

• 专栏论著 •

血液链球菌细菌素的提取及其对牙周致病菌的抑制作用

华西医科大学口腔医学院 胡琳 张举之 杨美菁
 卫生部成都生物制品研究所 唐光庆 郑镇西 吴泓舟

摘要 通过超声破碎、盐析和凝胶过滤从血液链球菌细胞内提取、分离和纯化出细菌素。所提取的血液链球菌细菌素对热处理和蛋白酶敏感,加热 60℃或用蛋白酶、胰蛋白酶处理后其活性完全丧失,对 DNA 酶和 RNA 酶不敏感。在体外,血液链球菌细菌素对许多与牙周组织破坏关系密切的细菌如放线共生放线杆菌、牙龈紫质单胞菌、中间普氏菌、产黑色素普氏菌、具核梭杆菌和二氧化碳噬纤维菌均有抑制作用。经鉴定证明这些作用不是噬菌体和酶的作用,而是细菌素的作用。

关键词 血液链球菌 细菌素 牙周病

现代牙周病病因研究认为破坏性牙周病是否在一个人或某一部位发生是由三组因素决定的,即敏感的宿主,存在病原菌和缺乏有益菌群。高水平的有益菌群,即使在存在病原菌的条件下,也可阻断牙周病的发生或进程。血液链球菌是有益菌群成员之一,对牙周致病菌有拮抗作用^[1],但血液链球菌拮抗这些牙周致病菌的物质基础是什么?本实验从血液链球菌中提取、分离和纯化出细菌素,并观察其对牙周致病菌的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

实验细菌包括血液链球菌(*S. sanguis* FDC, JFr);牙周致病菌:放线共生放线杆菌(又称伴放线放线杆菌, *A. actinomycetemcomitans* FDC Y4 和 ATCC29523),牙龈紫质单胞菌(*P. gingivalis* 分离株),中间普氏菌(*P. intermedia* 分离株),产黑色素普氏菌(*P. melaninogenicus* 分离株),具核梭杆菌(*F. nucleatum* ATCC 10953),牙龈二氧化碳噬纤维菌(*C. gingivalis* ATCC 33624),生痰二氧化碳噬纤维菌(*C. sputigena* ATCC 33612),黄褐二氧化碳噬纤维菌(*C. ochracea* FDC 82-6),粘性放线菌(*A. viscosus* ATCC 19246),纳氏放线菌(*A. naeslundii* ATCC 12104)。各标准菌株均由华西医科大学口腔医学院中心实验室提供;临床分离菌种是从牙周病专科

门诊患者牙周损害处分离的,根据其菌落形态、色素产生、菌体形态、染色特征、耐氧试验和各种生化试验,按伯杰氏细菌学分类手册和 VPI 厌氧菌实验手册所述的各种细菌鉴定特性进行分析比较,将特性相符的菌株纳入本实验研究中。血液链球菌用 T₂ 培养基,其余细菌用 BHI 培养基,混合气体,37℃下培养 2~5 d。

1.2 实验方法

1.2.1 血液链球菌细菌素的提取、分离和纯化

参照 Fujimura^[2]法提取:通过离心从 16 l 血液链球菌培养液中获得 40 g(湿重)血液链球菌细胞,0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7)洗涤 3 次后,将血液链球菌细胞悬浮于 75 ml 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH7)中,4℃下超声破碎,超速离心(100000×g)1 h,收集上清液得细菌素粗提物,留取 2 ml 作生物活性测试。其余加固体硫酸铵成 60%饱和溶液,4 h 后,离心(10000×g)10 min,收集上清,加固体硫酸铵成 70%饱和溶液,过夜,离心(10000×g)10 min,收集沉淀并将其溶解在 10 ml 磷酸缓冲液(pH7)中,过柱(Sephadex G-50),脱盐纯化,除菌,无菌检验^[3]合格后分装,冻干保存。

1.2.2 血液链球菌细菌素的体外抑菌试验

采用琼脂扩散法^[3]作血液链球菌细菌素的体外抑菌试验。观察血液链球菌细菌素对牙周致病菌的抑菌范围,计算最小抑菌浓度(MIC)。实验时,细菌素用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释,稀释度为 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64。

1.2.3 血液链球菌细菌素的鉴定

a. 参照 Fujimura 和 Nakamura (1978) 法^[4], 分别检查温度、蛋白酶、胰蛋白酶和溶菌酶对血液链球菌细菌素活性的作用, 各种酶的终点浓度为 2 mg/ml; 检查 DNA 酶和 RNA 酶对血液链球菌细菌素活性的作用, 浓度为 134 μg/ml。

b. 以蛋白酶为对照, 观察血液链球菌细菌素对牛血清白蛋白的作用。

c. 为了排除存在噬菌体的可能, 切取抑菌环内之琼脂于一无菌试管内, 捣碎, 与稀释好的在 THB 培养液中生长 48 h 的放线共生放线杆菌 ATCC 29523 菌悬液混合孵育, 半小时后, 吸取 0.5 ml 该混悬液于一平皿内, 孵育 48 h 后观察结果, 如存在噬菌体, 则有抑菌环(空斑)出现。

d. 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳: 按照 Andrews 法^[5]进行, 梯度范围: 4%~30%, 样品上样量: 250 μg/50 μl, 电泳时间: >2000 Vh, pH8.4。

2 实验结果

2.1 血液链球菌细菌素的提取、分离和纯化

血液链球菌纯培养的上清液中未测得能抑制牙周致病菌生长的细菌素活性, 超声波处理完全破碎菌细胞后, 将细菌素从菌细胞内提取出来, 超速离心收集上清液, 得到了能抑制牙周致病菌生长的有生物活性的血液链球菌细菌素的粗提物。通过盐析和凝胶过滤从粗提物中分离和纯化出具有生物活性的细菌素。

2.2 血液链球菌细菌素的体外抑菌试验

以牙周致病菌放线共生放线杆菌、牙龈紫质单胞菌、中间普氏菌、产黑色素普氏菌、具核梭杆菌、牙龈二氧化碳噬纤维菌、生痰二氧化碳噬纤维菌和口内常见菌: 黄褐二氧化碳噬纤维菌、粘性放线菌、纳氏放线菌为实验菌株, 测定血液链球菌细菌素的抑菌范围和最小抑菌浓度, 结果表明血液链球菌细菌素有很宽的抑菌范围, 对实验的牙周致病菌有较强的抑菌能力(附表), 除对粘性放线菌无抑制作用外, 在体外, 对放线共生放线杆菌、牙龈紫质单胞菌、中间普氏菌、产黑色素普氏菌、具核梭杆菌、牙龈二氧化碳噬纤维菌、生痰二氧化碳噬纤维菌、黄褐二氧化碳噬纤维菌和纳氏放线菌均有明显的抑制活性。图 1 和图 2 分别显示: 血液链球菌细菌素分别对放线共生放线杆菌和牙龈紫质单胞菌的抑制作用, 各孔内细菌素浓度如图 1 所示, 其最小抑菌浓度均为 3.125 μg/ml。如附表所示, 这些菌中, 血液链球菌细菌素对放线共生放线杆菌和牙龈紫质单胞菌的作用最强, 这两株菌分别是与青少年牙周炎和成

人牙周炎损害区关系最密切的细菌。

附表 血液链球菌细菌素的抑菌谱和最小抑菌浓度

实验菌株	缩写和编号	抑菌活性	最小抑菌浓度 μg/ml
放线共生放线杆菌	Aa FDC Y ₄	+	12.5
放线共生放线杆菌	ATCC 29523	+	3.125
牙龈紫质单胞菌	Pg 49-3	+	3.125
中间普氏菌	Pi 47	+	6.25
产黑色素普氏菌	Pm 49	+	50
具核梭杆菌	Fn 10953 ATCC	+	12.5
牙龈二氧化碳噬纤维菌	Cg 33624 ATCC	+	12.5
生痰二氧化碳噬纤维菌	Cs 33612 ATCC	+	12.5
黄褐二氧化碳噬纤维菌	Co FDC 82-6	+	12.5
粘性放线菌	Av 19246 ATCC	0	
纳氏放线菌	An 12104 ATCC	+	25

注: + 有抑菌活性, 0 无抑菌活性

2.3 血液链球菌细菌素的鉴定

2.3.1 血液链球菌细菌素对热不稳定, 在 60℃ 处理 15 min 时, 即丧失抑菌活性。经蛋白酶和胰蛋白酶处理 1 h 后完全丧失抑菌活性, 表明血液链球菌细菌素具有生物活性的基因存在于蛋白质分子上。溶菌酶、DNA 酶和 RNA 酶对血液链球菌细菌素的活性无影响。

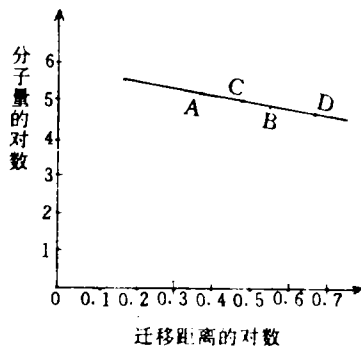


图 4 将血液链球菌细菌素与纯化的已知分子量蛋白质同时作聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 根据迁移距离计算血液链球菌细菌素的分子量。

- A 牛血清白蛋白二聚体, 分子量 134000;
- B 牛血清白蛋白, 分子量 67000;
- C 分子量 79000; D 分子量 28000。

2.3.2 血液链球菌细菌素和牛血清白蛋白孵育 1 h

后,牛血清白蛋白仍存在,而牛血清白蛋白和蛋白酶孵育 1 h 后,牛血清白蛋白完全消失,表明血液链球菌细菌素不具备蛋白水解酶活性。抑菌环的抑菌力无传染性,且血液链球菌细菌素的抑菌活力随稀释度加大而减弱至完全消失,表明所提取物不是噬菌体。

2.3.3 将血液链球菌细菌素作聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳,结果显示为主要的两条区带(图 3),分子量分别为:28000 和 79000(图 4)。

3 讨 论

血液链球菌对牙周致病菌的拮抗作用已在体外和实验动物模型研究中得到证明^[1]。通过过氧化氢酶阻断实验^[6]和分离不产生过氧化氢的血液链球菌突变株等实验方法,表明产生过氧化氢是血液链球菌抑制放线共生放线杆菌、牙龈紫质单胞菌、中间普氏菌和具核梭杆菌生长的因素之一。但过氧化氢酶不能阻断血液链球菌对产黑色素普氏菌、二氧化碳噬纤维菌和一些放线菌的拮抗作用。因此,以释放过氧化氢来解释血液链球菌对这部分牙周致病菌的拮抗机理是不全面的。

Fujimura 和 Nakamura(1979)^[3]报告在厌氧条件下培养的血液链球菌产生细菌素不释放于体外而积聚于细菌细胞内,经分离纯化后,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示为一均匀物质,分子量约为 280000,对热不稳定,能被蛋白酶破坏而失去抑菌活性,对产黑色素普氏菌及其他几株普氏菌、衣氏放线菌和纳氏放线菌等几株口腔细菌的生长有抑制作用。

作者参照 Fujimura 和 Nakamura^[3]的方法,从血液链球菌细胞内分离和纯化出细菌素,经鉴定表明所提取的血液链球菌细菌素为不均一物质,除蛋白质外,还含有少量的糖和脂,聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳图谱显示为 2 条区带,分子量分别为 28000 和 79000,以分子量 28000 的为主,表明所提取物含分子量不同的两个蛋白质,至于是哪个分子量的蛋白质发挥抑菌作用,有待进一步纯化和鉴定。本实验虽参照 Fujimura 和 Nakamura 血链素提取方法提取的血液链球菌细菌素,但其分子量与血链素不同,可

能与使用不同的菌株和实验条件有关。但是,所提取的血液链球菌细菌素对热和蛋白水解酶不稳定,加热 60℃和用蛋白酶或胰蛋白酶处理 1 h 后,抑菌活性完全丧失,而对 DNA 和 RNA 酶不敏感,表明其活性部位存在于蛋白质分子上,这些理化性状与 Fujimura 和 Nakamura 从血液链球菌中提取的血链素相似。在血液链球菌纯培养的上清液中未测得细菌素活性,可能与细菌素在培养的上清液中的浓度不够大有关。

体外抑菌试验表明血液链球菌细菌素对实验的牙周致病菌(放线共生放线杆菌、牙龈紫质单胞菌、中间普氏菌、产黑色素普氏菌、具核梭杆菌、二氧化碳噬纤维菌和纳氏放线菌)均有抑制作用,尤其是对放线共生放线杆菌和牙龈紫质单胞菌的抑制作用较强。现认为这两株菌分别是青少年牙周炎和成人牙周炎的致病菌。本实验结果在体外证明了血液链球菌产生的细菌素是抑制牙周致病菌的因素之一。关于血液链球菌细菌素能否在体内发挥作用以及能否将血液链球菌细菌素作为一种抗牙周病因子应用于牙周病的防治有待进一步研究。

(本文图 1~3 见中心插页 16)

4 参考文献

- 1 Hillman JD, Socransky SS, Shivers M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch Oral Biol*, 1985b;791
- 2 Fujimura S, Nakamura T. Sanguicin, a bacteriocin of oral *Streptococcus sanguis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979;16(3):262
- 3 王道若主编,微生物学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1986:254,249
- 4 Fujimura S, Nakamura T. Purification and properties of a bacteriocinlike substance (acnecin) of oral propionibacterium *acnes*. *Antimicrob Agent Chemother*, 1978;14(6):893
- 5 Andrews AT. *Electrophoresis*. 2nd ed. Oxford: Science Publication, 93

6 Hillman JD, Shivers M. Interaction between wild-type, mutant and revertant forms of the bacterium *Streptococcus sanguis* and the bacterium *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans in vitro and in the gnotobiotic rat. Arch Oral Biol, 1988;33(6): 395
(1994-09-17 收稿)

Bacteriocin Extracted from *Streptococcus Sanguis* and Its Effect on Suspected Periodontal Pathogens

Hu Lin, Zhang Juzhi, Yang Meiru, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

In this study, authors observed that *S. sanguis* produces bacteriocin accumulating intracellularly. It was extracted by ultrasonic treatment and purified by fractionation with ammonium sulfate and gel filtration. The bacteriocin of *S. sanguis* is resistant to deoxyribonuclease and ribonuclease but is sensitive to pronase and trypsin. The biological activity is lost by heating at 60°C or by pronase and trypsin. The bacteriocin of *S. sanguis* which is readily distinguishable from bacteriophage and proteolytic enzyme can inhibit the growth of periodontal pathogens such as *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedius*, *P. melaninogenicus*, *F. nucleatum*, *C. gingivalis* and *C. sputigena* in vitro. These results demonstrate that this bacteriocin of *S. sanguis* is one of the factors that making *S. sanguis* antagonize the periodontal pathogens.

胃复安引起双侧下颌关节脱位一例

山东省莱西市人民医院口腔科 张贤奎

患者刘某,男,35岁。因下颌前伸,开闭口困难2.5h来诊。患者因患胃炎,服用胃复安、庆大霉素片治疗。胃复安于饭前30min口服,每次10mg,每日3次。第6次服药后约2h左右,感下颌不自主运动,舌活动不灵,说话不清,持续约5min后,下颌不自主过度前伸并固定,用手推下颌可使下颌复位,松手后下颌又不自主地前伸。检查见患者神志清楚,语言障碍,下颌前伸,不能闭口,两耳屏前凹陷,髁状突位于颞弓下,并伴有头后仰,舌活动障碍。其他检查未发现异常。诊断为胃复安引起双侧下颌关节脱位。

立即行双侧下颌关节脱位手法复位,复位顺利。约10s后下颌又不自主前伸,再次手法复位并用绷带固定下颌。给予安定10mg口服,停药胃复安。次日上午复

诊,患者语言流畅,下颌活动正常。追问病史,患者1年前服用胃复安曾有类似症状,但较轻。

讨论 胃复安为多巴胺受体拮抗剂,系止吐类药物。主要通过抑制催吐化学敏感区(呕吐中枢)起作用。常应用于各种原因引起的呕吐。其不良反应为少数人出现嗜睡、激动、便秘、腹泻、口干等。大剂量使用可出现锥体外系反应,如肌震颤、下肢肌肉抽搐、头向后仰、斜颈、阵发性双眼上视、发音困难、共济失调等。引起双侧下颌关节脱位者罕见。其发生原因可解释为锥体外系反应的一个奇特表现,可能系胃复安阻滞多巴胺受体,使胆碱能受体相对亢进,两侧翼外肌过度收缩引起下颌关节脱位。

(1994-08-17 收稿)

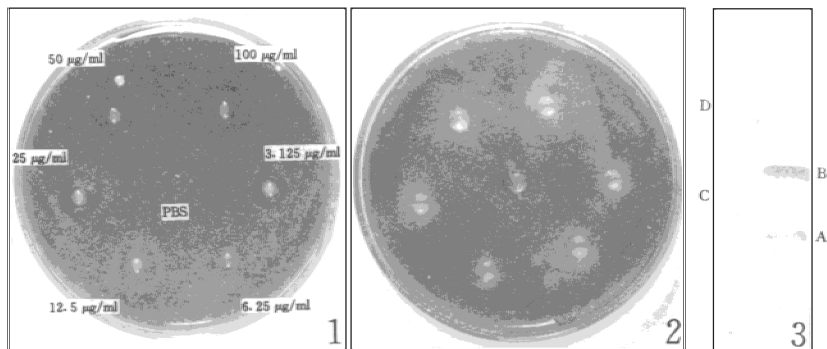
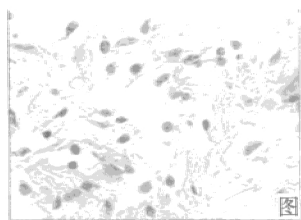


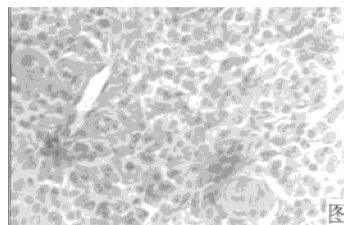
图1 血液链球菌细菌素对 Aa ATCC 29523 的抑菌作用, 最小抑菌浓度为 3.125µg/ml
 图2 血液链球菌细菌素对 Pg 49-3 的抑菌作用, 最小抑菌浓度为 3.125µg/ml
 图3 血液链球菌细菌素的电泳图谱, 迁移方向是从下到上, A 带为牛血清白蛋白二聚体, B 带为牛血清白蛋白, C 和 D 带为血液链球菌细菌素

颈部纤维组织细胞瘤一例报告 (正文见第 308 页)



附图 颈部纤维组织细胞瘤 HE ×400

窦组织细胞增生性巨大淋巴结病一例报告 (正文见第 326 页)



附图 残留淋巴滤泡内血管增生, 内皮细胞肿胀

口腔鳞癌中 HPV 感染状况与抑癌基因 P53 突变关系的研究 (正文见第 285 页)

图1 8%聚丙烯酰胺凝胶, 溴乙锭染色, M 为分子量标准(下同), 1, 2 为 HPV DNA 阳性的口腔鳞癌组织

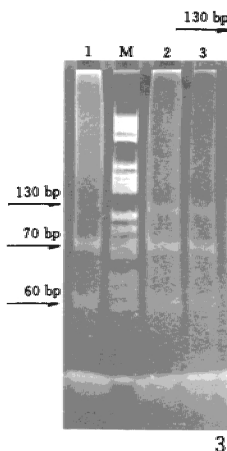
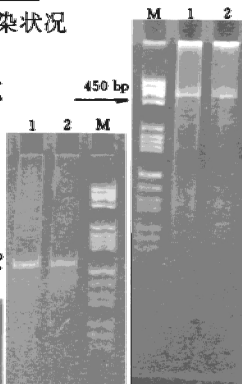


图2 1, 2 为 P53 基因第七外显子扩增产物

图3 1~3 分别为未突变(野生型)的 P53 基因、突变的 P53 基因及突变型 P53 基因的阳性对照(肝癌细胞)的扩增、酶切片段