

基于 Box Behnken 响应面法优化口腔模拟环境 IgY 抑制 牙龈卟啉单胞菌增殖

王芳¹ 周喻¹ 许啸晨⁴ 包斌¹ 吴文惠^{2,3*}

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

(2. 上海水产品加工与贮藏工程技术研究中心 上海 201306)

(3. 上海海洋大学海洋科学研究院 上海 201306)

(4. 上海美加净日化有限公司 上海 200333)

摘要:【目的】利用 Box Behnken 响应面法研究免疫球蛋白 Y (IgY)影响牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)的生长繁殖特性,发现口腔模拟环境中 *P. gingivalis* 的响应值与 IgY 剂量、初始 *P. gingivalis* 数量、培养时间的关系。【方法】以 *P. gingivalis* 最终的菌落数为评价指标,通过单因素试验研究培养时间、IgY 剂量和初始 *P. gingivalis* 数量的最佳条件,再依据 Box Behnken 中心组合原则设计三因素三水平响应面试验进行优化,评价 IgY 的抑制效果。优化得到的试验条件重复 3 次,以验证模型的准确性。【结果】单因素试验结果表明,以 180 mmol/L 的 IgY 剂量, 2×10^6 CFU/mL 的初始 *P. gingivalis* 数量, 37 °C 厌氧培养 4 h, 口腔模拟环境 IgY 对 *P. gingivalis* 繁殖的影响达到最佳状态。通过 Design Expert 8.0 软件对回归方程的分析得到各因素最佳条件为: IgY 剂量 165 mmol/L、初始 *P. gingivalis* 数量 2×10^6 CFU/mL、培养时间 4.5 h。采用优化实验条件,重复 3 次试验, *P. gingivalis* 最终菌落数是 5.92×10^5 CFU/mL,与模型预测值 5.85×10^5 CFU/mL 相对误差 1%,方差分析表明模型 *P* 值显著,缺失值 *P* 值不显著,理论值与实测值拟合良好。【结论】IgY 能显著抑制牙龈卟啉单胞菌的增殖,优化后口腔模拟环境中的 *P. gingivalis* 最终菌落数显著降低,回归模型能够预测口腔模拟环境中 *P. gingivalis* 的增殖。

关键词: 响应面法, Box Behnken 设计, 免疫球蛋白 Y, 牙龈卟啉单胞菌

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81502955); Shanghai Three-Year Action Plan to Further Accelerate the Development of Chinese Medicine (No. ZY3-CCCX-3-3044)

*Corresponding author: Tel: 86-21-61900388; E-mail: whwu@shou.edu.cn

Received: January 23, 2017; Accepted: April 20, 2017; Published online (www.cnki.net): May 25, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81502955); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(No. ZY3-CCCX-3-3044)

*通讯作者: Tel: 86-21-61900388; E-mail: whwu@shou.edu.cn

收稿日期: 2017-01-23; 接受日期: 2017-04-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-25

Optimization of IgY inhibiting *Porphyromonas gingivalis* proliferation in oral simulation environment based on Box Behnken design response surface methodology

WANG Fang¹ ZHOU Yu¹ XU Xiao-Chen⁴ BAO Bin¹ WU Wen-Hui^{2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China)

(3. Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(4. Shanghai MAXAM Company Limited, Shanghai 200333, China)

Abstract: [Objective] Box Behnken design response surface methodology was used to optimize the colony count of IgY against *Porphyromonas gingivalis* in oral simulation environment in order to find the appropriate dose of IgY, initial density of *P. gingivalis* and culture time. [Methods] Final colony count was used as the evaluation index, on the basis of single factor tests. Box Behnken RSM was used with three factors such as number of colonies at different dose of IgY, initial density of *P. gingivalis* and culture time in the artificial saliva. The experiment was repeated three times under the optimal conditions to verify the accuracy of the model. [Results] The results of single factor test showed that IgY had the best effect on the reproduction of *P. gingivalis* by the dose of 180 mmol/L IgY, the initial amount of 2×10^6 CFU/mL *P. gingivalis* and the incubation at 37 °C for 4 h. The optimum culture conditions were as follows: dose of IgY was 165 mmol/L, the initial amount of *P. gingivalis* was 2×10^6 CFU/mL, culture time was 4.5 h. Under these conditions the final number of colonies was 5.92×10^5 CFU/mL. Compared with the predicted value of 5.85×10^5 CFU/mL, the relative error with the theoretical value was 1%. Analysis of Variance showed the *P* value of the model was significant, and the missing *P* value was not significant. The theoretical value was in good agreement with the measured value. [Conclusion] The number of colonies of *P. gingivalis* in the simulated oral environment was significantly decreased, which indicated that the regression model could be a good predictor of the response of *P. gingivalis* in the oral cavity.

Keywords: Response surface methodology, Box Behnken design, Immunoglobulin of yolk, *Porphyromonas gingivalis*

免疫球蛋白 Y (IgY)是在特异性抗原刺激下由禽类 B 淋巴细胞产生并转移到卵黄中的多克隆抗体^[1], 卵黄抗体 IgY 与哺乳动物 IgG 具有相同的功能, 但结构却有一定差异, IgY 特殊的结构特征体现在既不与哺乳动物免疫细胞上的 Fc 受体及补体相互作用^[2], 也不与蛋白 A、蛋白 G 或类风湿因子结合等免疫学特性, 能避免类似哺乳动物 IgG 免疫检测假阳性反应的干扰。IgY 独特的结构为抗生素替代品治疗^[2]和免疫检测^[3]等领域的应用提供了巨大优势。

IgY 稳定的结构能最大限度抑制细菌生长, 尽管 IgY 防治细菌性或病毒性疾病的作用机理尚未阐明, 但其可能的作用机制与黏附阻滞作用、伴随吞

噬作用、毒素中和反应及以活性肽形式入血结合病灶处病原菌等相关。已经发现 IgY 能够抑制大肠杆菌 K88 黏附仔猪肠黏膜^[4], 改变单增李斯特菌细胞壁厚度^[5], 增强中性粒细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬作用^[6]。添加 IgY 动物饲料发挥了疾病防治作用^[7], 随着分子细菌学和免疫学的发展以及对牙周致病菌研究的深入, 免疫防治牙周疾病备受关注^[6,8-9]。在已经确定 IgY 牙膏对牙龈炎和菌斑控制有显著作用^[10]的基础上, 需要深入研究 IgY 抑制牙龈炎主要致病菌牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、中间普氏菌(*Prevotella intermedium*)等的作用特性, 阐明 IgY 抑制牙龈炎的作用机制。

采用 Box Behnken 响应面设计法, 通过试验数据拟合模型, 优化口腔模拟环境 IgY 抑制 *P. gingivalis* 生长繁殖的作用, 发现 IgY 抑制牙龈炎致病菌牙龈卟啉单胞菌的作用特性, 为 IgY 抑制牙龈炎作用机制研究和 IgY 牙膏开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种: 牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)来自上海美加净日化有限公司微生物实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器: 以 *P. gingivalis* 为抗原免疫母鸡, 分离卵黄, 经稀释、盐析和超滤等方式分离纯化得到 IgY, 上海美加净日化有限公司微生物实验室; 粘蛋白和 α -淀粉酶, Sigma 公司进口分装; 脑心浸液肉汤(BHI), 青岛海博生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。分光光度计(T6), 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人工唾液的配制: 参照 Shellis^[11]和 Saunders

等^[12]的方法, 每 1 000 mL 人工唾液中各化合物的用量见表 1。

先将各氨基酸、维生素、氯化镁、白蛋白、肌酐和胆碱用无菌水配制成 100 倍浓缩液备用, 其他化合物按量称取后用蒸馏水定容至 1 000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min, 备用。实验前, 在无菌条件下加入氨基酸、维生素、氯化镁、白蛋白、肌酐、胆碱、粘蛋白和 α -淀粉酶。

1.2.2 增菌培养: 将平板培养的 *P. gingivalis* 接种到脑心浸液肉汤(BHI)液体培养基进行增菌培养, 培养条件为 37 °C 厌氧培养 48 h, 用血球计数板计数, 当菌落数达到 1×10^8 CFU/mL 则认为增菌成功, 用生理盐水将菌液稀释到 3×10^6 CFU/mL 备用。

1.2.3 口腔模拟环境的建立: 在 5 mL 培养管中加入 4 mL 人工唾液和 1 mL 菌液, 37 °C 条件下厌氧培养, 在 0-14 h 间用鼻闻法检测气相(直接鼻闻)和液相(用玻棒蘸取液体鼻闻)的臭味指数, 分光光度计检测 650 nm 处吸光值, 玻璃电极和数字 pH 测量仪检测 pH 值。

表 1 人工唾液的配制
Table 1 Preparation of artificial saliva

名称 Name	用量 Dosage (mg)	名称 Name	用量 Dosage (mg)
维生素 B1 Thiamine	0.007 0	核黄素 Riboflavin	0.050 0
叶酸 Folic acid	0.000 1	烟酸 Nicotinic acid	0.030 0
维生素 B6 Vitamin B6	0.600 0	泛酸 Calcium pantothenate	0.080 0
生物素 Biotin	0.000 8	维生素 B12 Vitamin B12	0.003 0
维生素 K3 Vitamin K3	0.015 0	丙氨酸 Ala	3.300 0
精氨酸 Arg	1.900 0	天冬氨酸 Asn	1.600 0
谷氨酸 Glu	3.900 0	甘氨酸 Gly	8.900 0
组氨酸 His	1.000 0	亮氨酸 Leu	3.400 0
异亮氨酸 Ile	1.900 0	赖氨酸 Lys	2.700 0
甲硫氨酸 Met	0.030 0	苯丙氨酸 Phe	3.400 0
脯氨酸 Pro	0.200 0	丝氨酸 Ser	2.100 0
苏氨酸 Thr	2.900 0	酪氨酸 Tyr	2.100 0
缬氨酸 Val	1.800 0	磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄	355.000 0
氯化钠 NaCl	15.000 0	碳酸氢钠 NaHCO ₃	375.000 0
白蛋白 Bovine albumin	25.000 0	氯化铵 NH ₄ Cl	235.000 0
氯化钙 CaCl ₂	210.000 0	氯化镁 MgCl ₂	45.000 0
氯化钾 KCl	1 160.000 0	硫氰酸钾 KSCN	220.000 0
粘蛋白 Mucoprotein	2 500.000 0	尿素 Urea	175.000 0
尿酸 Uric acid	10.000 0	肌酐 Creatinine	0.100 0
胆碱 Choline	15.000 0	α -淀粉酶 α -Amylase	3×10^5 U

1.3 单因素试验设计

1.3.1 培养时间对菌落数的影响: *P. gingivalis* 属于口腔厌氧致病菌, 人体口腔温度为 36.3–37.2 °C, 所以试验在 37 °C 条件下进行, 以 2×10^6 CFU/mL 的浓度接种到人工唾液中, 37 °C 厌氧培养 10 h, 分别在 0、2、4、6、8、10 h 对人工唾液体系进行吸光值检测, 根据标准曲线计算不同时间段的菌落数, 得到最优培养时间。

1.3.2 初始 *P. gingivalis* 数量对菌落数的影响: 生理盐水稀释菌液至 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 CFU/mL 5 个浓度, 接种至人工唾液中, 37 °C 厌氧培养 4 h 检测吸光值, 计算菌落数, 得到最优接种浓度。

1.3.3 IgY 剂量对菌落数的影响: 生理盐水稀释 IgY 至 3.6、90、180、270、360 mmol/L, 选择 2×10^6 CFU/mL 菌液接种到人工唾液, 以 5 个不同浓度的 IgY 给药, 37 °C 厌氧培养 4 h 后检测吸光值, 计算菌落数, 得到最优 IgY 剂量。

1.4 响应面试验设计

基于 Box Behnken 设计的响应面法, 综合单因素试验结果, 选取培养时间、初始 *P. gingivalis* 数量和 IgY 剂量 3 个因素, 在单因素试验的基础上, 采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法, 在 Design Expert 8.0 软件上进行试验设计, 试验因素与水平设计见表 2。

2 结果与分析

2.1 口腔模拟环境的建立

将菌液接种到人工唾液, 37 °C 厌氧培养 14 h

表 2 响应面分析试验因素与水平
Table 2 Analytical factors and levels for RSA

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
IgY 剂量 Dose of IgY (mmol/L)	3.6	180.0	360.0
初始 <i>P. gingivalis</i> 数量 Initial <i>P. gingivalis</i> quantity (CFU/mL)	1×10^6	2×10^6	3×10^6
培养时间 Incubation time (h)	0	4	8

后, 采用鼻闻法检测气相和液相的臭味指数(图 1), 650 nm 处测吸光值, 再根据标准曲线计算菌落数, 对菌落数取对数作图(图 2)。

梯度稀释菌体溶液后 650 nm 处测吸光值, 得到 *P. gingivalis* 标准曲线 $y=6 \times 10^{-9}x-0.0035$, $R^2=0.9974$ 。

如图 2 所示, *P. gingivalis* 在 37 °C 厌氧条件下培养 12 h 后菌落数曲线表现为 S 型曲线, 符合微生物生长趋势, 表明人工唾液中的营养物质能够满足 *P. gingivalis* 的生长需要。同时, *P. gingivalis* 在培养到 2 h 时即开始出现令人不愉快的气味, 并不断加重, 在 10 h 达到顶峰。由此可知, *P. gingivalis* 在人工唾液中生长良好, 并代谢出不同程度的气味物质, 认定此口腔模拟环境建立成功^[13]。

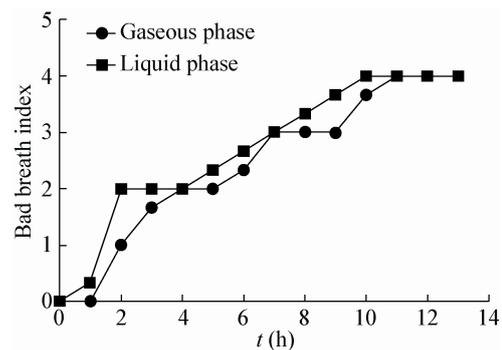


图 1 时间-口臭指数曲线图

Figure 1 Effect of time on bad breath index of *P. gingivalis*

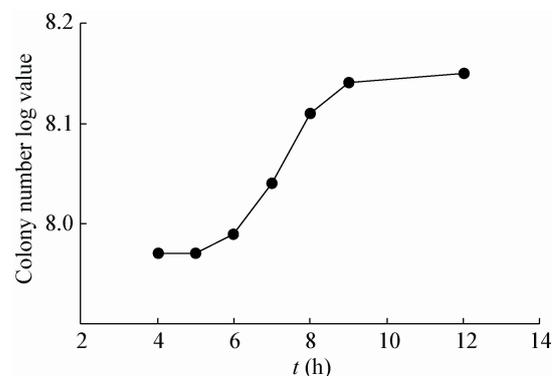


图 2 *P. gingivalis* 的生长曲线

Figure 2 Growth curve of *P. gingivalis*

2.2 单因素试验结果

试验研究目的是确定口腔模拟环境 IgY 的最优剂量、*P. gingivalis* 的最适初始浓度和合适培养时间, 培养终点菌落数越少表明设计的培养条件越优。因为 Box Behnken 模型分析以响应值最高为优, 所以试验的响应值即菌落数转换为倒数再取对数的数据处理方式。

培养时间对菌落数的影响: 以 2×10^6 CFU/mL 的浓度接种到人工唾液中, 180 mmol/L 的剂量给药 IgY, 37 °C 厌氧培养 10 h, 每隔 2 h 测溶液的 OD_{650} 值得到菌落数, 结果如图 3 所示。人工唾液为 *P. gingivalis* 的生长繁殖提供所需营养, 但 IgY 的存在具有抑制 *P. gingivalis* 生长繁殖的作用, 因此接种后响应值明显升高, 随后出现了下降趋势, 到 4 h 时达到极值。

初始 *P. gingivalis* 数量对菌落数的影响: 以 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 CFU/mL 5 个浓度接种到人工唾液中, 180 mmol/L 的剂量给药 IgY, 37 °C 厌氧培养 4 h, 检测不同初始 *P. gingivalis* 数量组的菌落数。如图 4 所示, 响应值呈现先升高后降低的趋势, 而且随着初始 *P. gingivalis* 数量的升高, 响应值急速下降, 即最终菌落数升高, 可能是因为初始 *P. gingivalis* 数量越大, 培养 4 h 后终浓度也越大, 在 2×10^6 CFU/mL 的初始 *P. gingivalis* 数量时达到最大值, 即单因素试验的最优初始 *P. gingivalis* 数量。

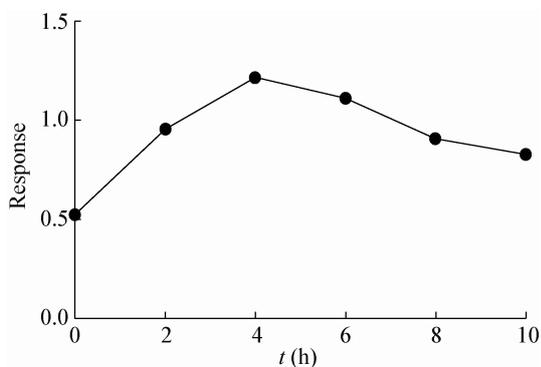


图 3 时间-菌落数曲线图
Figure 3 Effect of culture time on the number of colonies

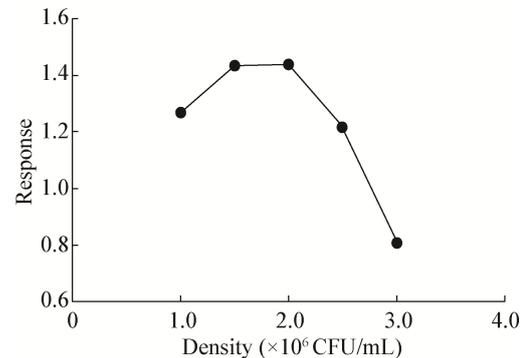


图 4 接种浓度-菌落数曲线图
Figure 4 Effect of inoculation density on colony number

IgY 剂量对菌落数的影响: IgY 以 3.6、90.0、180.0、270.0、360.0 mmol/L 5 个浓度给药至接种 2×10^6 CFU/mL 浓度的 *P. gingivalis* 人工唾液体系中, 37 °C 厌氧培养 4 h, 检测不同给药剂量组的菌落数。图 5 显示 180 mmol/L 给药剂量时数值最高, 条件最优。

综合以上 3 个单因素试验结果表明, 以 2×10^6 CFU/mL 的初始 *P. gingivalis* 数量, 180 mmol/L 的 IgY 剂量, 37 °C 厌氧培养 4 h, 口腔模拟环境中 IgY 对 *P. gingivalis* 生长繁殖的影响达到最佳状态。

2.3 口腔模拟环境中 IgY 对 *P. gingivalis* 生长繁殖的响应面优化

2.3.1 响应面模型的建立和显著性检验: 以 IgY 剂量(A)、初始 *P. gingivalis* 数量(B)和培养时间(C)为试验因素, 以菌落数倒数的对数为响应值, 进行 3 因素 3 水平的响应面分析试验, 试验设计和结果分析见表 3。

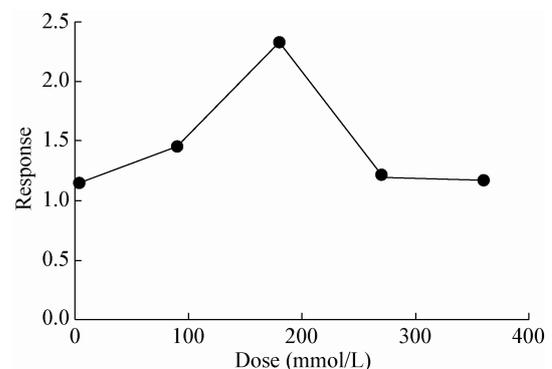


图 5 IgY 剂量对菌落数的影响
Figure 5 Effect of IgY dose on colony number

表3 Box Behnken 响应面设计及各试验的菌落数
Table 3 Box Behnken design and experimental results of response surface methodology

编号 No.	IgY 剂量 Dose of IgY (mmol/L)	初始 <i>P. gingivalis</i> 数量 Initial <i>P. gingivalis</i> quantity (CFU/mL)	培养时间 Incubation time (h)	响应值 Response
1	180	2×10^6	4	12.16
2	180	1×10^6	8	8.23
3	180	3×10^6	8	3.71
4	360	2×10^6	0	5.23
5	3.6	1×10^6	4	9.26
6	3.6	3×10^6	4	8.11
7	180	2×10^6	4	12.94
8	360	2×10^6	8	7.53
9	180	1×10^6	0	5.23
10	180	2×10^6	4	11.28
11	3.6	2×10^6	0	5.23
12	180	3×10^6	0	5.21
13	3.6	2×10^6	8	9.05
14	360	1×10^6	4	9.26
15	180	2×10^6	4	12.51
16	360	3×10^6	4	8.11
17	180	2×10^6	4	11.90

利用 Design Expert 8.0 软件对表 3 进行二次多元回归拟合, 得到菌落数对 IgY 剂量、初始 *P. gingivalis* 数量和培养时间的二次多项回归方程:
 $R_1=12.16+0.95A-0.85B-0.19C-1.12AB-0.38AC-4.24A^2-2.32B^2-1.15C^2$ 。

回归模型方差分析(表 4)表明, 建立的回归模型 *P* 值(<0.001)极显著, 缺失值的 *P* 值(0.154 1)大于 0.05, 不显著, 表明模型和试验值拟合度良好。通过对 *P* 值的检验可见, IgY 剂量、初始 *P. gingivalis* 数量和培养时间的二次项对响应值菌落数的影响都是显著的。回归诊断显示模型负相关系数为 $R^2=0.9623$, 调整后 $R^2=0.9138$ 。由上述分析可知, 该模型很好地反映了菌落数和 IgY 剂量、初始 *P. gingivalis* 数量和培养时间之间的关系, 可以使用此模型对口腔模拟环境中 IgY 对 *P. gingivalis* 的生长繁殖进行优化分析和预测。

2.3.2 响应面交互作用分析: 等高线图和 3D 响应面可以直观地展现 IgY 剂量、初始 *P. gingivalis* 数量和培养时间之间的交互关系^[14]。从图 6 中各个等高线可直观地发现, 培养时间和初始 *P. gingivalis*

表 4 回归方差分析结果

Table 4 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源 Source	调整平方和 SS	自由度 df	调整均方 MS	<i>F</i> 值 F value	<i>P</i> 值 P value
Model	131.87	9	14.65	19.84	0.000 4
<i>A</i> : Time	7.26	1	7.26	9.83	0.016 5
<i>B</i> : Strain	5.81	1	5.81	7.87	0.026 3
<i>C</i> : Dose	0.29	1	0.29	0.39	0.551 5
<i>AB</i>	5.06	1	5.06	6.85	0.034 6
<i>AC</i>	0.58	1	0.58	0.78	0.405 8
<i>BC</i>	-2.842×10^{-14}	1	-2.842×10^{-14}	-3.848×10^{-14}	1.000 0
A^2	75.85	1	75.85	102.71	<0.000 1
B^2	22.61	1	22.61	30.61	0.000 9
C^2	5.61	1	5.61	7.60	0.028 2
Residual	5.17	7	0.74		
Lack of fit	3.60	3	1.20	3.06	0.154 1
Pure error	1.57	4	0.39		
Cor total	137.04	16			

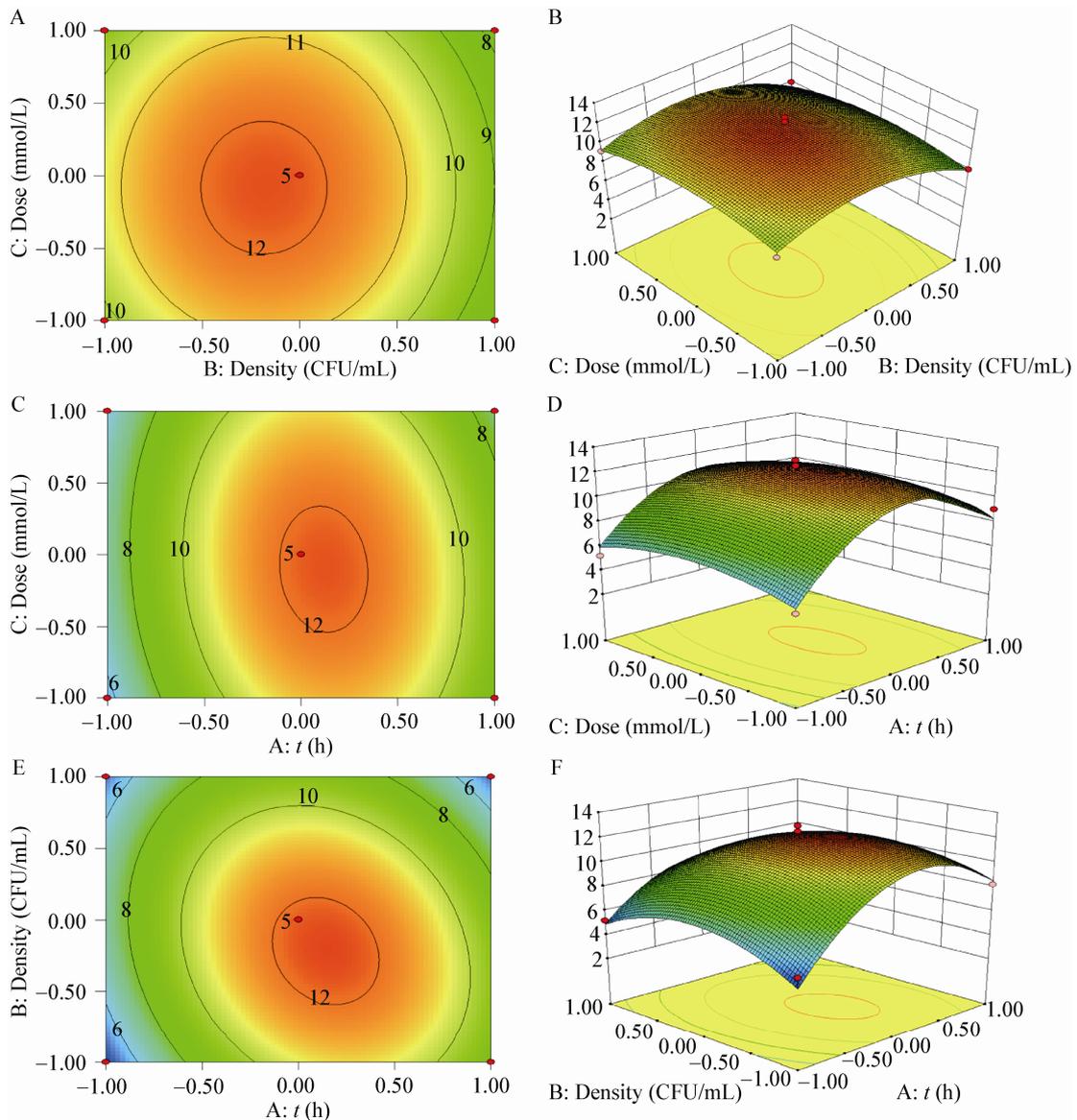


图 6 三因素的交互作用对响应值的影响

Figure 6 Interaction effect of three factors on response

注: A 和 B: IgY 剂量和接种浓度的交互作用对最终菌落数的影响; C 和 D: 培养时间和 IgY 剂量的交互作用对最终菌落数的影响; E 和 F: 培养时间和接种浓度的交互作用对最终菌落数的影响.

Note: A and B: Interaction effect of IgY dose and initial *P. gingivalis* quantity on response; C and D: Interaction effect of culture time and IgY dose on response; E and F: Interaction effect of culture time and initial *P. gingivalis* quantity on response.

数量对响应值峰值影响较大。初始 *P. gingivalis* 数量和 IgY 剂量的等高线形状趋于圆形, 表明其交互作用较弱, 而培养时间和 IgY 剂量以及培养时间和初始 *P. gingivalis* 数量的等高线形状趋于椭圆形, 表明其交互作用明显。

通过 Design Expert 8.0 软件对回归方程的分

析, 得到各因素最佳条件为: IgY 剂量 165 mmol/L、初始 *P. gingivalis* 数量 1.78×10^6 CFU/mL、培养时间 4.588 h, 此模型下, 响应值为 12.33。考虑到实际情况, 进行调整后的最佳条件为: IgY 剂量 165 mmol/L、初始 *P. gingivalis* 数量 2×10^6 CFU/mL、培养时间 4.5 h。

2.3.3 最优条件的确定和验证: 为了验证模型的准确性, 以 2×10^6 CFU/mL 的浓度接种 1 mL *P. gingivalis* 菌液至 4 mL 人工唾液中, 再以 165 mmol/L 的剂量给药 IgY, 37 °C 厌氧培养 4.5 h, 反复试验 3 次, 得到响应值为 12.28, 即最终菌落数为 5.92×10^5 CFU/mL, 与模型预测值 5.85×10^5 CFU/mL 相对误差为 1%, 表明回归模型可以很好地预测口腔模拟环境下 *P. gingivalis* 的最佳培养条件和 IgY 的给药剂量。

3 结论与讨论

本实验将 *P. gingivalis* 菌液接种到人工唾液中培养, 模拟口腔环境探索 IgY 的对口腔厌氧致病菌生长繁殖的影响, 并在单因素试验的基础上, 通过 Box Behnken 设计模型, 对 IgY 剂量、初始 *P. gingivalis* 数量和培养时间等因素进行优化, 得到了最优培养条件: IgY 剂量 165 mmol/L、初始 *P. gingivalis* 数量 2×10^6 CFU/mL 和培养时间 4.5 h。在此条件下建立的口腔模拟环境 IgY 对 *P. gingivalis* 繁殖影响的模型拟合良好。

牙龈卟啉单胞菌是口腔疾病的主要致病菌^[15], 能够引起口臭^[16]。*Solobacterium moorei* 也是口腔致臭菌的一种, 有研究报道特异性 IgY 通过与 *S. moorei* 菌体的特异性结合, 降低细菌的吸附或侵染能力, 进而抑制了细菌的生长^[17]。本实验中 IgY 在口腔模拟环境中对口腔厌氧致病菌 *P. gingivalis* 也有明显的抑制生长繁殖的作用, 可能存在 IgY 和 *P. gingivalis* 菌体结合, 从而抑制生长的机制。IgY 是卵生动物主要的小分子免疫球蛋白, 与哺乳动物的 IgG 和 IgE 有共同的祖先^[18], 因其特殊结构和生物学性质, 在某些疾病的防治中有着比哺乳动物 IgG 等更大的优势^[19], 从而被称为一种新生代抗体, 用于治疗口臭等口腔疾病, 比传统治疗口臭的方法^[20]更为优越, 可减少抗生素和抗菌剂以及机械清洁口腔的治疗方法可能会引起的耐药性和口腔菌群失调的危害。但 IgY 本身作为一种蛋白质, 会不会成为口腔有害菌的底物, 被转化成 VSCs (含硫化化合物), 引起口腔恶臭还没有证据显示。

参考文献

- [1] Wu Q. Preparation and application of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) paste against piglets diarrhea[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2013 (in Chinese)
吴琼. 抗仔猪腹泻卵黄抗体膏的研制及应用[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2013
- [2] Carlander D, Kollberg H, Wejåker P, et al. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections[J]. Immunologic Research, 2000, 21(1): 1-6
- [3] Jin WC, Yamada K, Ikami M, et al. Application of IgY to sandwich enzyme-linked immunosorbent assays, lateral flow devices, and immunopillar chips for detecting staphylococcal enterotoxins in milk and dairy products[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 92(3): 323-331
- [4] Lee EN, Sunwoo HH, Menninen K, et al. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*[J]. Poultry Science, 2002, 81(5): 632-641
- [5] Sui JX. Study on the antibacterial activity and mechanism of chicken egg yolk antibodies against *Listeria monocytogenes*[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010 (in Chinese)
隋建新. 单增李斯特菌鸡卵黄抗体的抑菌性能及其机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2010
- [6] Sun XY, Xu Y, Wang C, et al. Effects of egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against *Porphyromonas gingivalis* induced experimental periodontitis in rats[J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2011, 21(7): 380-385 (in Chinese)
孙晓瑜, 徐燕, 王妮, 等. 被动免疫制剂抗 Pg-IgY 对大鼠实验性牙周炎的治疗[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2011, 21(7): 380-385
- [7] Li Y, Xu YP, Wang LL, et al. Application of IgY as a nutraceutical in animal feed and disease control[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(5): 190-193, 287 (in Chinese)
李媛, 徐永平, 王丽丽, 等. 药效营养品 IgY 在动物饲料与疾病防治中的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(5): 190-193, 287
- [8] Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*[J]. Caries Research, 1997, 31(4): 268-274
- [9] Yokoyama K, Sugano N, Shimada T, et al. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients[J]. Journal of Oral Science, 2007, 49(3): 201-206
- [10] Zhang W, Feng XP, Tao DY, et al. Clinical study on the effect of anti-gingivitis IgY toothpaste in control of gingivitis and dental plaque[J]. Shanghai Journal of Stomatology, 2016, 25(4): 453-455 (in Chinese)
张玮, 冯希平, 陶丹英, 等. 抗龈炎 IgY 牙膏对牙龈炎、菌斑控制的评价[J]. 上海口腔医学, 2016, 25(4): 453-455
- [11] Shellis RP. A synthetic saliva for cultural studies of dental plaque[J]. Archives of Oral Biology, 1978, 23(6): 485-489
- [12] Saunders KA, Greenman J, McKenzie C. Ecological effects of triclosan and triclosan monophosphate on defined mixed cultures of oral species grown in continuous culture[J]. Journal of

- Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 45(4): 447-452
- [13] Hu Y, Hu DY, Zheng LL, et al. Establishment of malodor model and its effects on identifying the halitosis-related bacteria[J]. West China Journal of Stomatology, 2007, 25(3): 226-229 (in Chinese)
胡赞, 胡德渝, 郑雷蕾, 等. 口臭研究模型的建立及其对口腔致臭菌的确定[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(3): 226-229
- [14] Zhou Y, Wu WH, Su TW, et al. Use of response surface methodology on the production of active compound MFS from *Fusarium solani* and its activity on HMG-CoA reductase[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1516-1524 (in Chinese)
周喻, 吴文惠, 苏同伟, 等. 响应面法优化海洋镰刀菌产生 HMG-CoA 还原酶抑制剂的培养条件[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1516-1524
- [15] Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 333(1): 1-9
- [16] Hu Y. The effect of oral malodor system on identifying halitosis-correlated bacteria[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan University, 2004 (in Chinese)
胡赞. 口臭研究模型对致臭菌确定的探讨[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文, 2004
- [17] Li XY, Liu H, Xu YP, et al. Chicken egg yolk antibody (IgY) controls *Solobacterium moorei* under *in vitro* and *in vivo* conditions[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(6): 1448-1458
- [18] Taylor AI, Gould HJ, Sutton BJ, et al. Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(24): 16384-16390
- [19] Rahman S, van Nguyen S, Icatlo FC Jr, et al. Oral passive IgY-based immunotherapeutics[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2013, 9(5): 1039-1048
- [20] Liu PF, Huang IF, Shu CW, et al. Halitosis vaccines targeting FomA, a biofilm-bridging Protein of *Fusobacteria nucleatum*[J]. Current Molecular Medicine, 2013, 13(8): 1358-1367

(上接 p.2614)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>