

· 基础研究 ·

口腔乳杆菌对胶原的粘附

郭丽娟 刘天佳 刘豫蓉

摘要 研究了包被在羟基磷灰石上的人 I 型胶原与³H-胸腺嘧啶脱氧核苷标记的乳杆菌的粘附能力及其影响因素。结果表明: 乳杆菌对胶原有较高的亲和力, 该粘附具有特异性, 粘附量随人 I 型胶原浓度、粘附时间的增加而递增, 并在 2 h 达到饱和。pH 值对粘附有显著影响, pH 值越低, 粘附量越大, 离子浓度对粘附也有明显影响。该实验结果从一个侧面揭示了乳杆菌大量定植于龋牙本质、牙骨质的机理。

关键词 乳杆菌 胶原 粘附

致龋菌引起牙面的龋损, 其粘附、定居在牙面上是先决条件, 由于牙本质、牙骨质富含胶原, 故有关致龋菌对胶原的粘附在探讨牙本质龋以及根面龋的病因学方面有一定意义^{1,2}。为了探讨乳杆菌大量存在于牙本质、牙骨质龋中的机理, 乳杆菌对胶原是否有亲和力是一个值得研究的问题, 本实验旨在研究乳杆菌对胶原的粘附能力及其影响因素。

1 材料和方法

1.1 实验菌株及培养条件

干酪乳杆菌(Lc)、发酵乳杆菌(Lf)、嗜酸乳杆菌(La)由四川省生物制品研究所提供, 干酪乳杆菌 426, 637; 发酵乳杆菌 428, 429, 435, 531 为临床新鲜分离株。细菌接种于 TS 液体培养基中, 在厌氧培养箱中(80% N₂, 20% CO₂) 37 培养 18 h。培养基中加入 10 μCi/ml ³H-胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)以标记细菌³, 离心收集细菌, 用 KCl 缓冲液(1 mmol/L KH₂PO₄ 及 K₂HPO₄, 含有 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L MgCl₂, pH 6.0)洗涤细菌 3 次, 然后悬浮于含 5 mg/ml 牛血清白蛋白的 KCl 缓冲液中, 分光光度计调节细菌悬液的浓度至 OD_{540nm} 为 0.5。

1.2 胶原溶液的制备

将人 I 型胶原(由 Sigma 公司提供)溶于 KCl 缓冲液中, 浓度为 250 μg/ml, 用磁力搅拌器在 4 冰箱中搅拌 24 h, 直至胶原完全被溶解。

1.3 细菌对实验性膜的粘附

5 mg 羟基磷灰石(HA)加 100 μl 人 I 型胶原溶液, 在旋转混匀仪上室温旋转(6 r/min) 1 h, 以形成胶原包被的 HA(C-HA)³, 洗涤后再用牛血清白蛋白(5 mg/ml)处理 1 h, 以阻塞胶原未覆盖的 HA 表面⁴。洗涤, 加 100 μl ³H-TdR 标记的细菌悬液孵育 1 h, 彻底洗涤后转 HA 到闪烁液中, 计数, 以确定附着到 HA 表面实验性膜上的细菌

数, 所有实验均重复 2 次。未用抑制剂为阳性对照组。

1.4 不同制剂乳杆菌对 C-HA 粘附的影响实验

³H-TdR 标记的菌悬液与抑制剂同时加入, 抑制剂(人 I 型胶原、明胶、卵清蛋白、乳糖、葡萄糖、果糖)的浓度分别为 1000 μg/ml, 500 μg/ml, 250 μg/ml, 具体实验步骤同前。

1.5 影响乳杆菌对胶原粘附的因素

分别测试了胶原浓度、作用时间、不同 pH 值及离子浓度这些因素对乳杆菌粘附胶原的影响, 具体实验步骤同前。

2 结果

2.1 不同菌株对胶原的粘附

所选用的 9 株细菌对人 I 型胶原均具有不同程度的粘附能力(图 1), 总的说来临床新鲜分离株比参考株对胶原的粘附力强, 因 429 的粘附量最大, 故以下实验均采用该菌株。

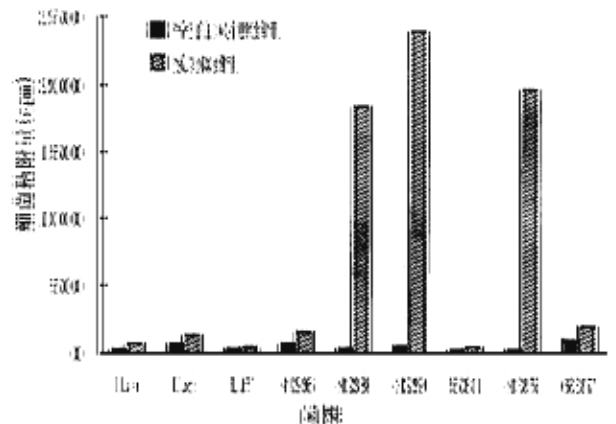


图 1 不同菌株对 C-HA 的粘附

2.2 不同制剂对乳杆菌粘附的影响实验

分别用3种蛋白质,3种糖作为竞争抑制剂,溶液中的人I型胶原明显地竞争性抑制了乳杆菌对C-HA的粘附,且浓度越大,抑制程度越高,而明胶、卵清蛋白、糖类均对其粘附量无明显抑制作用,而有微弱的促进作用(附表)。

附表 不同抑制剂对粘附的影响实验

抑制剂	浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	粘附相对百分率(%) [*]
阳性对照组	0	100
人I型胶原	1000	42
	500	61
	250	87
明胶	1000	140
	500	131
	250	120
卵清蛋白	1000	113
	500	124
	250	128
乳糖	1000	118
	500	107
	250	91
葡萄糖	1000	118
	500	118
	250	125
果糖	1000	131
	500	132
	250	116

未加抑制剂为阳性对照组,粘附为100%
粘附相对百分率=实验组 cpm/阳性对照组 cpm × 100% (以下同此)

2.3 影响乳杆菌对胶原粘附的因素

2.3.1 胶原浓度对乳杆菌粘附的影响 用不同浓度的人I型胶原溶液形成C-HA作粘附实验,乳杆菌的粘附量随胶原浓度的增加而相应增加,并在大约200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时达到饱和(图2)。

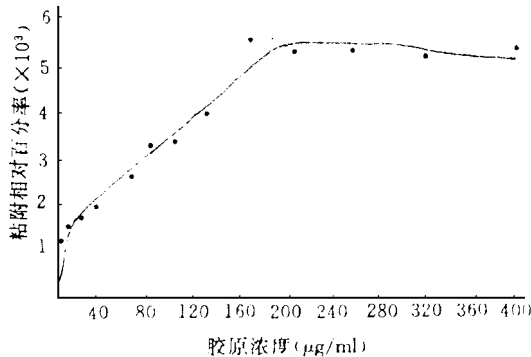


图2 胶原浓度对乳杆菌粘附的影响

空白对照组的粘附为100%

2.3.2 时间对乳杆菌粘附的影响 乳杆菌对胶原

的粘附量在开始的时间内迅速增加,20 min后递增较缓,约在2 h达到饱和(图3)。

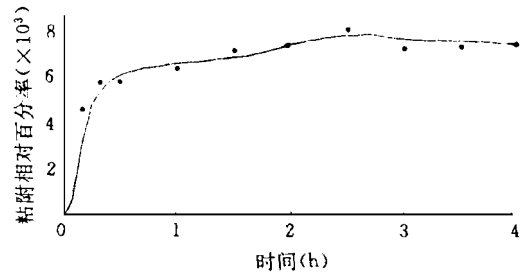


图3 作用时间对乳杆菌粘附的影响

2.3.3 pH值对乳杆菌粘附的影响 不同的pH值对乳杆菌粘附量有显著的影响,pH值越低,该粘附量越高,且pH值6.5以下,细菌的粘附量随pH值的增高而陡然下降,pH值6.5以上,该曲线趋于缓和(图4)。

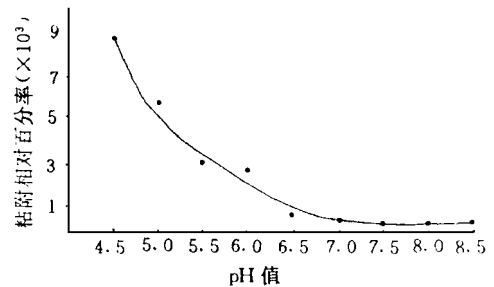


图4 pH值对乳杆菌粘附的影响

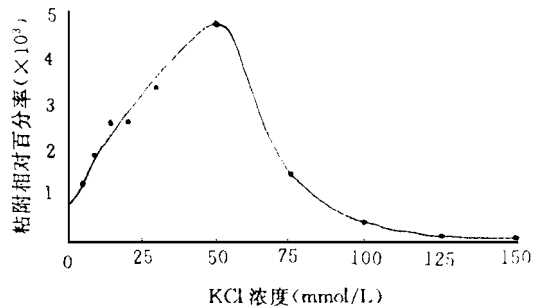


图5 不同KCl浓度对乳杆菌粘附的影响

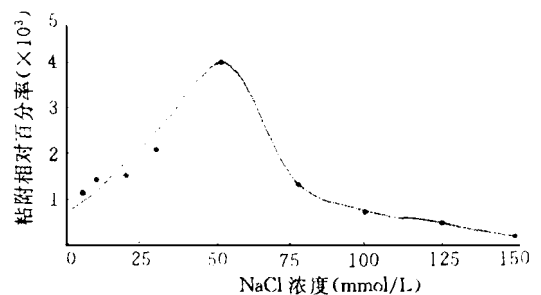


图6 不同NaCl浓度对乳杆菌粘附的影响

2.3.4 离子浓度对乳杆菌粘附的影响 乳杆菌对胶原的粘附量分别随KCl,NaCl,CaCl₂浓度的增

加而递增,前2种盐溶液在50 mmol/L时达到高峰,后者在20 mmol/L时达到高峰,之后,都随着浓度的增加而下降(图5~7)。

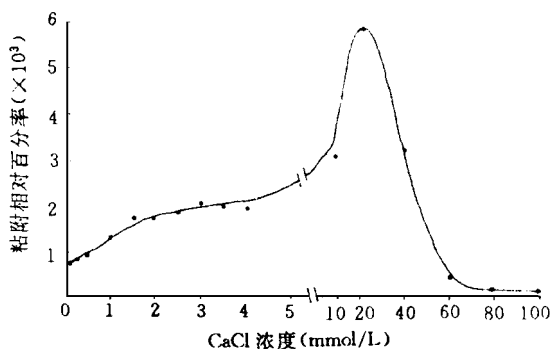


图7 不同CaCl₂浓度对乳杆菌粘附的影响

3 讨论

3.1 乳杆菌对胶原有粘附能力

有关乳杆菌粘附的研究甚少,在国内尚未见报道。乳杆菌在牙面菌斑中所占比例极小,故对龋病的发生不居主导地位。但出现龋坏后,病变区的乳杆菌却大量增加,随着龋病严重程度加重,乳杆菌数量亦随之增加,当龋洞经过修复处理后该菌的数量下降⁵,该现象除了局部低pH环境有利于其滞留、生长外,可能还与它主动粘附到胶原上有关,牙本质、牙骨质一经龋坏脱矿后有大量胶原暴露,这可能促进了乳杆菌在病变局部的粘附。本实验通过不同菌株对C-HA粘附的同位素检测表明:乳杆菌对胶原有粘附能力,且该粘附能力在菌株之间差异极大,临床新鲜分离株明显比参考株的粘附活性强,这可能与参考株细菌传代后粘附力较小有关。

3.2 乳杆菌对胶原粘附的特异性

采用竞争抑制试验,其中溶液中的人I型胶原明显地竞争抑制了乳杆菌对C-HA的粘附,且抑制程度与浓度呈正比,而其它蛋白和糖均无抑制作用,由此证实,乳杆菌对胶原粘附具有特异性。

3.3 影响乳杆菌对胶原粘附的因素

乳杆菌对胶原的粘附随时间的增加而相应递增,在开初10 min内上升速度很快,这说明乳杆菌能迅速识别胶原上的受体结合部位,并结合上去,大约在2 h左右粘附量达到饱和。乳杆菌对胶原的粘附随胶原浓度的增加而增加,在200 μg/ml时达到饱和。这很可能是在此浓度时包被HA的胶原

量达到了饱和。pH值对乳杆菌粘附胶原的影响很大,pH值越低,粘附量越大,在pH6.5以下的范围内,随pH值的增高其粘附量陡然下降,以往资料所报道的pH值对细菌粘附胶原的影响不大,可能是所取的pH值的范围较小有关(pH6~8)⁶,而本实验所取的pH值的范围是4.5~8.5。低pH环境和胶原的暴露都有利于乳杆菌的大量粘附。离子浓度对乳杆菌粘附胶原的影响表明:磷酸钾盐缓冲液中粘附量较低,当加入NaCl, KCl, CaCl₂任何一种以增加离子浓度时,粘附量便增加,并随离子浓度的增加而相应递增,达到高峰后又随离子浓度的增加而迅速下降。Na⁺, K⁺可能是改变了细菌细胞壁上某种成分的分子构型,从而增加了细菌与胶原的结合位点,也可以说是活化了细胞壁上的某种成分, Ca²⁺除了与Na⁺, K⁺有类似的促进粘附作用外,还有钙桥的作用,钙将菌体表面的负电荷集团与C-HA上的负电荷集团键合而致,此外,以上3种离子浓度所促进的粘附均有一个阈值,超过这一阈值粘附量反而下降。

口腔乳杆菌对人I型胶原有较大亲和力,这很可能是它们大量定植于牙本质、牙骨质龋的原因之一⁶。本实验结果进一步证实了这一观点。变形链球菌和粘性放线菌也被证实对胶原有粘附能力^{7,8},如何阻止这些致龋菌对胶原的粘附,对寻找防龋、控龋措施有重要意义。

4 参考文献

- 1 Switalski LM, Butcher WG, Caufield PC, et al. Collagen mediates adhesion of streptococcus mutans to human dentin. *Infect Immun*, 1993, 61: 4119
- 2 Switalski LM, Butcher WG. An in vitro model for adhesion of bacteria to human tooth root surfaces. *Arch Oral Biol*, 1994, 39: 155
- 3 Liu T, Gibbons RJ, Hay DI. Streptococcus cricetus and streptococcus rattus bind to different segments of collagen molecules. *Oral Microbiol Immunol*, 1990, 5: 143
- 4 Gibbons RJ, Etherden I. Albumin as a blocking agent in studies of streptococcal adsorption to experimental salivary pellicles. *Infect Immun*, 1985, 50: 592
- 5 Beighton D, Lynch E. Comparison of selected microflora of plaque and underlying caries dentin associated with primary root caries lesions. *Caries Res*, 1995, 29: 154
- 6 McGrady JA, Butcher WG, Beighton D, et al. Specific and charge interactins mediate collagen recognition by oral lactobacilli. *J Dent Res*, 1995, 74: 649

- 7 Liu T, Gibbons RJ. Binding of streptococci of the "mutans" group to type I collagen associated with apatite surfaces. *Oral Microbiol Immunol*, 1990, 5: 131
- 8 Liu T, Gibbons RJ, Hay DI, et al. Binding of actinomyces viscosus to collagen: association with the type I fibrillar adhesin. *Oral Microbiol Immunol*, 1991, 6: 1 (1997- 01- 17 收稿)

Binding of Oral Lactobacilli to Collagen

Guo L ijuan, L iu T ianjia, L iu Yurong

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The present study surveyed the ability, the characters and the influential factors on lactobacilli binding to the collagen. The experiment employed reference strains and fresh isolated strains. Binding of ³H-labeled bacteria to human type I collagen absorbed on hydroxyapatite surface (C-HA) was tested. The results suggested that the lactobacilli had high affinity for collagen. Competitive inhibitory assay indicated the attachment was highly specific. Binding to C-HA occurred in a collagen dose-dependent manner. pH value of reaction mixtures significantly affected the adherence. Below pH 6.5, increasing pH value caused a reduction of binding. Above pH 6.5, the binding was less affected. The ionic strength apparently influenced the binding level.

The results of this study revealed one of the mechanisms that oral lactobacilli target dentin and root surfaces caries. This may also be a cariogenic virulent factor of lactobacilli.

Key words: lactobacilli collagen adherence

中华口腔医学会第五次全国牙体牙髓病学术会议纪要

中华口腔医学会第五次全国牙体牙髓病学术会议于 1997 年 10 月 16~ 18 日在四川成都召开, 此次会议由华西医科大学口腔医学院承办。大会共收到全国各地论文 395 篇, 其中牙体硬组织非龋性疾病 75 篇, 龋病 92 篇, 牙髓病 73 篇, 根尖周病 99 篇, 其它 56 篇。到会代表 215 名, 会上交流论文 95 篇。

会议主要交流内容: 牙体硬组织非龋性疾病: 对牙折裂、牙本质过敏进行了重点交流, 介绍了一些新型的脱敏材料, 对激光作用下, 牙本质内的钙/磷变化进行了研究。 龋病: 对免疫预防措施的探讨作了较多的报道, 如基因重组乳链球菌防龋疫苗的研制, 前霍乱原类毒素与变链球菌表面蛋白 P1 结合的粘膜免疫, 抗茸毛链球菌表面蛋白抗原单克隆抗体的动物免疫实验。对致龋菌, 菌斑中粘附现象及机理, 粘性放线菌菌毛生物活性等的研究均有进一步发现。 牙髓病临床研究方面, 对保存牙髓活力的盖髓剂作了多方面的探讨, 如氟化钙、医用胶加氢氧化钙、SOD, 改良 FR 盖髓剂等的研究; 基础方面, 对炎症牙髓组织中 5-羟色胺、TNF- α 、IL-8 等均作了较为深入的研究, 对牙髓组织的修复机理及能力也作了一些研究, 如牙本质非胶原蛋白对反应性修复性牙本质的形成, 甲状旁腺激素对人牙髓细胞 ALPase 活性影响的研究。基础研究还出现了新的方向。 根尖周病: 注重于根管充填材料的研究, 如复方羟磷灰石加肽尖、TH 医用胶、BMP/HA 复合材料等, 根尖周病的恢复主要依赖根周牙周结缔组织和牙槽骨组织的生长, 在这方面也有可喜的研究报告, 如 IL-1 α 对调节人牙周膜成纤维细胞 ALPase 活性的作用, IL-6 对人成骨细胞 ALPase 活性的影响。

此外, 还有其它新的内容, 总体说来, 此次大会充分反映了我国牙体牙髓病在临床及基础研究方面均较过去有了新的提高, 部分基础方面的研究已接近当前国际水平。大会还产生了新一届中华口腔医学会牙体牙髓病学专业委员会。

此次大会得到华西医科大学口腔医学院及国内外 20 余家厂商的大力支持, 使大会取得圆满成功, 谨向他们致以深深的谢意!

感谢全国广大口腔医务工作者的热情支持!

(刘天佳)