laser irradiation[J]. Photomed Laser Surg, 2014, 32(12): 649-657.
- [18] Negi S, Krishnamurthy M, Ganji KK, et al. Modulatory effects by neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser on fibroblast attachment to single rooted tooth surfaces following ultrasonic scaling and root planning: an *in vitro* study[J]. J Indian Soc Periodontol, 2015, 19(1): 25.
- [19] Dilsiz A, Aydin T, Canakci V, et al. Root surface biomodification with Nd: YAG laser for the treatment of gingival recession with subepithelial connective tissue grafts[J]. Photomed Laser Surg, 2010, 28(3): 337-343.

[收稿日期] 2017-11-12

[本文编辑] 吴 洋

学术快讯

上海交通大学医学院 3 人入选第三批 国家“万人计划”

2018 年初, 中共中央组织部办公厅发布了《关于印发第三批国家“万人计划”入选名单的通知》。上海交通大学医学院共 3 人入选, 其中附属瑞金医院赵维莅入选“万人计划”科技创新领军人才, 基础医学院高小玲、附属瑞金医院曹亚南入选“万人计划”青年拔尖人才。

截至目前, 上海交通大学医学院共有 3 人入选“万人计划”百千万工程领军人才, 2 人入选“万人计划”科技创新领军人才, 5 人入选“万人计划”青年拔尖人才。



赵维莅, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师。上海血液学研究所常务副所长, 上海交通大学医学院附属瑞金医院血液内科副主任。主要从事淋巴细胞恶性疾病的临床和基础研究。



高小玲, 博士, 研究员, 博士生导师。主要从事脑部药物递送和相关神经药理学研究。以阿尔茨海默病和脑胶质瘤为主要疾病类型, 以安全、有效、精准为设计理念, 基于仿生构建、经鼻入脑、靶向核心致病物质和靶向小胶质细胞等关键策略, 完成一系列新型纳米递释系统的设计、构建和功能研究。



曹亚南, 博士, 研究员, 博士生导师。主要聚焦于内分泌肿瘤和 2 型糖尿病的临床和基础研究, 重点开展相关疾病的遗传、分子机制和干预研究。