口臭研究模型和分析方法

Modeling of the oral malodor system and methods of analysis

Israel Kleinberg, Milroy Codipilly

原载 Quintessence Int 1999; 30: 357 - 369. (英文)

朱卫东 译　曹采方 校

摘要　细菌的腐化是产生口臭的主要代谢过程，很容易通过离心全唾来建立一个唾液沉淀物系统的模型。在这个系统中，用于检查臭味的方法包括以下测量：(1) 利用特殊感觉法(鼻闻法)测量预留空间（气相）和液相气味；(2) 利用电化学敏感仪器测量挥发性硫化合物；(3) 用合适的不同电极测量 pH、氧分压(Po2)和氧化 - 还原电势(Eh)；(4) 用比色法测量臭味化合物：吲哚和甲基吲哚；(5) 底物水平及其作用；(6) 细菌的数量和类型。该系统非常简单，因此很容易按需要而增加其它的分析，对于影响口臭的各种因素及制剂进行评估。把能产生气味和不能产生气味的纯菌加入到该系统的混合菌系中，可以调整微生物群落成分，模拟并且比较高产气和低产气的微生物群落。该模型的有效性已经通过使用补充的体内方法得到提高，例如用于测量口腔微生物产生臭气的能力或潜能的方法。该法是用半胱氨酸作体内竞争试验，测量所产生硫化氢的量。口臭的产生是多因素的，模型有助于口臭的系统研究和除臭剂的定量试验。

细菌腐化，作为产生口臭的主要代谢过程，很容易通过对全唾标本进行离心，而建立一个唾液沉淀物系统的模型。通过咀嚼惰性物质(如石蜡)收集刺激性全唾作为口臭产生的模型已有 100 多年了。全唾在口臭产生中必须的主要成分之一是其中的混合细菌，这些细菌绝大部分是口腔内的常住菌，其中许多附着于上皮鳞屑，很容易并不断地从口腔软组织表面脱落。第二种主要成分是从各唾液腺分泌的唾液，加上脱落的细菌和上皮细胞，这通常被称为全唾。根据牙龈炎症的程度，全唾中也可能有来自龈沟和牙周袋内的液体的存在。在体温下孵育全唾，在不同的时间段所产生的臭味和从人口腔中出来的臭味相类似。

译者：北京大学口腔医学院
北京海淀区中关村南大街 22 号　100081

用孵育全唾标本作为口臭的定量研究及其它细菌代谢现象的模型的一个主要不足之处是，其中的细菌浓度远低于口腔内的浓度。这是由于在刺激性全唾的收集过程中，只有较少量的细菌从口腔表面脱落、分离出来。离心后的唾液沉淀物约占全唾的 0.5% - 2%(V/V)，而更合适的模拟则需要约 10%（V/V）或更多的量。离心全唾后，再加入减量的唾液上清液重组成沉淀物，这样细菌的浓度就容易达到合适的水平。

为了保证重复性，必须做到以下两点：第一是全唾的收集应在早上同一时间，禁食至少 12 小时，1 天之内没

有进行口腔清洁；第二，必须控制细菌浓度，因为它对细菌的生物反应速度有较大的影响。用于模拟体内菌斑糖酵解的浓度来自两项研究，一项是体外试验，在全唾内细菌和葡萄糖的浓度对于全唾中细菌糖酵解的作用；另一项是体内试验中葡萄糖浓度对菌斑糖酵解的作用。该两项研究均采用 pH 值的变化来测量糖酵解的速度。随后的一系列研究对这种模拟方法进行了描述并且确认。该系统被命名为唾液沉淀物悬浮系统（suspended salivary sediment SSS[3S]system）。

由于操作简单但很实用，孵育全唾就成为研究口腔混合微生物的代谢、口臭的产生、及其它相关口腔疾病过程的有用模型。

SSS 系统中与口臭形成有关的主要成分

全唾经离心分成沉淀物和上清液两部分，对这两部分的检查可判断它们各自在臭味形成过程中所起的作用。当二者只单独孵育时，沉淀物可产生一些臭味，而上清液几乎不产生。但混合一起孵育时，就可产生明显的臭味。这个简单的试验清楚地表明，沉淀物提供了产生臭味所必须的细菌以及使臭味能够产生的足够的底物。然而，随后的研究表明，上清液里含有使沉淀物中的细菌产生臭气所需要的绝大部分底物。这些有气味的产物是口臭的主要成分。

对通常存在于沉淀物中的主要细菌的研究，鉴别了能产生臭味和不能产生臭味的细菌。一般来说，G－兼性和专性厌氧菌能产生臭味，而 G＋及多数 G－需氧菌，如奈瑟菌属，则不产生臭味。同时对唾液成分的分段研究也揭示了那些普通的氨基酸（绝大多数是唾液中的蛋白质和多肽水解所形成）是产生口臭的主要底物。这些氨基酸包括胱氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、色氨酸及鸟氨酸。

通过这些研究有力地证明口臭的主要代谢过程是细菌的腐化（图 1）。它包括两个过程，第一是多肽和蛋白质的水解产生氨基酸；第二是这些氨基酸降解产生终末产物，其中有些是挥发性的和有气味的。这些产物包括由胱氨酸、半胱氨酸及蛋氨酸降解而形成的挥发性硫化合物（VSCs）；从色氨酸降解而来的吲哚和甲基吲哚；从赖氨酸和鸟氨酸降解而来的胺；以及可能是来自异亮氨酸、亮氨酸和颉氨酸降解的短链脂肪酸。

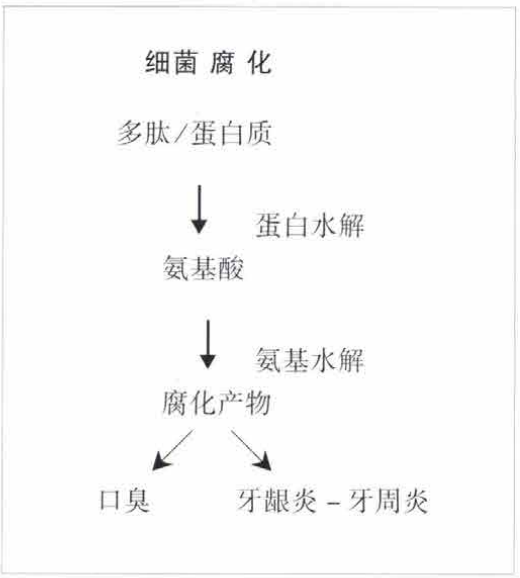

图 1 口腔细菌腐化及其和口臭与牙龈炎－牙周炎的关系

也有事实证明口腔微生物的其他代谢过程也对口臭的产生有明显的间接作用，例如，细菌对糖的发酵导致酸性 pH 值，可抑制臭味产生，而其他代谢过程形成的中性和碱性环境则有利于臭味的产生。胱氨酸和半胱氨酸被口腔微生物降解时可使氧化－还原电势（Eh）下降，这对于 G－厌氧菌的生长和臭味的产生过程是很重要的物理化学因素。另外，脯氨酸和谷氨酸是唾液中消耗氧的主要氨基酸，对于形成厌氧环境很重要，转而使 Eh 下降利于臭味的产生。

这些结果清楚表明口臭产生的必需成分，以及利于口臭产生的酸－碱（pH）条件、氧化－还原（Eh）电势及需氧－厌氧（Po_2）环境等条件，都存在于 SSS 系统中。

用唾液沉淀物系统的臭味模型进行的臭味试验

用于检查臭味的模型试验必须包括：对 G－细菌和可产生气味的氨基酸反应时所产生的有气味的化合物的分析。这些化合物包括来自胱氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸的主要挥发性硫化物（VSCs），这些产物绝大部分是硫化氢和甲基硫醇。试验还应包括对从色氨酸来的吲哚和甲基吲哚，从鸟氨酸和赖氨酸来的胺，以及从几种脂肪族氨基酸来的短链脂肪酸的分析。象这些可产生

臭味的氨基酸底物混合在一起，当在口腔内或在体外的唾液沉淀物孵化混合物内，由于细菌的存在而降解，就可产生相应的有气味的终末产物的混合物。
目前，对这些臭味的评估是用鼻子，最常用的方法是由一组通过特殊感觉训练的人利用一种判断标准对呼出的气体进行评估。臭味的程度分为 0 至 3 或 4 度（0 代表没有臭味，3 或 4 表示严重或很严重的臭味）。这个过程在体外的相类似的方法是指：用鼻子闻孵育混合物的预留空间（气相），用相似的不连续的分级记录臭味程度。

我们已发现评估臭味系统的液相也同样是重要的。这是因为在口腔内，细菌和底物反应产生臭味产物的部位是在粘膜－滞留唾液或牙－滞留唾液的液界面（图 2）。有臭味的挥发性物质很容易从该界面进入口腔内，形成唾液沉淀物臭味系统的气相（类似于在体外）。把一个玻璃棒插入唾液标本或者沉淀混合物，转圈搅动固定的圈数（我们搅动 3 圈），然后闻玻璃棒，并和以前一样记录臭味的程度。用这种方法评估臭味系统中液相的挥发性物质。这种在体外的液相分析在本质上和存在于口腔表面的滞留唾液膜中，并进入呼吸的臭味相似。换言之，在某种程度上，体外气相测定基本上是模拟呼吸气体。

各种仪器和分析方法还在继续发展，对臭味产物进行客观的测量。如用气相色谱法（gas chromagraphy GC）对呼吸气体中的 VSCs 的成分进行测量，GC 法是用气体注射器收集口腔内气体标本，定量测定能够在气相色谱仪上分离的含硫产物。最近，用名为 Halimeter（Interscan）的仪器测量 VSCs 中的重要成分硫化氢。Halimeter 用一吸泵把口腔中的气体吸入仪器内，用电子化学传感器测量 VSCs（主要是硫化氢，较少量的是甲基硫醇）。来自色氨酸的吲哚和甲基吲哚是在腐败过程中产生的很重要的臭味终产物，可以用比色法测量。在唾液沉淀物孵化混合物的丁酸提取物里用 Kovac's 试剂（二甲基氨苯甲醛）形成有颜色的复合物。氨和短链脂肪酸可用气相色谱法或高精度的液相色谱法进行测量。

如前所述，臭味的产生过程中也还有一些次要因素应当进行测量。包括 pH、Eh 和 Po_2。在体外，pH 值通常是采用电势测定法测量的，用玻璃甘汞电极与 pH 测量仪连接进行测量。Eh 的测量是用一个铂或金指示电极和一个氯化钾盐桥和氯化亚汞参考电极与一个毫伏特表或 pH 测量仪（把功能调到测量 Eh 档）相连，然后进行测量。Po_2 是利用极谱法用一个 Clark 氧电极和 oxygraph 仪测量。在体内测量这些参数时，须用小型 pH、Eh 和 Po_2 指示电极。我们采用单极型的氧电极测量 Po_2。对这三种指示电极，相应的参考电极是相同的，由一个和前臂相连的一次性使用的银－氯化银粘附电极（ET150DX，Electro Trace）组成。

图 2 腐化产物在口腔粘膜表面形成和释放层次。细菌以混合的微生物集团存在于粘膜和牙的表面。吞咽后即刻在口腔表面有残留唾液，其中含有绝大部分可以和微生物反应并产生有气味的挥发性物质的底物。在每次吞咽周期中，滞留唾液可以被非滞留唾液所代替

酸－碱和氧化－还原染料也可以代替电极分别用来测量 pH 和 Eh。当评定一种漱口液需同时评价口腔内多个部位时，这些是很有用处的，但是和用电极系统测量相比则误差较大。

所有的研究方法基本可归为 2 类：特殊感觉法和仪器测量法。前者的优点是可以评估到整个臭气混合物，缺点是测量不连续且欠精确。仪器法的优点是测量结果通常较精确并且客观，但是只能测量混合物中的一种或少数几种成分。因此，至少在目前，这两种方法应当同时采用以获得较完整的资料。

葡萄糖在 SSS 系统中对臭味抑制作用的测定

早先的研究显示，葡萄糖在 SSS 系统中对臭味的形成有很强的抑制作用。这种作用主要是由于在葡萄糖发酵过程中产生的酸性 pH 环境，抑制了系统中的腐化

机制从而抑制臭味的形成。现在要获得对这个现象的更多了解可以利用 SSS 系统的臭味模型以及前述的分析方法。

如图 3 和图 4 所示，先准备孵化混合物（750μL），由唾液沉淀物 16.7%（v/v）及唾液上清液 33.3%（v/v）组成，接着在 37 ℃下孵化使产生臭味，然后在 1 个小时用鼻闻法检测气相和液相（分别为预留空间和孵化混合物本身）以及 pH、VSC 水平和 Eh。臭味用鼻闻法检测，臭味分为 0 至 4 级（0 = 无气味，4 = 最重的气味）；用玻璃电极测量 pH 值；VSCs 水平用 Halimeter 测量；随后用铂电极测量 Eh。经过 1 个小时的孵育后，加入葡萄糖（终浓度为 28mM），继续在 37℃下孵育。在 24 小时内按合适的时间点测量各种参数。24h 时用 Kovac's 试剂分析吲哚和甲基吲哚。在对照孵育组中，加入水代替葡萄糖。

在孵育 1h 时加入葡萄糖后，可以使 pH 值降低到 4.0（图 3），臭味及 VSCs 水平不管是在气相还是在液相都明显下降，而 Eh 则明显上升（图 4）。在孵育结束时，对吲哚和甲基吲哚水平的分析发现，加葡萄糖组明显低于未加葡萄糖组。在无葡萄糖组，吲哚和甲基吲哚的水平从孵育开始时的 0.8μg/ml 增加到孵育结束时的 9.6μg/ml；而加葡萄糖组仅增加到 1.2μg/ml。很清楚，葡萄糖可以刺激发酵和造成酸性 pH，明显抑制臭味的形成以及导致各种和臭味的产生有关的关键参数的改变。

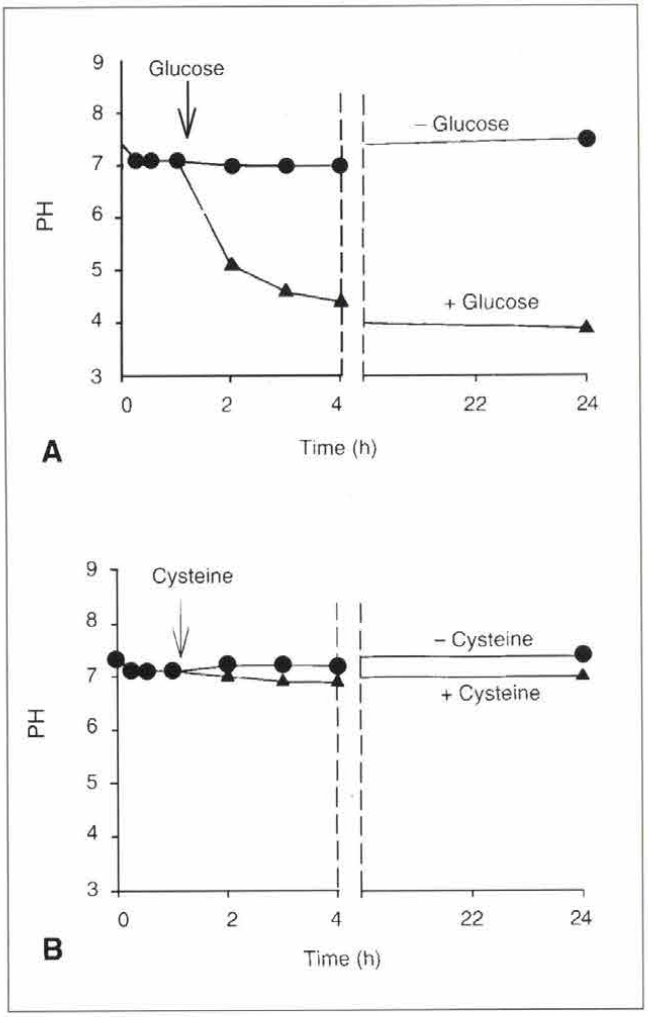

图 3　在唾液沉淀物臭味系统中，28mM 的葡萄糖（A）和6mM 的半胱氨酸（B）对 pH 变化的作用。孵育 1 个小时后，加入一种或另一种底物或者对照物水。在此图及图 4 至图 7 中，唾液沉淀物为 16.7%（v/v），唾液上清液为 33.3%（v/v）

在 SSS 系统中半胱氨酸刺激臭味形成的模型和测定

半胱氨酸是较早发现的、通过口腔细菌产生 VSCs 的重要底物。而且在我们实验室里，也发现这种氨基酸对 Eh 的影响很显著。SSS 系统以及前述方法都用于检测半胱氨酸对于臭味形成的刺激作用，结果见图 3 和图 5。

和加入葡萄糖不一样，加入半胱氨酸对 pH 的改变很小或没有（图 3）。对气相和液相的鼻闻法测量显示，臭味的产生在加入半胱氨酸后的初期有上升（图 5）。VSCs 水平表现出陡升且持久，而 Eh 有大的下降，这和期望的一样。令人惊奇的是，当加入半胱氨酸后，对照组的吲哚和甲基吲哚水平在试验结束时从 14.0 下降到 3.2μg/ml。这种对于吲哚和甲基吲哚水平的作用可能是半胱氨酸降解和色氨酸降解竞争的结果。这就可能解释为什么有些有口臭的病人 VSCs 测量值低而吲哚和甲基吲哚水平高，或是相反情况。

锌抑制半胱氨酸来源的臭味的模型和测定

可以建立相类似的模型以研究人所共知的除臭剂 – 锌对臭味的作用。臭味在预制的孵育混合物中第 1 个小时内产生。然后加入半胱氨酸使对照组和试验组的孵育混合物所产生的臭味增加；同时，在试验组的孵育混合物内加入氯化锌（$ZnCl_2$），其终浓度为 6mM。继续孵

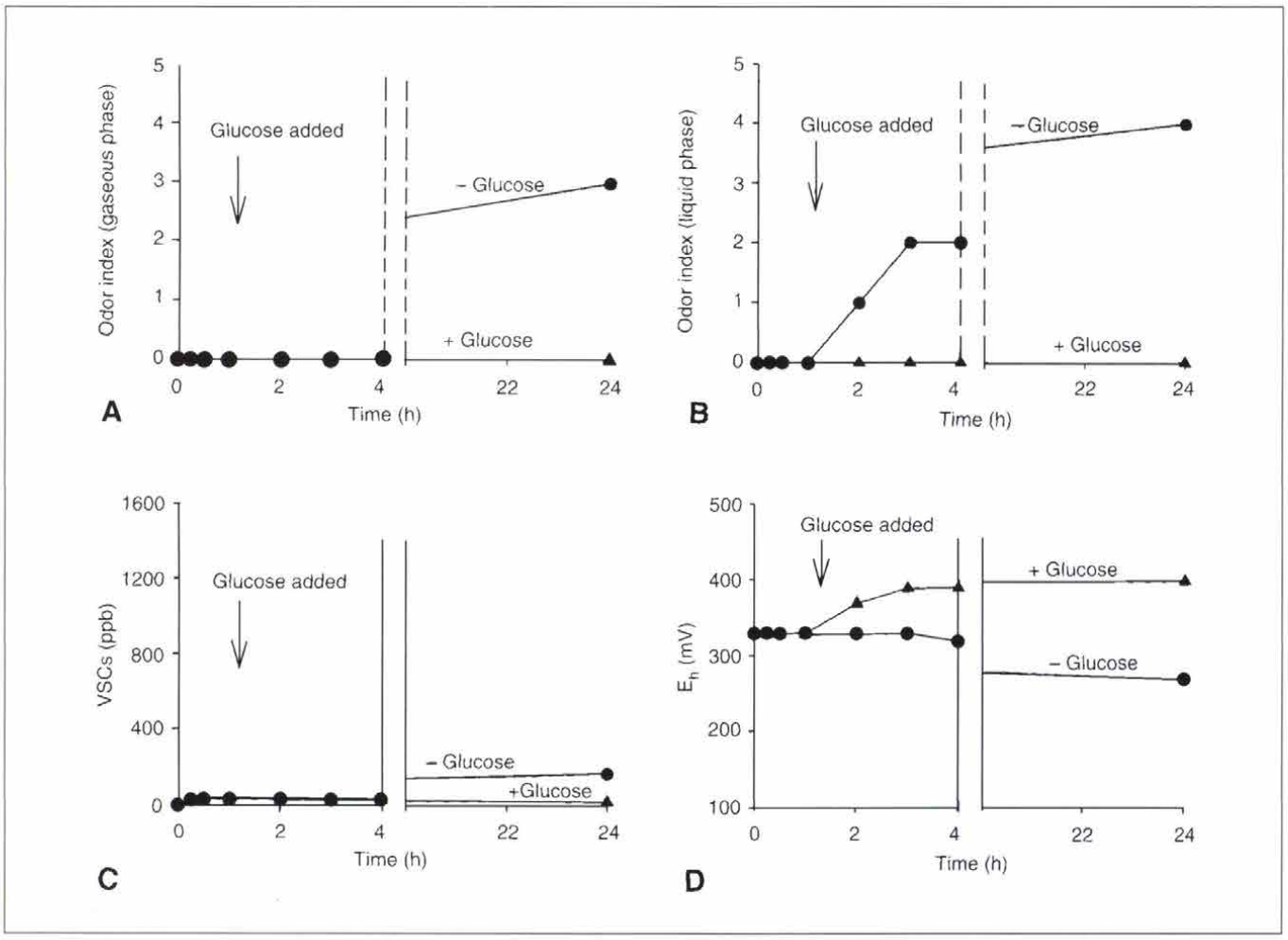

图4 28mM 的葡萄糖对在唾液沉淀物臭味系统中(A)预留空间(气相)气味、(B)液相气味、(C)挥发性硫化合物(VSCs)水平以及(D)氧化-还原电势(Eh)变化的作用。孵育1个小时后,加入葡萄糖或者对照物水,鼻闻法检测气相和液相的气味

育24个小时,结果见图6。

锌降低了 VSCs 的产生,用鼻闻法检测到臭味有一定程度的抑制,对 Eh 也有少量作用,而对吲哚和甲基吲哚的作用甚微。

次氯酸钠抑制半胱氨酸来源的臭味的模型和测定

本试验和前面的试验一样,只是用 11.1mM (0.1% w/v) 的次氯酸钠代替氯化锌作为除臭剂。次氯酸钠通常被看作为稳定的二氧化氯,目前被许多牙科医师用来控制口臭。试验结果见图7。次氯酸钠可以降低 VSCs 水平,抑制臭味(用鼻闻法检测)以及升高 Eh。

在 SSS 系统中模拟微生物负载的变化

微生物负载包括2方面因素,一个是细菌的数目,或者更正确地说是菌群的量;另一个因素是细菌的活性,或者说是指能够进行代谢功能的某些细菌类型的比例。微生物负载中的任何一种参数的变化对于细菌代谢的活性都有很大的影响,从而也影响臭味的形成。

模拟在口腔微生物群落中,非选择性地减少细菌数目(类似通过刷牙或漱口液的化学作用使细菌数目下降)可以通过减少 SSS 系统中沉淀物的量而做到。此法适用于检测减少牙面菌斑、尤其是舌面上的菌斑,对口臭的影响。然而用此模型时,应当用已煮沸过的相同量的沉淀物来补足减少的部分。煮沸可杀死细菌,但不

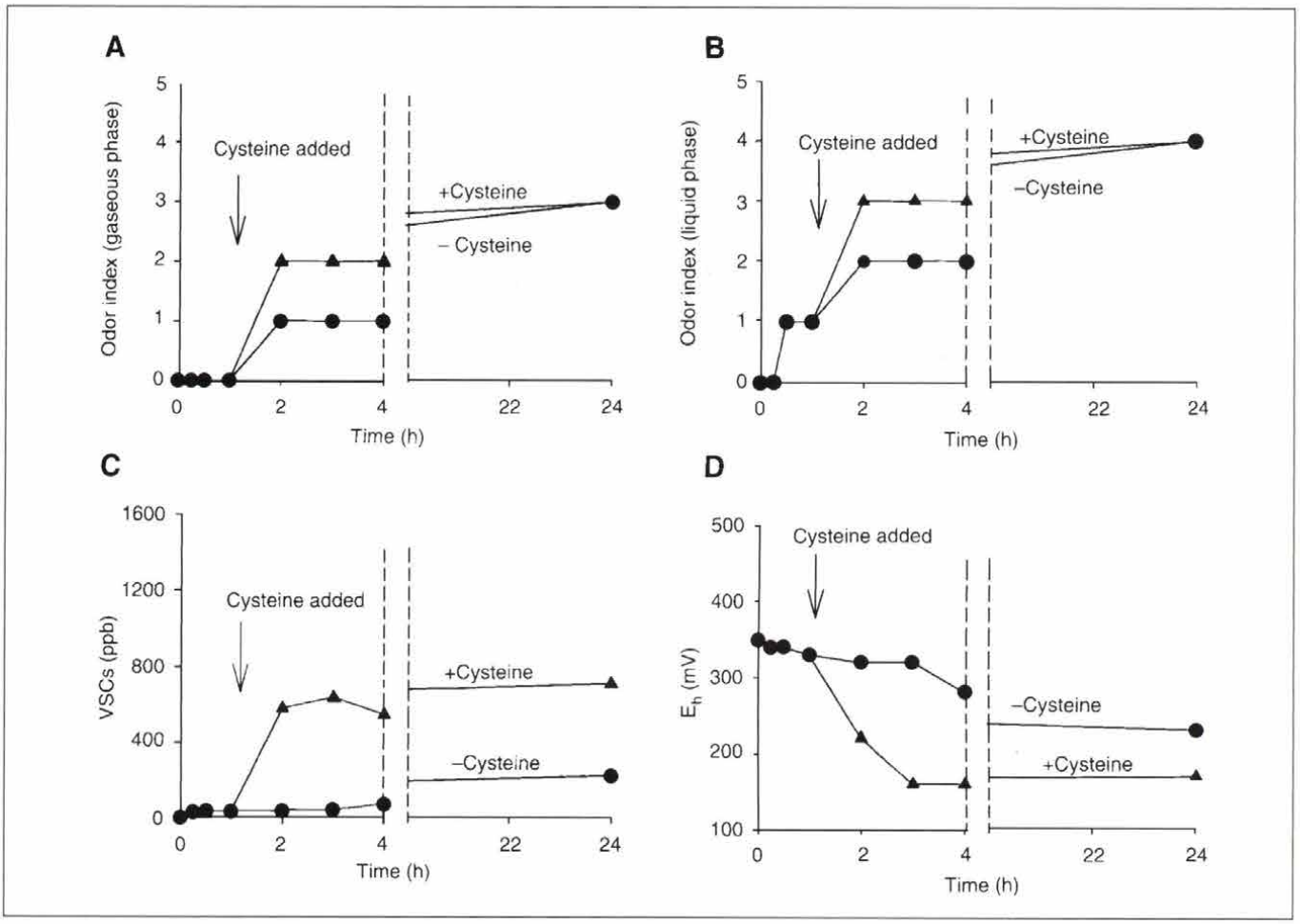

图 5 6mM 的半胱氨酸对在唾液沉淀物臭味系统中(A)预留空间(气相)气味、(B)液相气味、(C)挥发性硫化合物(VSCs)水平以及(D)氧化－还原电势(Eh)变化的作用。孵育 1 个小时后，加入半胱氨酸或者对照物水，鼻闻法检测气相和液相的气味

改变其缓冲能力。这种方法可以保持沉淀物对于孵育系统原有的缓冲作用，以便单独评估细菌本身的作用。如果用杀菌剂来杀死细菌（如使用各种漱口液），则不必要加入煮过的沉淀物了。

通过用产气或不产气的微生物的纯培养物替代一部分沉淀物，可以改变微生物负载的细菌活性部分。这种处理可有助于模拟体内的微生物群的变化，对微生物群落的不同的产气能力的模拟是有用的，例如在口腔内不同部位的微生物群落。通过这种方法，各种比较性研究就成为可能，并且对不同的细菌－底物混合物对臭味产生的作用进行检测和定量。可以把口腔中不同细菌的纯培养物进行适当比例的混合，建立一个特定的细菌群落。包括有产气能力的和无产气能力的细菌。此模型的优点之一是这些细菌是特定的，故可以研究细菌之间的相互拮抗或协同作用。最简单的模型是只有单一微生物。然而这不适于对口臭的模拟，因为在口臭的形成中有多种微生物起作用。

事实上，上述人为构成的唾液沉淀物和纯培养混合物模型之间可互相补充。唾液沉淀物模型更接近体内环境，经常被使用。纯培养混合物稍差些，但可以对臭味产生的机理和各种有关细菌的相互作用进行更清楚的研究。

含除臭剂的漱口液的测试

许多除臭剂以漱口液的形式用于口腔内。体外模拟试验，可将唾液沉淀物在试验药中放置 30 秒（或者其它试验时间）后，沉淀物用蒸馏水洗，模拟唾液的清除作

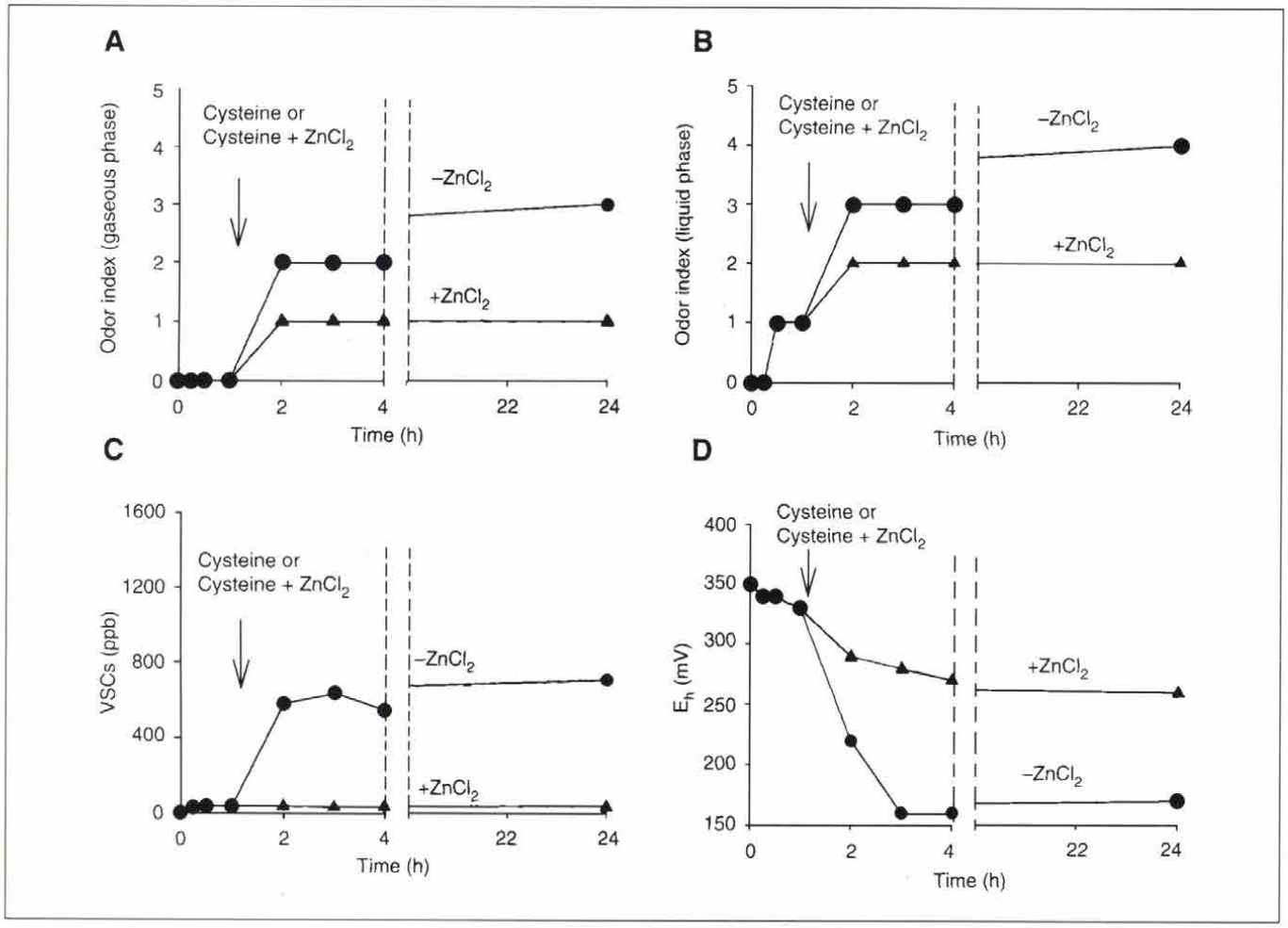

图 6 6mM 氯化锌($ZnCl_2$)对在唾液沉淀物臭味系统中另外加入半胱氨酸刺激后，对(A)预留空间(气相)气味、(B)液相气味、(C)挥发性硫化合物(VSCs)水平以及(D)氧化－还原电势(Eh)变化的作用。孵育 1 个小时后，加入氯化锌＋半胱氨酸或者单独半胱氨酸作为对照

用。然后如上所述进行有效性的研究。如果受试药是一种杀菌剂，它的作用应和广泛使用的已经被证实有杀菌作用的氯己定进行比较。

其它的除臭剂可影响产臭气细菌的作用，而不直接影响细菌的活力。锌制剂就是能够影响 VSCs 产生的除臭剂。

把体内、体外两种方法结合起来，可形成很有效的试验方法。除臭剂首先在体外试验，根据其结果可设计随后在体内进行有效性试验的最佳方案。体内试验基本上包括在设定时间内使用除臭剂，以及对已改变了臭味特性的样本进行试验。在进行口腔清洁或使用漱口液的前后，在分泌的唾液中发现有活着的细菌，依此评估除臭剂的有效性。

如前所述，VSCs 的测量可以用气相色谱法，或者更简单的是用 Halimeter。两种仪器都可以在体内和体外对 VSCs 进行评估，特别是硫化氢。而 Halimeter 在进行体内的半胱氨酸激发实时试验时尤其有效，含漱 5ml 浓度为 6mM 的半胱氨酸 30 秒激发后，通过细菌作用可以迅速产生 VSCs(图 8)。

常用的除臭剂氯化锌和次氯酸钠（单独使用和联合使用)在体内对 VSCs 的抑制作用的结果在图 8 和图 9 中列出。这两种除臭剂所使用的浓度是它们在体外的有

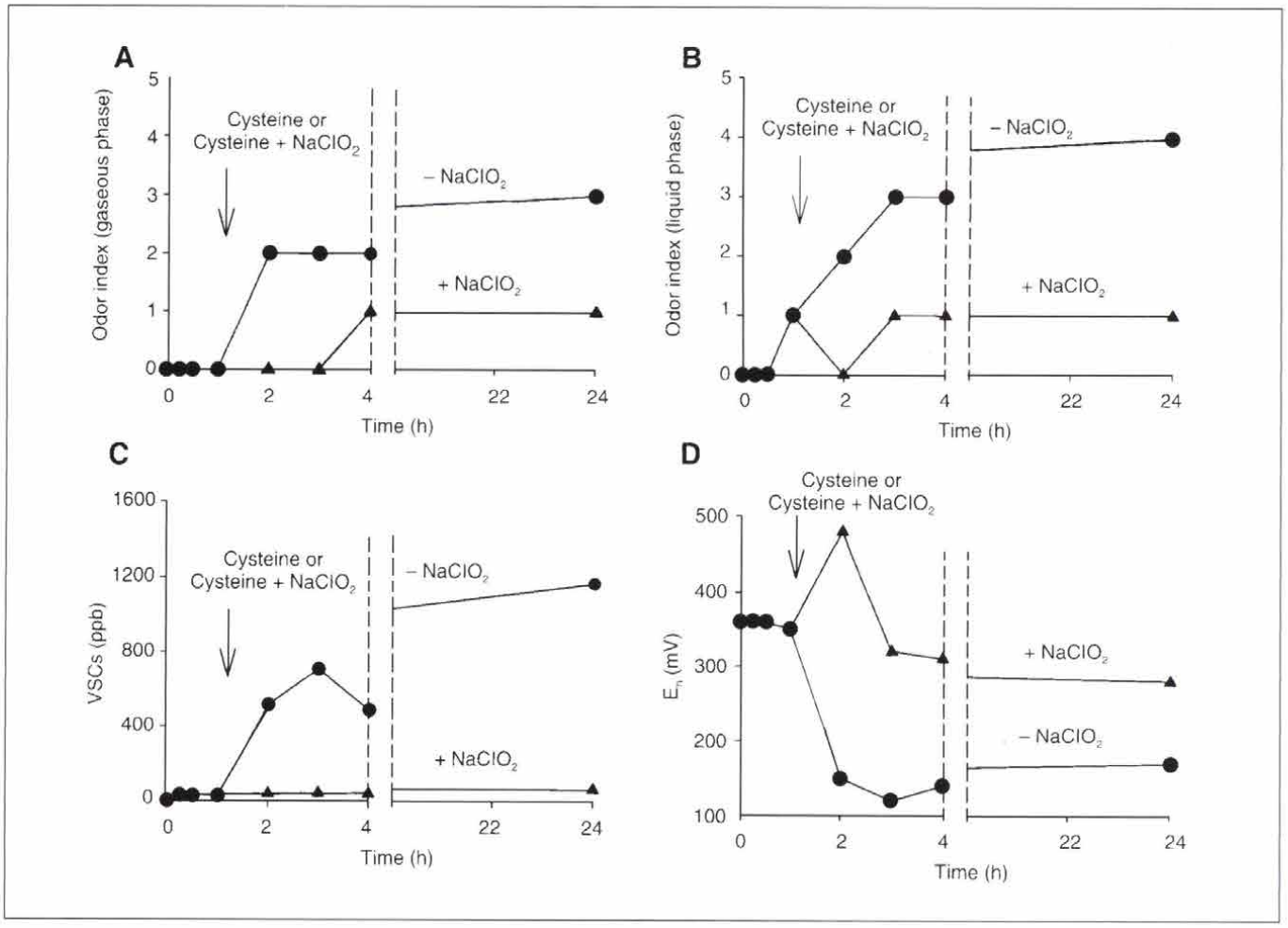

图 7 11.1mM (0.1% w/v)的次氯酸钠(NaClO2)对在唾液沉淀物臭味系统中另外加入半胱氨酸刺激后,对(A)预留空间(气相)气味、(B)液相气味、(C)挥发性硫化合物(VSCs)水平以及(D)氧化-还原电势(Eh)变化的作用。孵育 1 个小时后,加入次氯酸钠+半胱氨酸或者单独半胱氨酸作为对照。

效浓度。由于唾液的稀释作用,单独使用该浓度的次氯酸钠没有效果。但当浓度提高时(0.5% w/v)就有效。可用同样的方法试验其它能够杀菌的除臭剂是否可以降低 VSCs 水平。值得注意的是,0.1% (w/v) 浓度的次氯酸钠在体内激发试验时没有效果,而和氯化锌联合使用时,有效性就提高了。

讨论

总之,模型和试验是用来获得关于一种生物现象或过程的基本信息的。口臭模型试图回答在体内可能难于进行研究的问题。模型通常是动态变化着的,以适应不断的变化以及当新的知识出现时能变得更有代表性。在绝大多数试验中,还包括一系列亚模型,用来模拟这个系统的一个部分。这些试验基本上是真正系统或者是系统模型的测量或样本。较好的模型是实时方法。

单一微生物的纯培养物模型是不够的,因为(1)模型太简单;(2)细菌成分受限定;(3)治疗方法通常是即刻显效的,例如,使用疫苗来消除或中和模型中的纯培养物。然而,纯培养物模型对于引起口臭的单一原因的模拟是最不令人满意的,因为不止一种微生物能够引起口臭。混合 2 种微生物较容易,而混合 3 种微生物就比较困难,而 3 种以上就几乎不易实施。

菌斑和唾液沉淀物中有可以用来解释整个臭味产生过程的细菌混合物。最好采用沉淀物是因为量多且容易

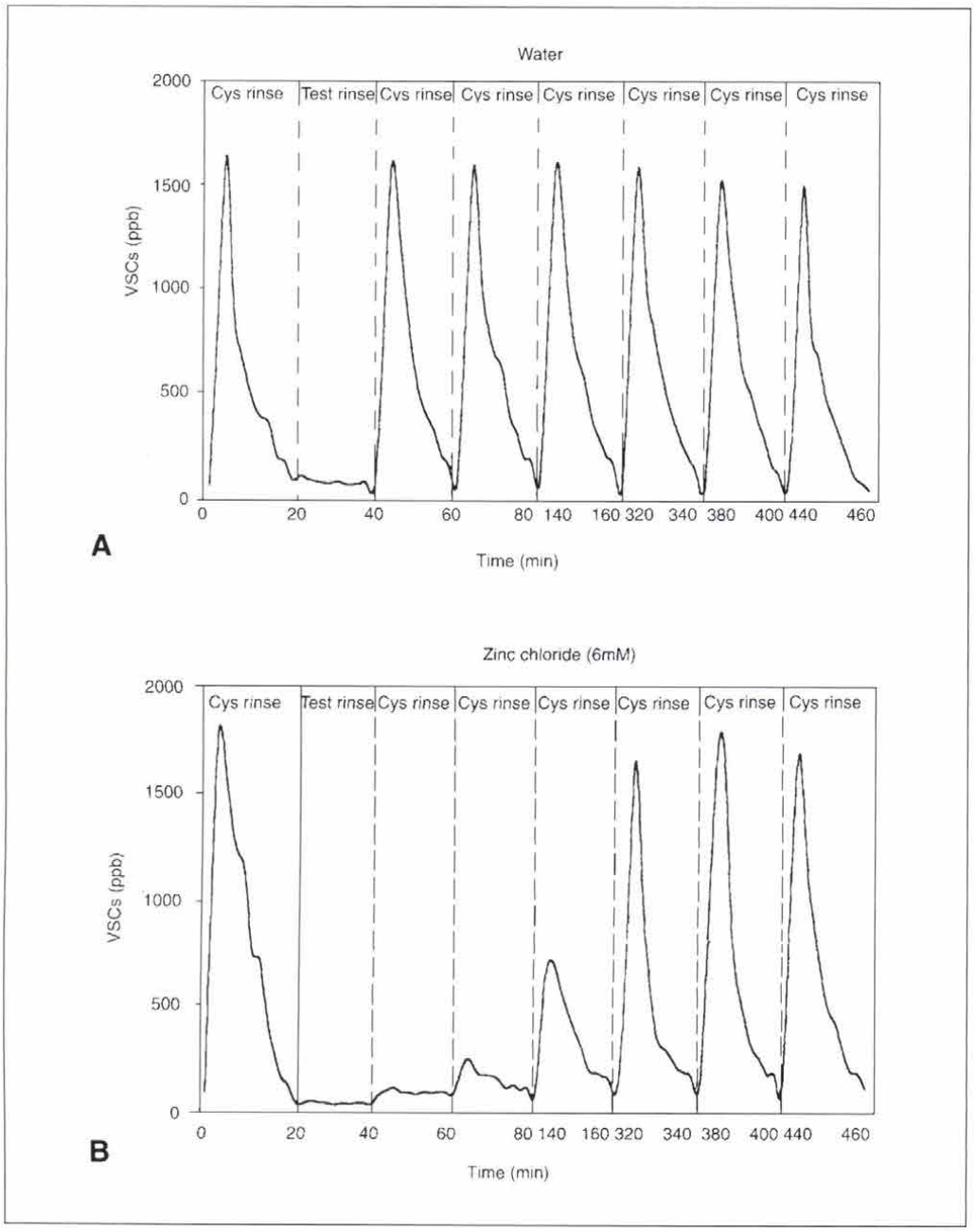

图 8 体内试验，VSCs 对在含漱(A)蒸馏水和(B)6mM 的氯化锌前和依次含漱后，用 6mM 半胱氨酸(Cys) 漱口的反应。每一个样本用 5ml 的漱口液含漱 30 秒

收集，特别是立即就可以获得细菌。

也可以采用杂交系统解决这些微生物限定的大部分问题，判定某种特定微生物在臭味产生或抑制中的作用。此时可以通过在自然混合物中加入另外一种或几种选择性的纯培养物来进行调节。通过这种简单的方法，就可以对在口腔中的混合细菌环境中某种特异的微生物在臭味形成过程中的作用进行检验。

由于口腔微生物群落是由细菌的混合物所组成，它能够很容易适应由于某些微生物种的生长和其它种的衰败或死亡而形成的口腔环境的变化。细菌组成成分的

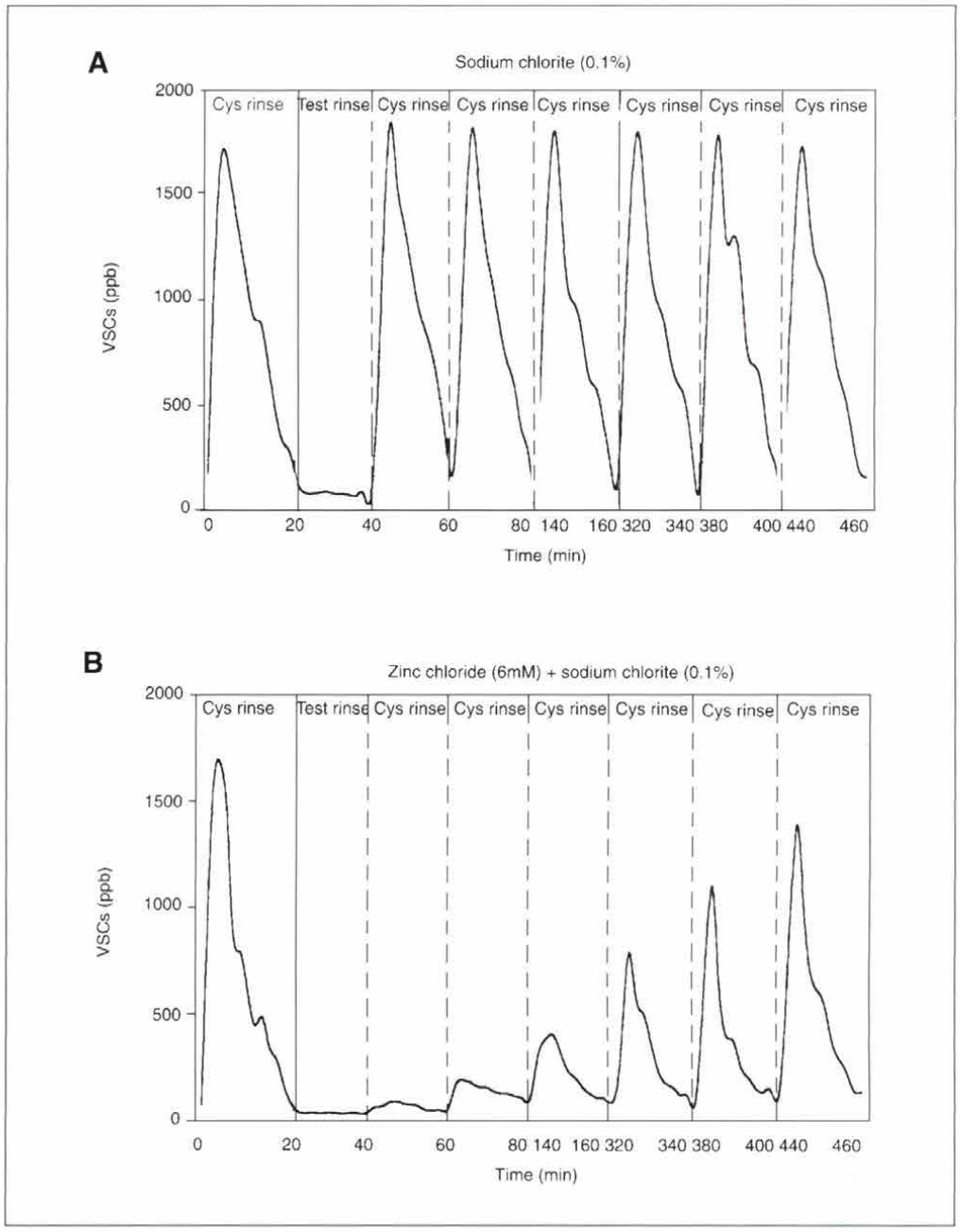

图 9 体内试验，VSCs 对在含漱(A)11.1mM (0.1% w/v)的次氯酸钠和(B)6mM 的氯化锌 + 11.1mM (0.1% w/v)的次氯酸钠前和依次含漱后，用 6mM 半胱氨酸 (Cys) 漱口的反应。每一个样本用 5ml 的漱口液含漱 30 秒。

这些变化可以转化为细菌酶水平和有关的代谢活性的变化，包括可以产臭或不再产臭的变化。把纯培养物加入到唾液沉淀物中或菌斑中的模型使这样的生态微生物群落的变化的识别和研究变得更容易。

最后，出于节省费用和保护人体的考虑，模型对于新的除臭剂在临床试验和昂贵的临床研究开始之前的试验尤其有用。而且，模型可以帮助鉴别用于检查的新的试验参数，需要发展和改进的试验，以及获得用于分析的有代表性的样本。