

蔗糖浓度对重症婴幼儿龋菌斑中变形链球菌致龋性的影响

赵 玮¹, 李文卿¹, 卢佳璇¹, 余东升^{2*}

(中山大学光华口腔医学院 1.儿童口腔科, 2.口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

摘要:【目的】探讨不同蔗糖浓度对重症婴幼儿龋(S-ECC)菌斑中变形链球菌致龋性的影响。【方法】采集 67 名 3~5 岁 S-ECC 及无龋儿童牙面菌斑, 获取纯化的变链菌株, 接种至蔗糖浓度分别为 1%、5%、10%及 20%的 PYG 液体培养基, 采用精密 pH 计测变链菌产酸能力;分光光度仪测定 OD₆₀₀ 值, 评价其生长情况;蒽酮法测定水不溶性葡聚糖(WIG)的量;比浊法测定变链菌的黏附比值, 对比分析变形链球菌不同临床菌株的致龋性。【结果】随蔗糖浓度升高, S-ECC 及无龋组变形链球菌临床分离菌株产酸、合成胞外多糖及粘附能力均呈增长趋势, 并且表现为蔗糖浓度依赖性。S-ECC 组变链菌株 ΔpH 值、OD₆₀₀ 值、合成 WIG 量及黏附比例均显著高于无龋组。S-ECC 组中, 变链菌株的产酸能力随蔗糖浓度增高而增强, 当蔗糖浓度达 5%时, 变链菌株产酸降至釉质脱矿临界 pH 5.5 附近;变链菌株生长情况(OD₆₀₀ 值)显示, 当蔗糖浓度大于 5%时, 变链菌生长情况良好, S-ECC 组表现得最为明显, 当蔗糖浓度大于 10%, 变链菌株生长速率有所降低, 无龋组 10%浓度蔗糖作用下 OD₆₀₀ 值甚至高于 20%浓度组;变链菌株合成 WIG 的量随蔗糖浓度增高而增加, 当蔗糖浓度大于 10%, WIG 合成增长变缓;随着蔗糖浓度增高, 变链菌黏附比值增加, 蔗糖浓度大于 5%时, 增长趋势变缓慢。【结论】S-ECC 菌斑中变形链球菌致龋性与蔗糖浓度有关, 随蔗糖浓度升高变链菌株的致龋能力增强, 5%及以上浓度蔗糖具有较强的致龋性, 应予以足够重视。

关键词: 儿童早期龋; 变形链球菌; 蔗糖

中图分类号: R569

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)05-0623-05

Effect of Sucrose Concentration on Cariogenicity of *Streptococcus mutans* in Dental Plaque of S-ECC

ZHAO Wei¹, LI Wen-qing¹, LU Jia-xuan¹, YU Dong-sheng^{2*}

(1.Department of Pediatric Dentistry, 2.Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objective】To determine the effect of sucrose concentration on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in dental plaque of S-ECC. 【Methods】Plaque samples were collected from 67 children aged from 3 to 5. Strains of *Streptococcus mutans* were identified, purified and then cultured in PYG medium with 1%, 5%, 10%, and 20% sucrose. The pH value of supernatant was measured to evaluate acidogenicity of *Streptococcus mutans*, and OD₆₀₀ to evaluate the propagating status. The quantities of water insoluble glucans (WIG) were measured by anthrone method. Turbidimetry was used to measure the adhesive ability. 【Results】Acidogenicity, propagation, WIG synthesis, and adhesion ratio of *Streptococcus mutans* from S-ECC group were statistically higher than caries free group. The cariogenicity of *Streptococcus mutans* enhanced with the increase of sucrose concentration. In 5% sucrose group, pH decreased to critical pH5.5. Propagation, WIG synthesis and adhesion ratio increased a lot, especially in S-ECC group. When sucrose concentration was above 5%, ΔpH, OD₆₀₀, WIG and adhesion ratio still increased, however, the growth rate became slow down. 【Conclusion】The cariogenicity of *Streptococcus mutans* was dose-dependent with sucrose levels, and the concentration of which exceeded 5% is considered to be more cariogenic and important for S-ECC prevention.

Key words: early childhood caries; *Streptococcus mutans*; sucrose

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5):623-627]

收稿日期: 2011-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(30973340); 广东省自然科学基金项目(9151008901000187); 广东省科技计划社会发展项目(00316971120302088)

作者简介: 赵玮, 副教授; * 通信作者: 余东升, 教授, E-mail: yuzhw992003@yahoo.com.cn

重症婴幼儿龋 (severe early childhood caries, S-ECC) 是指 3 岁以下儿童累及一个或多个光滑面的龋坏、6 岁以下儿童出现的前牙一个/多个光滑面的龋坏或 dmfs ≥ 6 的病例^[1-2]。S-ECC 具有发病年龄小且进展快, 常波及多个乳牙引起广泛龋损的特点, 严重影响了患儿的健康和生活质量。病因学研究显示, 变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 和糖类的过量摄入是 S-ECC 最主要的致病因素^[3-4]。蔗糖作为致龋性最强的碳水化合物^[5], 其在相同浓度下, 与葡萄糖、果糖及淀粉等糖类相比, 可使生物膜的 pH 值迅速降低, 从而打破了菌斑生物膜的平衡关系, 导致釉质脱矿^[6-8]。此外, 蔗糖的致龋潜能与摄入的浓度和频率有关, 随着浓度增加, 蔗糖致龋性呈增长趋势^[9]。目前, 不同浓度蔗糖对乳牙 S-ECC 菌斑中变形链球菌临床分离菌株致龋性的影响尚未阐明。本研究采用体外培养的方法, 通过比较不同浓度蔗糖对 S-ECC 及无龋儿童菌斑生物膜中变形链球菌的产酸能力、合成水不溶性葡聚糖 (water insoluble glucan, WIG) 能力以及粘附能力的影响, 探讨蔗糖浓度与变形链球菌致龋的相关性, 为有效预防 S-ECC 的发生提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取中山大学北校区幼儿园 67 名 3~5 岁儿童研究为对象, 其中男 39 名, 女 28 名, 无遗传性、系统性疾病, 身体健康, 无口内正畸装置, 并且取菌斑前 1 周内, 未服用任何抗生素类药物。根据 NIH 标准及患龋情况分组: S-ECC 组 35 人, 对照组无龋儿童 32 人。

1.2 牙菌斑样本采集

受试儿童于菌斑采集前 1 h 禁食, 用无菌探针采集菌斑。S-ECC 儿童取龋坏组织附近的牙面菌斑, 无龋儿童取上下颌第一乳磨牙颊侧颈 1/3 及上前牙唇面颈 1/3 菌斑, 均置于巯基乙醇酸钠转送液中, 碎冰保存, 2 h 内送回实验室。

1.3 变形链球菌分离纯化及鉴定

将所采集的每一份菌斑样本液用 PBS 液 10 倍稀释至 10^{-4} , 吸取 50 μL , 均匀涂布于 TYCSB 选择性培养基, 置于 10% CO_2 、80% N_2 及 10% H_2 条件下, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 48 h; 根据变形链球菌菌落

的典型形态挑取单个菌落, 采用平板划线法, 在 TYCSB 培养基上次代纯培养。同时将冻存的 UA159 标准菌株复苏作为阳性对照。采用革兰染色法进行菌体形态鉴定, 并采用微量生化管进行生化鉴定。将已鉴定的 56 株变链菌株置于含 20% 甘油的 BHI 液体培养基, -80 $^\circ\text{C}$ 冻存。

1.4 不同浓度蔗糖对变形链球菌产酸能力的影响

取将冻存的 56 株变链菌株复苏, 调整菌液浓度为 $\text{OD}_{600} = 0.1$, 取 50 μL 接种至 5 mL 蔗糖浓度分别为 1%、5%、10% 及 20% 的 PYG 液体培养基, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温、厌氧培养 18 h; 将菌液 1 500 r/min ($r = 13.5 \text{ cm}$) 离心 10 min, 取上清, 采用精密 pH 计检测上清的 pH 值, 每个样本重复测定 3 次取均值。以 7.4 为起始 pH 值, 计算 ΔpH 。

1.5 不同浓度蔗糖对变形链球菌生长情况的影响

将步骤 3 离心的菌沉淀用 PBS 重悬, 剧烈振荡 5 s, 在分光光度仪上测波长 600 nm 处的吸光度, 每个样本重复测定 3 次取均值。

1.6 不同浓度蔗糖对变形链球菌合成胞外多糖能力的影响

采用蒽酮法进行检测。首先绘制蒽酮测定标准曲线, 然后取 50 μL 菌液 ($\text{OD}_{600} = 0.1$) 接种及培养方法同步骤 3, 将菌液离心, 弃上清, 用 0.4 mol/L NaOH 溶液 5 mL 重悬菌沉淀, 离心, 收集上清液, 重复此操作 3 次, 将所得上清液合并。取合并后的上清液 1.0 mL, 加入蒽酮试剂 3.0 mL, 95 $^\circ\text{C}$ 水浴中加热 6 min, 冷却, 在分光光度仪上测波长 625 nm 处吸光度, 通过标准曲线计算水不溶性胞外多糖的量。

1.7 不同浓度蔗糖对变形链球菌黏附能力的影响

取 50 μL 菌液 ($\text{OD}_{600} = 0.1$) 接种至 5 mL 蔗糖浓度分别为 1%、5%、10% 及 20% 的 PYG 液体培养基, 倾斜 30 $^\circ$ 放置, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 18 h; 将培养好的实验试管标记为 a, 将菌液倒入另一洁净试管 b; 向试管 a 中加入 3 mL PBS 缓冲液, 洗脱液倒入另一洁净试管 c; 试管 b、c, 3 000 r/min 离心 15 min ($r = 13.5 \text{ cm}$), 弃上清, 在试管 a、b、c 中各加入 3 mL PBS 缓冲液, 漩涡混合器上震荡混匀。以 PBS 作为空白对照, 在分光光度仪上测波长 540 nm 的吸光度, 每个样本重复测定 3 次取均值。细菌黏附比按以下公式计算: 黏附比 = $\text{OD}_a / (\text{OD}_a + \text{OD}_b + \text{OD}_c) \times 100\%$ 。

1.8 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件,对不同浓度蔗糖作用下,S-ECC 及无龋儿童变链临床分离菌株的 ΔpH 、 OD_{600} 值、WIG 量及粘附比值进行正态性检验,将所得数据建立一般线性模型,进行多因素方差分析。应用 LSD 统计方法,对 1%、5%、10% 及 20% 不同蔗糖浓度组间的致龋性进行组间比较,并进行各检测指标的相关分析。

2 结 果

2.1 不同浓度蔗糖作用下变链菌株的产酸能力

不同浓度蔗糖作用下,变链菌株产酸(ΔpH)情况如表 1 所示,UA159 组及 S-ECC 组平均 ΔpH 为 2.0 左右,按照起始 pH 值 7.4 计算,5% 蔗糖作用下,S-ECC 组 pH 值已降至临界 pH 5.5 附近,10% 及 20% 浓度组明显低于临界 pH 值。

2.2 不同浓度蔗糖作用下变链菌株的生长情况

不同浓度蔗糖作用下,变链菌株生长情况(OD_{600} 值)见表 2,当蔗糖浓度大于 5% 时,变链菌生长情况良好,S-ECC 组表现得最为明显。当蔗糖

浓度大于 10%,变链菌株生长速率有所降低,无龋组 10% 浓度蔗糖作用下 OD_{600} 值甚至高于 20% 浓度组。

2.3 不同浓度蔗糖作用下 WIG 的合成

以蒽酮法测定葡聚糖标准品,建立标准曲线及建立回归方程: \hat{y} (葡聚糖量,mg/mL)=-0.014+0.397x(吸光度值)。

不同浓度蔗糖作用下,变链菌株合成 WIG 的情况如表 3 所示,蔗糖浓度为 1% ~ 10% 时,变链菌合成的 WIG 增长明显。当蔗糖浓度大于 10%,WIG 合成增长变缓,S-ECC 组变链菌株合成 WIG 的量高于无龋组及 UA159 标准菌株。

2.4 不同浓度蔗糖作用下变链菌株的黏附能力

按照比浊法测定 OD_{540} 值,并计算黏附比值,结果表明不同浓度蔗糖作用下,变链菌株黏附能力的情况如表 4 所示,蔗糖浓度大于 5% 时,变链菌的黏附比值增长趋势变缓慢,S-ECC 组、无龋组及 UA159 标准菌株的增长趋势相同。

2.5 不同蔗糖浓度对变链菌株致龋能力影响的两两比较

采用 LSD 的方法将不同浓度蔗糖作用下,

表 1 不同浓度蔗糖作用下 ΔpH 值

Table 1 Effect of sucrose concentration on the value of ΔpH

($\bar{x} \pm s$)

Sucrose concentration	1%	5%	10%	20%	Total
S-ECC	0.86 ± 0.43	1.73 ± 0.78	2.36 ± 0.67	2.76 ± 0.49	1.92 ± 0.94
Caries free	0.56 ± 0.15	0.84 ± 0.31	1.22 ± 0.39	1.48 ± 0.49	1.02 ± 0.50
UA159	1.32 ± 0.34	1.86 ± 0.67	2.25 ± 0.71	2.73 ± 0.49	2.04 ± 0.72
Total	0.78 ± 0.40	1.40 ± 0.76	1.92 ± 0.79	2.27 ± 0.79	1.59 ± 0.89

表 2 不同浓度蔗糖作用下变链菌株生长情况

Table 2 Effect of sucrose concentration on propagation of *Streptococcus mutans*

($\text{OD}_{600}, \bar{x} \pm s$)

Sucrose concentration	1%	5%	10%	20%	Total
S-ECC	0.29 ± 0.30	0.54 ± 0.49	0.75 ± 0.49	0.85 ± 0.48	0.61 ± 0.49
Caries free	0.06 ± 0.05	0.13 ± 0.08	0.24 ± 0.15	0.22 ± 0.12	0.16 ± 0.13
UA159	0.08 ± 0.06	0.26 ± 0.09	0.35 ± 0.12	0.48 ± 0.16	0.29 ± 0.18
Total	0.18 ± 0.24	0.36 ± 0.41	0.52 ± 0.44	0.58 ± 0.47	0.41 ± 0.42

表 3 不同浓度蔗糖作用下变链菌株合成 WIG 的情况

Table 3 Effect of sucrose concentration on WIG synthesis of *Streptococcus mutans*

($\bar{x} \pm s$)

Sucrose concentration	1%	5%	10%	20%	Total
S-ECC	0.072 ± 0.055	0.143 ± 0.091	0.265 ± 0.157	0.308 ± 0.183	0.197 ± 0.160
Caries free	0.032 ± 0.041	0.049 ± 0.035	0.089 ± 0.033	0.102 ± 0.040	0.068 ± 0.046
UA159	0.056 ± 0.008	0.117 ± 0.021	0.159 ± 0.023	0.196 ± 0.024	0.132 ± 0.057
Total	0.055 ± 0.050	0.105 ± 0.082	0.188 ± 0.142	0.220 ± 0.166	0.142 ± 0.135

ΔpH , OD_{600} 值, WIG 及黏附比值进行两两比较, 结果如表 5 所示, 随蔗糖浓度升高, 变链菌株的致龋能力呈增长趋势, 1% 浓度组 ΔpH , OD_{600} 值, WIG 及黏附比值均低于其余各浓度组, 且差别具有统计学意义 ($P < 0.01$); 5% 浓度组除 OD_{600} 值与 10%

浓度组差别无统计学意义 ($P = 0.052$), 其余各指标与 10% 及 20% 浓度组差别有统计学意义 ($P < 0.01$); 20% 浓度组 ΔpH , OD_{600} 值, WIG 及黏附比值均高于 10% 浓度组, 但仅 ΔpH 与 10% 差别有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 4 不同浓度蔗糖作用下变链菌株的黏附比例

Table 4 Effect of sucrose concentration on adhesion ratio of *Streptococcus mutans*

($\bar{x} \pm s$)

Sucrose concentration	1%	5%	10%	20%	Total
S-ECC	0.463 \pm 0.089	0.717 \pm 0.075	0.773 \pm 0.070	0.806 \pm 0.084	0.690 \pm 0.156
Caries free	0.255 \pm 0.027	0.437 \pm 0.047	0.539 \pm 0.098	0.583 \pm 0.106	0.454 \pm 0.148
UA159	0.427 \pm 0.069	0.701 \pm 0.142	0.787 \pm 0.091	0.807 \pm 0.054	0.680 \pm 0.177
Total	0.387 \pm 0.122	0.617 \pm 0.151	0.691 \pm 0.140	0.727 \pm 0.140	0.605 \pm 0.191

表 5 不同蔗糖浓度组致龋性的两两比较

Table 5 Pair-wise comparison of cariogenicity of sucrose concentration

(I) sucrose concentration (%)	(J) sucrose concentration (%)	ΔpH		OD_{600}		WIG		Adhesion ratio	
		Difference of means (I-J)	P	Difference of means (I-J)	P	Difference of means (I-J)	P	Difference of means (I-J)	P
1	5	-0.619	0.000	-0.177	0.033	-0.125	0.043	-0.230	0.000
	10	-1.133	0.000	-0.338	0.000	-0.335	0.000	-0.304	0.000
	20	-1.484	0.000	-0.393	0.000	-0.414	0.000	-0.340	0.000
5	10	-0.514	0.000	-0.161	0.052	-0.210	0.001	-0.074	0.000
	20	-0.865	0.000	-0.216	0.009	-0.289	0.000	-0.110	0.000
10	20	-0.351	0.007	-0.055	0.504	-0.079	0.202	-0.036	0.078

3 讨论

流行病学调查显示 S-ECC 患儿普遍存在过量或过频摄入含糖较高的黏性固体食物以及果汁、饮料的情况^[10]。另有研究指出, 婴幼儿每日糖摄入量影响菌斑微生物的组成比例, 与 ECC 的发生关系密切^[11]。因此, 糖类尤其是蔗糖的致龋作用日益受到关注。蔗糖作为变链菌合成胞外多糖的底物, 在各种碳水化合物中致龋性最强^[5], 其致龋的重要机制主要包括两个方面, 一方面是其能够被代谢产酸, 导致 pH 值下降, 降低生物膜中 Ca、P、F 的浓度, 从而打破菌斑生物膜的平衡关系, 加速牙体硬组织的溶解^[12-13]; 另一方面则是其可作为合成胞外多糖的底物, 诱导和促进细菌在牙面不可逆性黏附、聚集以及菌斑生物膜的形成。

近年来, 国内外主要采用了原位研究的方法从蔗糖的摄入浓度、频率、蔗糖与其它碳水化合物

的相互作用等方面对其致龋性进行了分析^[6-7, 9, 14]。原位研究的方法是通过在口腔内佩戴热凝膜基托, 完成针对成人口腔中恒牙的相关研究。而本研究旨在探讨蔗糖对乳牙列中重症婴幼儿龋的致龋作用, 因儿童难以配合口内治疗及持续佩戴相关装置, 因此本实验采用体外培养的方法进行研究。

本实验通过体外实验, 探讨了不同浓度蔗糖作用下 S-ECC 及对照组变形链球菌的产酸能力、生长情况、合成水不溶性葡聚糖 (water insoluble glucan, WIG) 能力以及粘附能力等。结果显示, 随蔗糖浓度升高, S-ECC 及对照组变形链球菌临床分离菌株产酸、合成胞外多糖及黏附能力均呈增长趋势, 并且表现为蔗糖浓度依赖性。同时, 不同浓度蔗糖作用下, S-ECC 组变形链球菌致龋性显著高于无龋组, 从而进一步证实蔗糖是导致 S-ECC 发生的重要影响因素, 与病因学研究的结果一致。

对变链菌株产酸能力的研究发现, 在不同浓

度蔗糖作用下,其产酸能力随蔗糖浓度的升高而升高,当蔗糖浓度大于5%时,S-ECC组变链临床分离菌株产酸,使pH值已全部降至临近或低于釉质脱矿的临界pH值(5.5)以下,个别菌株甚至使pH值降低至4.5以下,从而加速釉质脱矿溶解。同时,随着蔗糖浓度的增加,变链菌株合成WIG的量亦呈增长趋势。1%蔗糖浓度条件下,WIG合成量显著低于其他浓度组,当蔗糖浓度达5%或以上时,WIG合成量的增长趋势减缓。变链菌株的黏附实验亦证实,5%蔗糖浓度时变链菌的黏附能力明显高于1%蔗糖浓度组,而5%蔗糖浓度与10%、20%蔗糖浓度组的黏附能力则趋于稳定。此外,当蔗糖浓度大于5%时,变链菌生长情况良好,S-ECC组表现得最为明显。当蔗糖浓度大于10%,变链菌株生长速率有所降低,无龋组10%浓度蔗糖作用下OD₆₀₀值高于20%浓度组。鉴此,提示我们5%是一个值得关注的蔗糖浓度,在5%及以上浓度蔗糖条件下,变链菌株的致龋性明显高于1%浓度。

本实验对所获数据进行了统计学分析,对不同浓度蔗糖组变链菌株致龋能力影响的组间比较显示,随蔗糖浓度升高,变链菌株的致龋能力呈增长趋势,1%浓度组 Δ pH,OD₆₀₀值,WIG及粘附比值均低于5%浓度及以上组,且差别具有统计学意义($P < 0.01$),提示1%浓度蔗糖的致龋性较弱,5%浓度以上蔗糖有较强的致龋性。Aires等^[9]的原位研究亦表明5%浓度蔗糖已具有很强的形成致龋性生物膜的能力,并且其致龋潜能与10%及20%浓度组差别无统计学意义。

综上所述,本研究采用体外培养的方法证实,蔗糖是S-ECC发生的重要影响因素,随蔗糖浓度升高,变形链球菌的致龋能力呈增长趋势。5%蔗糖浓度组的致龋性明显高于1%浓度组,而当蔗糖浓度大于5%时,致龋性并无明显增长。鉴此,我们认为浓度5%以上蔗糖的致龋性应予以足够重视,5%浓度可看作蔗糖致龋能力的敏感点,建议儿童在减少食糖摄入量、降低摄入频率的基础上,尤其应尽量减少浓度高于5%蔗糖的摄入,以实现有效预防ECC的目的。

参考文献:

[1] Drury TF, Horowitz AM, Ismail AI, et al. Diagnosing and reporting early childhood caries for research

- purposes[J]. J Public Health Dent, 1999, 27:313-315.
- [2] Hallett KB, O'Rourke PK. Pattern and severity of early childhood caries[J]. Community Dent Oral Epidemiol, 2006, 34(1):25-35.
- [3] Berkowitz RJ. Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective[J]. J Can Dent Assoc, 2003, 69(5): 304-307.
- [4] Tsai AI, Chen CY, Hsu KH. et al. Risk indicators for early childhood caries in Taiwan [J]. Community Dent Oral Epidemiol, 2006,34(6):437-445.
- [5] Pase Leme AF, Koo H, Bellaton CM, et al. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation -new insight[J]. J Dent Res, 2006,85(10):878-887.
- [6] Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ[J]. Caries Res, 2005, 39(2): 123-129.
- [7] Ribeiro CC, Tabchoury CP, Cury JA, et al. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose [J]. Br J Nutr, 2005, 94(1): 44-50.
- [8] Lingström P, Birkhed D, Ruben J. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH in situ [J]. J Dent Res, 1994, 73(3): 652-660.
- [9] Aires CP, Tabchoury CP, Cury JA, et al. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization[J]. Caries Res, 2006, 40(1): 28-32.
- [10] 马缨卫, 邵林琴, 张晶, 等. 国内对学龄前儿童龋病影响因素及危险性评估方法的研究进展[J]. 预防医学文献信息, 2003, 9(4): 438-439.
- [11] Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, et al. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries [J]. Arch Oral Biol, 2010, 55(5): 365-373.
- [12] Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Cury JA, et al. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose[J]. J Dent Res, 2006, 85(9): 834-838.
- [13] Nobre SM, Melo SL, Francisco SB, et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition [J]. Caries Res, 2002, 36(5): 347-352.
- [14] Paes Leme AF, Dalcico R, Cury JA, et al. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use[J]. J Dent Res, 2004, 83(1): 71-75.

(编辑 王晓鹰)