

根面龋微生态的研究进展

杜倩¹ 任彪² 周学东¹ 徐欣¹

1. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心
四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科 成都 610041;
2. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心
四川大学华西口腔医学院 成都 610041

[摘要] 龋病的发生是在外界环境多因素作用下, 牙菌斑微生态中细菌与细菌、细菌与宿主之间生态失衡, 牙菌斑生物膜细菌组成由生理性组合向病理性组合演变, 产酸耐酸菌获得竞争优势, 牙菌斑生物膜产酸增加, 牙体硬组织脱矿, 最终形成肉眼可见的龋损。牙根面特殊微环境及组织结构使根面龋的发生较牙冠部窝沟点隙龋更加复杂。根面龋的发生发展不仅包括微生物产酸导致牙体硬组织脱矿, 还包括内源性、细菌源性胶原酶对牙本质胶原蛋白的溶解。牙根面微生态系中微生物具有高度多样性, 相较于牙冠部, 牙根面有更多的革兰阴性菌、厌氧菌和真菌定植, 微生物之间的相互作用更加复杂。本文就牙根面牙菌斑微生态的研究进展进行综述, 以期从微生态的角度为根面龋的防治提供新的思路。

[关键词] 根面龋; 微生态; 革兰阴性菌; 厌氧菌; 白色念珠菌

[中图分类号] R 781.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2019007



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

The microbial ecology of root caries Du Qian¹, Ren Biao², Zhou Xuedong¹, Xu Xin¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Dept. of Cariology and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81771099, 81670978) and Key Project for Frontier Research of Science and Technology Department of Sichuan Province (2016JY0006).

[Abstract] As a clinical subtype of dental caries, root caries is a polymicrobial infectious disease resulting from dysbiosis of the microbial ecology of the mouth. In this case, highly acidogenic/aciduric species are selectively enriched while less aciduric commensal residents are suppressed within the biofilm. This feed-forward imbalance in microbial equilibrium leads to a continuous decline in pH to the threshold below which tooth hard tissue demineralization occurs. Due to the histological features of tooth dentine and cementum, as well as the impact of both saliva and gingival groove liquid, the microbial etiology of root caries is relatively complex, including not only demineralization by bacterial acidification but also organic matrix degradation. The microorganisms within root caries lesions show high diversity, including large numbers of Gram-negative bacteria, anaerobic bacteria, and even fungi. This review summarizes the characteristic microorganisms of root caries from the perspective of microbial ecology to advance our understanding of root caries.

[Key words] root caries; microbial ecology; Gram-negative bacteria; anaerobic bacteria; *Candida albicans*

2016年全球疾病负担研究^[1]结果显示, 恒牙

[收稿日期] 2018-10-22; [修回日期] 2019-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金(81771099, 81670978); 四川省科学技术厅重大前沿项目(2016JY0006)

[作者简介] 杜倩, 博士, Email: qiandu1991@126.com

[通信作者] 徐欣, 教授, 博士, Email: xin.xu@scu.edu.cn

龋病是全世界患病率最高的疾病之一。70岁左右为龋病发生的第二个高峰, 在此阶段主要为根面龋的发生。第四次全国口腔健康流行病学调查结果显示, 我国65~74岁的老年人根面龋患病率为39.4%, 充填治疗率仅为12.8%。近年来, 根面龋的发病率呈上升趋势, 一方面由于人类平均寿命

延长,另一方面由于现代人口腔保健水平提高,牙齿在口内保留时间延长,而牙龈萎缩是老年人口腔最典型的增龄性变化,以致暴露于老年人口腔中的牙根面数增加。

相较于牙冠部窝沟点隙龋,根面龋呈浅碟状,龋损面积大,深度浅,且牙根部有机物含量高,再加上龈沟液的存在,充填修复材料难以牢固粘接,易出现继发龋。在冠部龋损发生时,只有釉质完全被分解破坏后细菌才能侵入牙本质,但在根面龋发生早期,细菌便能侵入牙本质深层,导致根面龋发展迅速,难以控制,当患者出现疼痛感时,根面龋损已发展至牙本质深层,感染牙髓。严重的根面龋会导致牙齿抗力形降低,甚至牙齿脱落。根面龋发病率高、治疗率低、危害性大的特点,使其成为影响老年人生活质量最常见的慢性疾病之一^[2-3]。

1 牙根面的解剖形态及组织学特点

根面龋发生于釉牙骨质界及以下,多累及牙骨质及牙本质。牙骨质矿化程度低,约含45%~50%无机物,50%有机物,厚度仅20~50 μm,易因刷牙等机械刺激而磨损,因此,临床上暴露的牙根面多为牙本质表面。牙本质约含70%无机物,18%有机物,12%水。相较于釉质,牙本质及牙骨质有机物含量更高。在牙本质有机物中,约90%为Ⅰ型胶原。胶原蛋白分子间的交叉连接分布是牙本质的独特结构,是牙本质的结构骨架及生物矿化骨架。由于羟磷灰石晶体较小,孔隙度较高,碳酸盐及镁含量较高及牙本质小管的管状结构,导致在酸性条件下,牙根面比牙冠部釉质更不稳定。釉质的临界pH值约在5.4左右,而牙根面的临界pH在6.0~6.8^[4]。

超微结构研究^[5]表明,有基质的脱矿主要发生在2个连续的阶段。在牙骨质龋和牙本质龋早期,矿物质由外表面开始梯度溶解,同时保留特征性交叉排列的胶原纤维,胶原纤维充当了细菌增殖的支架。在下一阶段,暴露的胶原纤维被蛋白水解酶分解,胶原纤维失去其特征性结构。目前认为,细菌产酸导致有机基质暴露,激活了牙本质和唾液中的基质金属蛋白酶和组织蛋白酶,宿主来源的胶原酶可降解牙根面暴露胶原蛋白,细菌产生的酸及胶原酶将部分变形的胶原蛋白进一步分解代谢^[6]。

2 牙根面微生态系

口腔微生态系包括存在于口腔中的各种微生物以及这些微生物所处的口腔组织结构,由于口腔内解剖结构复杂、理化性质差别较大,各生境(habitat)中微生物组成具有一定的特征性差异。正常情况下,微生物、环境与宿主之间均处于动态性生理平衡状态。细菌通过获得性膜及细菌之间的相互作用黏附并聚集在牙齿表面,形成牙菌斑。牙菌斑是龋病发生的始动因子,是微生物生长和相互作用的混合体。牙根面牙菌斑微生物受唾液及龈沟液的共同影响。唾液以部分溶解的碳水化合物和多肽的形式将食物来源的营养传输至生物膜,唾液成分中的蛋白和糖蛋白也是细菌生长的底物。龈沟液相较于唾液,组成更加复杂,其成分更接近于血清,龈沟液中的蛋白浓度比唾液高30倍,pH值稍高于唾液。牙本质、牙骨质和釉质结构和组成的差异以及微环境的差异,导致与根面龋发生发展相关的微生物具有更高的菌群多样性。相较于牙冠部牙菌斑微生态系,牙根面牙菌斑微生态系中含有更多的革兰阴性菌、厌氧菌及真菌^[7-9]。

3 根面龋牙菌斑微生态

生态菌斑假说认为,与龋病发生相关的细菌都是口腔正常微生物群,在生理状态下,细菌与细菌之间、细菌与宿主之间处于动态平衡,当局部、全身或饮食因素改变时,口腔微生态环境发生变化,牙菌斑生物膜的生理性组合转变为病理性组合,产酸耐酸菌增加,产碱菌减少,口腔生态平衡转化为生态失调,正常菌群成为条件致病菌,最终导致龋病的发生^[10-11]。根面龋多呈浅碟状,生物膜较薄,细菌代谢产物易被清除,生物膜内pH较窝沟龋略高。当牙根面暴露于口腔中,唾液和龈沟液的蛋白及糖蛋白黏附于牙根表面形成获得性薄膜,是口腔微生物在牙根面早期定植的基础。研究^[12]表明,在同等条件下,相较于釉质面,细菌更易定植于牙根面,主要为血链球菌、轻型链球菌、口腔链球菌及放线菌属等口腔常驻菌。

通过分子生物学技术,Preza等^[8,13]在健康牙根面及牙根面龋损部位共检测出8种菌门,245种

细菌。健康无龋患者牙根面牙菌斑中细菌多样性较高,且没有特定的优势菌群,根面龋患者无龋牙根面龈上菌斑细菌多样性略微降低,而根面龋患者龋损部位龈上菌斑细菌多样性显著降低,龋坏牙本质由于特殊的环境,其细菌多样性最低,优势菌群定植量随之增加。Chen等^[9]发现,健康牙根面与根面龋牙菌斑微生物虽然在细菌数量及丰富度上无明显差异,但 β 多样性存在显著差异。且无论在健康牙根面还是根面龋损部位,龈上菌斑的组成均很稳定。

从牙菌斑微生物组成上看,健康牙根面与龋坏牙根面微生物组成无显著差异^[8-9]。Chen等^[9]发现在健康牙根面与根面龋损部位菌斑中有185种细菌检出率无显著差异,在健康牙根面检出率较高的24种细菌,仅3种在根面龋中无检出,而在根面龋损部位检出率较高的18种细菌中,有10种在健康对照组无检出,可见当牙根面局部微环境发生改变时,部分在健康牙根面不具生长优势的菌种因酸性环境的选择,定植率明显增加。除龋坏牙本质外,在健康牙根面、根面龋患者无龋牙的根面、根面龋损部位牙菌斑中均以厚壁菌门居多,其次为拟杆菌门,而在龋坏牙本质中放线菌门居第二位^[8]。同牙冠部,链球菌属在所有样本中均以相似的高定植量存在,而因牙根面更严格的厌氧环境,韦荣菌属在牙根面定植量较高,但在健康牙根面与根面龋损部位无明显差异。同时,普雷沃菌、月形单胞菌和口腔链球菌均大量存在,它们可能在形成龈上菌斑的过程中起了重要的作用。其中,口腔链球菌可产生神经氨酸,促进牙菌斑中免疫球蛋白A (immunoglobulin A, IgA) 蛋白酶的生成^[9]。

虽然健康牙根面及根面龋损部位牙菌斑生态中菌群的丰富度无显著差异,但两者优势菌群明显不同^[9,13],并在根面龋的发生发展中起着不同的作用。Chen等^[9]发现,健康无龋者牙根表面与根面龋患者龋损部位牙菌斑中,157种细菌相对丰度无明显差异,28种细菌在健康牙根面相对丰度较高,而42种细菌在牙根面龋损部位相对丰度较高。放线菌属在健康牙根面及根面龋损部位菌斑中检出率和检出量相似,但在牙根面龋坏牙本质中大量存在。在根面龋中,变异链球菌仍是最重要的致龋菌,同时产酸丙酸杆菌、嗜糖普雷沃菌、卷曲乳杆菌、*Olsenella profusa*、发酵乳杆菌定植量明显增加,而从菌属上看,乳杆菌属、欧

氏菌属、双歧杆菌属在根面龋损部位检出率及定植量明显增加^[9,13]。

相较于牙冠部,根面的弱酸性环境及龈沟液中丰富的营养物质,促进了放线菌属的定植及入侵。无论在健康牙根面或根面龋损部位,牙菌斑中均可检测到大量放线菌属,临床研究发现,放线菌属的代谢活动在健康和龋坏牙根面非常相似,其与糖酵解途径(烯醇化酶和磷酸烯醇丙酮酸羧化酶)、黏附(型纤维蛋白和胶原结合蛋白)和细胞生长[延伸因子(elongation factor, EF)-Tu]相关的基因均高度表达,无明显差异,但不排除其可通过菌毛表达增加黏附、遗传改变及糖代谢储能等方面提高了生物膜的致龋性^[14];另外,放线菌属在牙根面龋坏牙本质中大量存在,推测其可能在根面龋进展过程中起了重要作用^[9]。同时,根面龋损部位分离的放线菌属临床菌株的耐酸性明显强于健康牙根面所分离的临床菌株^[11]。除产酸耐酸性外,放线菌属还具有蛋白凝固及降解功能^[15]。同时,放线菌与多种细菌间存在较高的细菌共凝集力,如:韦荣菌属、普雷沃菌属、链球菌属^[16]。同时动物实验^[17]证明,变异链球菌和黏性放线菌同时感染较单独感染致根面龋性更强。

乳杆菌属具有较高的产酸耐酸性,被认为是主要的致龋菌之一,其在龋损部位定植量明显增加,尤其是进展性龋损、根面龋及牙本质龋中。正常情况下,乳杆菌对牙表面亲和力低,但其对胶原的黏附具有特异性,且pH值越低,其黏附性越高。同时乳杆菌可分泌胶原酶,嗜酸乳杆菌在牙根面具有很高的自凝聚作用^[15]。因此有部分学者^[18]推测,当局部低pH环境造成牙根面硬组织脱矿、胶原暴露后,乳杆菌会大量黏附,促进根面龋的发展。

因牙根面更严格的厌氧环境促进了厌氧菌的定植,近年来,丙酸杆菌属在龋病发生中的作用越来越受到重视,其可代谢糖,产生大量的醋酸和丙酸,具胶原蛋白降解能力^[15]。同时有临床研究^[19]发现,丙酸杆菌属在龋坏牙本质深层及根面龋损部位大量存在。普雷沃菌属长期以来被认为是牙周致病菌,但近期大量研究^[20-24]发现,在不同年龄的龋病患者菌斑及唾液中均有相对丰度较高的普雷沃菌属定植,中间普雷沃菌除具有很高的自凝聚作用外,还可与多种细菌之间产生共凝聚,如:链球菌属、乳杆菌属、放线菌属、孪生

球菌和消化链球菌等^[16]。另外，普雷沃菌属还具有降解胶原蛋白的能力^[15]。双歧杆菌属^[19,25]、欧氏菌属^[26-27]等也被发现在龋损部位相对丰度增加，且双歧杆菌与根面龋的临床位点明显相关^[25]，但它们在龋病中的作用仍需进一步探索。

在根面龋发生发展过程中，牙根面微生态发生改变，产酸耐酸菌成为优势菌，而部分在健康牙根面普遍存在的细菌失去竞争优势，在根面龋损部位无定植或定植量很低，如：食酸戴尔福特菌、拟杆菌、毛螺菌、中间普雷沃菌、纤毛菌、有害月形单胞菌、口金氏菌、轻型链球菌和咽峡炎链球菌等。

4 真菌对根面龋牙菌斑微生态影响

临床研究^[28-31]发现，根面龋损部位牙菌斑和牙本质中不仅定植了大量细菌，真菌同样具有很高的检出率，尤其是白色念珠菌，并在根面龋的发生发展中起着重要促进作用。Beighton等^[29]发现，在82名老年根面龋患者龋坏牙本质中，白色念珠菌检出率为58.5%。Shen等^[31]发现，根面龋中念珠菌属检出率达63.3%，其中，白色念珠菌占76.19%，其次为都柏林念珠菌（14.29%）及光滑念珠菌（9.52%）。在35~44岁及55~72岁的根面龋患者菌斑中白色念珠菌检出率均较高，无显著差异^[30]。研究^[32-34]表明，同为光滑面龋损且宿主免疫力低下的低龄儿童龋的发生与白色念珠菌显著相关。

白色念珠菌可以代谢碳水化合物产酸^[35-36]，

临床分离的念珠菌属可以降低釉质表面的显微硬度^[37-38]。Klinke等^[39]发现，在临床根面龋损部位有大量白色念珠菌定植，免疫组化实验显示其可穿透至牙本质深层。体外实验及动物实验进一步证明了白色念珠菌菌丝可大量进入牙本质小管，使牙本质内原来排列整齐的胶原纤维被破坏，牙本质小管结构不再清晰可见。白色念珠菌可分泌胶原蛋白水解酶分解牙本质胶原蛋白，且这种胶原蛋白水解酶在酸性环境时活性最佳^[39-40]。

另一方面，大量研究证明白色念珠菌与口腔微生物之间存在着复杂的相互作用关系，例如：链球菌属、放线菌属及梭菌属等^[41-44]，白色念珠菌的定植可使生物膜微环境中的氧浓度降低，更适于厌氧菌的生存^[45]。白色念珠菌与主要致龋菌变异链球菌之间的相互促进作用已在大量体内外实验中被证明。体外及动物实验^[46-50]显示，共培养白色念珠菌和变异链球菌可显著促进生物膜中微生物定植，变异链球菌致龋性显著增加。变异链球菌对白色念珠菌的菌丝有很高的亲和力^[50]，变异链球菌分泌的葡糖基转移酶B与白色念珠菌紧密结合，生成的葡聚糖使二者形成更稳定的共聚体^[46-49,51]。白色念珠菌进一步促进变异链球菌与耐酸性^[46]、碳水化合物转运及代谢^[52]相关基因表达增加。且老年人因慢性病，免疫缺陷，长期服用药物，口腔卫生不良及其他因素导致白色念珠菌的感染率明显增加，推测白色念珠菌与根面龋的发生具有一定相关性。

根面龋特异性微生物及其在根面龋中的作用见表1。

表 1 根面龋特异性微生物及其在根面龋中的作用

Tab 1 The characteristic microorganisms and their roles in root caries

微生物	产酸	蛋白凝固及降解	自凝聚	共凝聚	其他
细菌					
放线菌属 ^[19,25]	+	+	-	+	
乳杆菌属 ^[19,25]	+	+	+	-	胶原特异性黏附
丙酸杆菌属 ^[15]	+	+	-	-	
普雷沃菌属 ^[19,25]	-	+	+	+	
口腔链球菌 ^[9]	-	-	-	-	促进牙菌斑中IgA蛋白酶生成
双歧杆菌属 ^[19,25]	-	-	-	-	
欧氏菌属 ^[26-27]	-	-	-	-	
真菌					
白色念珠菌 ^[31,46-50]	+	+	-	-	与口腔微生物间交互作用
都柏林念珠菌 ^[31]	-	-	-	-	
光滑念珠菌 ^[31]	-	-	-	-	

注：+已证明具有这一作用；-未证明具有这一作用。

笔者所在课题组前期研究发现,根面龋患者龋损部位龈上菌斑中白色念珠菌的检出率及定植量较同年龄无龋对照组及根面龋患者健康牙根面显著增加,且白色念珠菌定植量与变异链球菌/血链球菌比例正相关,体外实验及动物实验进一步证明白色念珠菌的定植可使唾液生物膜微生态失衡,变异链球菌/血链球菌比例上调,生物膜产酸增加,进而使人工脱矿模型中牙体硬组织脱矿深度及脱矿程度增加,显著提高实验动物根面龋发生率。

5 结论

流行病学调查结果显示,根面龋具有发病率高、治疗率低、危害性大的特点,严重影响老年人的生活质量。由于老年人缺乏良好的口腔卫生习惯、唾液量减少、高糖摄入等,导致牙菌斑生物膜微环境动态平衡被打破,生物膜酸化及酸性细菌选择性增加,进一步导致牙根面脱矿,胶原蛋白溶解,根面龋形成。根面龋作为一类特殊的龋病,其发病机制与釉质龋相似,但也有其独特之处:1)牙根面生物膜的形成受唾液与龈沟液二者共同影响;2)根面龋的形成过程包括牙根面微生态失衡,生物膜产酸增加导致牙体硬组织脱矿及胶原蛋白溶解2个部分;3)牙根面特殊的微环境及丰富的营养物质增加了根面龋损部位菌斑微生态系中菌群的多样性,相较于牙冠部龋损,根面龋微生态系含有更多革兰阴性菌及厌氧菌,菌群之间相互作用更加复杂;4)根面龋损部位白色念珠菌的定植增加,可通过自身产酸、溶解牙本质胶原蛋白及与细菌相互作用发挥对根面龋的促进作用。

目前,对根面龋微生态的早期的研究主要集中在对健康牙根面与根面龋损部位细菌检出率及相对丰度的比较。随着分子生物学技术,特别是宏基因组学、蛋白组学、代谢组学等研究技术的发展,亟待针对牙根面微生态失衡的核心驱动因素、微生物群落代谢与宿主免疫的交互作用等开展深入研究,进而为根面龋的生态防治提供新的思路与模式。

6 参考文献

- [1] GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet*, 2017, 390(10100): 1211-1259.
- [2] Carvalho TS, Lussi A. Assessment of root caries lesion activity and its histopathological features[J]. *Monogr Oral Sci*, 2017, 26: 63-69.
- [3] Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Specificities of caries on root surface[J]. *Monogr Oral Sci*, 2017, 26: 15-25.
- [4] Mayanagi G, Igarashi K, Washio J, et al. pH response and tooth surface solubility at the tooth/bacteria interface[J]. *Caries Res*, 2017, 51(2): 160-166.
- [5] Deyhle H, Bunk O, Müller B. Nanostructure of healthy and caries-affected human teeth[J]. *Nanomedicine*, 2011, 7(6): 694-701.
- [6] Takahashi N, Nyvad B. Ecological hypothesis of dentin and root caries[J]. *Caries Res*, 2016, 50(4): 422-431.
- [7] Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions[J]. *J Oral Microbiol*, 2014, 6: 25443.
- [8] Preza D, Olsen I, Aas JA, et al. Bacterial profiles of root caries in elderly patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6): 2015-2021.
- [9] Chen L, Qin B, Du M, et al. Extensive description and comparison of human supra-gingival microbiome in root caries and health[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117064.
- [10] Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease[J]. *Adv Dent Res*, 1994, 8(2): 263-271.
- [11] Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process[J]. *Caries Res*, 2008, 42(6): 409-418.
- [12] Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo* [J]. *Scand J Dent Res*, 1987, 95(5): 369-380.
- [13] Preza D, Olsen I, Willumsen T, et al. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28(5): 509-

- 517.
- [14] Dame-Teixeira N, Parolo CC, Maltz M, et al. *Actinomyces* spp. gene expression in root caries lesions[J]. J Oral Microbiol, 2016, 8: 32383.
- [15] Hashimoto K, Sato T, Shimauchi H, et al. Profiling of dental plaque microflora on root caries lesions and the protein-denaturing activity of these bacteria[J]. Am J Dent, 2011, 24(5): 295-299.
- [16] Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(1): 23-32.
- [17] de Oliveira Cordeiro JG. Experimental root surface caries in hamsters the development of the disease after inoculations of two types of cariogenic bacteria [J]. Bull Tokyo Med Dent Univ, 1995, 42(3): 83-103.
- [18] Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature[J]. Open Microbiol J, 2008, 2: 38-48.
- [19] Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, et al. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 843-849.
- [20] He J, Tu Q, Ge Y, et al. Taxonomic and functional analyses of the supragingival microbiome from caries-affected and caries-free hosts[J]. Microb Ecol, 2018, 75(2): 543-554.
- [21] Yang F, Zeng X, Ning K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations[J]. ISME J, 2012, 6(1): 1-10.
- [22] Teng F, Yang F, Huang S, et al. Prediction of early childhood caries via spatial-temporal variations of oral microbiota[J]. Cell Host Microbe, 2015, 18(3): 296-306.
- [23] Wolff D, Frese C, Maier-Kraus T, et al. Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects [J]. Caries Res, 2013, 47(1): 69-77.
- [24] Wang Y, Zhang J, Chen X, et al. Profiling of oral microbiota in early childhood caries using single-molecule real-time sequencing[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2244.
- [25] Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions[J]. Oral Microbiol Immunol, 2009, 24(1): 32-37.
- [26] Obata J, Takeshita T, Shibata Y, et al. Identification of the microbiota in carious dentin lesions using 16S rRNA gene sequencing[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e103712.
- [27] Zhou J, Jiang N, Wang S, et al. Exploration of human salivary microbiomes—insights into the novel characteristics of microbial community structure in caries and caries-free subjects[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147039.
- [28] Brailsford SR, Shah B, Simons D, et al. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions[J]. J Dent Res, 2001, 80(9): 1828-1833.
- [29] Beighton D, Ludford R, Clark DT, et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(11): 3025-3027.
- [30] Zaremba ML, Stokowska W, Klimiuk A, et al. Microorganisms in root carious lesions in adults[J]. Adv Med Sci, 2006, 51(Suppl 1): 237-240.
- [31] Shen S, Samaranayake LP, Yip HK, et al. Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic Chinese[J]. Oral Dis, 2002, 8(4): 207-217.
- [32] de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, et al. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries[J]. Arch Oral Biol, 2006, 51(11): 1024-1028.
- [33] Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children[J]. Caries Res, 2010, 44(3): 272-276.
- [34] Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, et al. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(8): 1048-1053.
- [35] Parahitiyawa NB, Samaranayake YH, Samaranayake LP, et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device [J]. APMIS, 2006, 114(4): 298-306.
- [36] Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Dietary sugars, serum and the biocide chlorhexidine digluconate modify the population and structural dynamics of mixed *Candida albicans* and *Escherichia coli* biofilms[J]. APMIS, 2007, 115(11): 1241-1251.
- [37] Caroline de Abreu Brandi T, Portela MB, Lima PM, et al. Demineralizing potential of dental biofilm

- added with *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* isolated from preschool children with and without caries[J]. Microb Pathog, 2016, 100: 51-55.
- [38] Charone S, Portela MB, Martins KO, et al. Role of *Candida* species from HIV infected children in enamel caries lesions: an *in vitro* study[J]. J Appl Oral Sci, 2017, 25(1): 53-60.
- [39] Klinke T, Klimm HW, Zahnerhaltung PF, et al. Induction of caries-like lesions by *Candida albicans* in an artificial mouth[J]. Int Poster J Dent Oral Med, 2003, 5(4): 200.
- [40] Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, et al. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*[J]. Caries Res, 2011, 45(2): 100-106.
- [41] Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 299(1): 1-8.
- [42] Bamford CV, d’Mello A, Nobbs AH, et al. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication[J]. Infect Immun, 2009, 77(9): 3696-3704.
- [43] Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(4): e1000886.
- [44] Diaz PI, Xie Z, Sobue T, et al. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel *in vitro* mucosal model[J]. Infect Immun, 2012, 80(2): 620-632.
- [45] Fox EP, Cowley ES, Nobile CJ, et al. Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures[J]. Curr Biol, 2014, 24(20): 2411-2416.
- [46] Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms *in vivo*[J]. Infect Immun, 2014, 82(5): 1968-1981.
- [47] Hwang G, Marsh G, Gao L, et al. Binding force dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *Candida albicans*[J]. J Dent Res, 2015, 94(9): 1310-1317.
- [48] Gregoire S, Xiao J, Silva BB, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(18): 6357-6367.
- [49] Hwang G, Liu Y, Kim D, et al. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development *in vivo*[J]. PLoS Pathog, 2017, 13(6): e1006407.
- [50] Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, et al. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces[J]. Biofouling, 2016, 32(2): 123-134.
- [51] Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms[J]. Caries Res, 2011, 45(1): 69-86.
- [52] He J, Kim D, Zhou X, et al. RNA-Seq reveals enhanced sugar metabolism in *Streptococcus mutans* co-cultured with *Candida albicans* within mixed-species biofilms[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1036.

(本文编辑 张玉楠)