

[文章编号] 1000-1182(2006)05-0455-03

不同浓度的葡萄糖对变形链球菌初始粘附能力的影响

姜颖¹, 杨锦波², 刘天佳², 谭红², 黄定明²

(1.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西口腔医院 牙体牙髓病科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究不同浓度的葡萄糖对变形链球菌初始粘附能力的影响, 同时观察高龋组、无龋组变形链球菌初始粘附能力的差别。方法 选取高龋组、无龋组变形链球菌(血清c型)临床分离株各10株及1株参考株UA159, 用唾液包被的羟基磷灰石(SHA)模拟口腔中牙面情况。各菌株分别在含³H的0.2%、1.0%、5.0%葡萄糖的液体培养基中培养, 配成菌悬液。菌液与SHA作用90 min, 清洗、吸干, 液体闪烁计数测量各样本中粘附于SHA的细菌的量。各变形链球菌菌株在不同浓度葡萄糖条件下对SHA的粘附能力以粘附量CPM值表示。结果 变形链球菌高龋组分离株初始粘附能力明显高于无龋组分离株(P<0.05); 同时变形链球菌在不同浓度的葡萄糖营养条件下其初始粘附能力也有统计学上的差别(P<0.05), 5.0%葡萄糖组粘附力最强, 0.2%葡萄糖组粘附力最低, 1.0%葡萄糖组粘附力介于两者之间。结论 变形链球菌的初始粘附能力可能与龋病的发生有关; 葡萄糖可能与变形链球菌的初始粘附相关, 在一定范围内, 葡萄糖可能会促进变形链球菌的初始粘附。

[关键词] 龋病; 变形链球菌; 初始粘附

[中图分类号] R788.1 **[文献标识码]** A

Study on the Effect of Concentrations of Glucose on Initial Adherence of *Streptococcus mutans* JIANG Ying¹, YANG Jin-bo², LIU Tian-jia², TAN Hong², HUANG Ding-ming². (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To study the effect of concentrations of glucose on the initial adherence of *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) to saliva-coated hydroxyapatite (SHA), and to compare the initial adherence of *S.mutans* from caries-active group with that of *S.mutans* from caries-free group. Methods Each 10 clinical isolates of *S.mutans* from caries-active and caries-free subjects were used in this study. And *S.mutans* UA159 was also included in this experiment. SHA was used to simulate tooth surface in oral cavity. *S.mutans* clinical isolates and strain UA159 were cultured in TPY liquid medium containing ³H-TdR in the same radioactive concentration and glucose in 0.2%, 1.0%, 5.0% concentration. Then grown cells were harvested to produce a suspension. SHA and radiolabelled bacterial suspension ($A_{550\text{nm}}=0.52$) were mixed for 90 minutes, samples were assayed by using liquid scintillation counter, and binding abilities of strains were evaluated by the count per minute (CPM). Results The initial adherence ability of *S.mutans* from caries-active group was higher than that of *S.mutans* from caries-free group ($P<0.05$). And the initial adherence ability of *S.mutans* cultured in different concentration of glucose was also significantly different ($P<0.05$), 5.0% glucose group had the highest adherence ability, and 0.2% glucose group had the lowest adherenceability. Conclusion Difference of the initial adherence of *S.mutans* might relate to difference of carious experiences; Glucose may play an important role in *S.mutans* initial adherence, to some extent, *S.mutans* cultured in the higher concentration of glucose has the higher initial adherence property.

[Key words] caries; *Streptococcus mutans*; initial adherence

龋病是一种最为常见的、严重危害人类口腔健

康的口腔感染性疾病之一。变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*)是人类龋病的主要致病菌, 其致龋毒力因子主要表现在对牙面的粘附和利用碳水化合物产生多糖以及产酸、耐酸^[1]。其中变形链球菌对牙面的初始粘附即非蔗糖-依赖性粘附是其定植的基础。葡萄糖是变形链球菌生长所需的最主要碳

[收稿日期] 2005-11-28; [修回日期] 2006-02-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30200317);“十五”国家科技攻关计划课题资助项目(2004BA720A24)

[作者简介] 姜颖(1977-), 女, 山东人, 博士研究生

[通讯作者] 杨锦波, Tel: 028-85501439

源和能源之一，本实验旨在研究不同浓度的葡萄糖对变形链球菌初始粘附能力的影响。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

课题组^[2]前期获得的变形链球菌(血清c型)临床分离株，选取高龋组、无龋组菌株各10株及1株变形链球菌参考株UA159，共21株(四川大学口腔生物医学工程教育部重点实验室提供)。

1.2 试剂

同位素³H-胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-thymidine, ³H-TdR) 中国科学院上海原子能研究所提供)，羟基磷灰石晶体(BHD Chemical公司，英国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验唾液的准备 由1个健康成人，在进食2 h后，清水漱口，收集其无刺激性的全唾液，10 000 r/min，4 离心10 min，取上清液-20 保存备用。

1.3.2 唾液包被的羟基磷灰石(saliva-coated hydroxyapatite, SHA)制备 在0.5 mL Eppendorf管中，每管加入电子天平准确称量的羟基磷灰石晶体4.0 mg，以200 μL KCl缓冲液4 浸泡过夜备用。次日吸去KCl缓冲液，实验组加入唾液100 μL，阴性对照组加KCl缓冲液100 μL，室温下5 r/min旋转60 min。KCl缓冲液洗涤2次。每管加入含5 g/L BSA的KCl缓冲液100 μL，室温下5 r/min旋转30 min，KCl缓冲液洗涤2次。

1.3.3 实验菌液的制备 在TPY固体培养基上复苏甘油保种的变形链球菌实验菌株，培养时间为48 h，镜检及生化鉴定为变形链球菌。挑取单个菌落分别接种于2 mL，浓度为0.2%、1.0%、5.0%葡萄糖的TPY液体培养基中(其中含³H 3.7 × 10⁸ Bq/L)，在37 孵箱中微需氧培养至指数后期，2 500 r/min，4 离心15 min，收集细菌，KCl缓冲液洗菌3次，悬浮于含5 g/L BSA的KCl缓冲液中，调整菌液浓度为A_{550 nm}=0.52。

1.3.4 粘附实验^[3] 在实验组和阴性对照组的每管SHA中加入0.2%、1.0%、5.0%葡萄糖TPY液体培养基中制备的实验菌液100 μL，室温下5 r/min旋转90 min，吸干，KCl缓冲液洗涤3次以上，吸干。加入裂解液，再加入闪烁液，液体闪烁测量仪计数测量同位素放射量CPM(count per minute)值。每个实验组设3个平行管取平均值。变形链球菌(血清c型)各临床分离株及参考株UA159在不同浓度葡萄糖条件下对SHA的粘附量以实验组CPM与阴性对照组CPM差值表示。数据采用SPSS 10.0统计软件进行方

差分析和t检验。

2 结果

不同浓度葡萄糖组变形链球菌初始粘附能力的比较见表1。由表1可见，变形链球菌在不同浓度葡萄糖营养条件下其初始粘附能力有统计学上的差别(P<0.05)，5.0%葡萄糖组粘附力最强，0.2%葡萄糖组粘附力最低，1.0%葡萄糖组粘附力介于两者之间。高龋组与无龋组变形链球菌初始粘附能力的比较见表2。由表2可见，变形链球菌各临床分离株的初始粘附能力也是不同的，高龋组菌株粘附力明显高于无龋组(P<0.05)。

表1 不同浓度葡萄糖组变形链球菌初始粘附能力的比较(n=21)

Tab 1 Comparison of the initial adherence of Streptococcus mutans among different glucose groups(n=21)

对比组	初始粘附能力 两均数之差 CPM)	P值
0.2%葡萄糖组与1.0%葡萄糖组	-2 062.581 0	0.013
1.0%葡萄糖组与5.0%葡萄糖组	-3 386.681 0	0.011
0.2%葡萄糖组与5.0%葡萄糖组	-5 449.261 9	0.000

表2 高龋组与无龋组变形链球菌初始粘附能力的比较

Tab 2 Comparison of the initial adherence of Streptococcus mutans between caries-active and caries-free group

分组	初始粘附能力 CPM)		P值
	高龋组(n=10)	无龋组(n=10)	
0.2%葡萄糖	1 934.893 0 ± 251.219 8	838.570 0 ± 677.813 7	0.029
1.0%葡萄糖	4 766.250 0 ± 472.031 3	2 116.580 0 ± 392.500 8	0.045
5.0%葡萄糖	9 035.630 0 ± 822.919 5	4 747.050 0 ± 858.259 6	0.023

3 讨论

变形链球菌的粘附能力是其定植的基础，其粘附经历了2个阶段最后形成牙菌斑生物膜。首先是变形链球菌表面蛋白(如表面蛋白P1)与获得性膜中宿主因子的相互作用，包括静电作用、疏水作用、氢键作用和粘附素-受体作用等，这就是初始粘附，即非蔗糖依赖性的粘附。第二阶段变形链球菌的葡萄糖基转移酶利用蔗糖合成水不溶性葡聚糖来介导该菌的蔗糖-依赖性粘附，集聚^[4]。可见初始粘附是变形链球菌致病的第一步，本实验研究不同浓度的葡萄糖对变形链球菌初始粘附也就是非蔗糖依赖性的粘附能力的影响。

菌株选用的是课题组前期获得的变形链球菌

(血清c型)临床分离株,选取高龋组、无龋组菌株各10株以及1株参考株UA159,共21株实验菌株。本实验采用放射性同位素³H-TdR标记细菌,定量检测各菌株对全唾液包被的羟基磷灰石的粘附能力。

本实验结果显示,患龋高的人群分离得到的菌株比无龋的人群所分离得到的菌株初始粘附能力要强,其差别具有统计学意义。说明变形链球菌各菌株间初始粘附能力的差别可能与其致病性相关,粘附越强的变形链球菌其致病性就越强,越易发生龋病。同时,在不同浓度葡萄糖的营养条件下,变形链球菌的初始粘附能力也是不同的。在一定范围内,环境中葡萄糖浓度越高,变形链球菌的初始粘附越强。

初始粘附即非蔗糖依赖性粘附是变形链球菌最主要毒力因子之一,其中粘附素—受体作用可能是最重要的。变形链球菌表面有许多分子起着粘附素的作用,主要的粘附素是表面蛋白P1、脂磷壁酸和鼠李糖-葡萄糖多聚体等,研究较多的是表面蛋白P1。表面蛋白P1可能具有多个粘接位点,特异性抗体与这些位点结合后将阻断变形链球菌对牙面的粘附,说明表面蛋白P1与变形链球菌粘附密切相关。表面蛋白P1,也称为抗原 / 、B、Pac等,可与液相中的唾液糖蛋白结合,导致细菌集聚、凝集,也可与粘附到牙面上的唾液糖蛋白结合而介导变形链球菌粘附到牙面。表面蛋白P1是由转肽酶SrtA将其锚定于胞壁的,在内源性表面蛋白释放酶SPRE作用下又可被释放到细胞外^[5-6]。唾液中与变形链球菌表面蛋白P1作用的主要成分是唾液凝集素,这是一种大相对分子质量、酸性粘液素样糖蛋白,主要存在于腮腺、颌下腺唾液中。其他的一些唾液分子也促进变形链球菌对牙面的粘附,包括颌下腺粘液素、富脯蛋白等^[7]。

然而,变形链球菌的初始粘附机制尚未完全明确,唾液获得性膜中的蛋白与变形链球菌表面受体间是被动的相互作用,还是变形链球菌积极参与了粘附过程?以往认为变形链球菌葡糖基转移酶催化产生的葡聚糖主要参与蔗糖依赖性粘附,而对于该菌的初始粘附意义不大。然而近期有研究表明牙面获得性膜中存在葡糖基转移酶,催化产生的葡聚糖可保留在获得性膜中,变形链球菌可与牙面获得性膜中葡聚糖结合,说明葡聚糖也可能促进此菌初始

粘附,葡糖基转移酶和葡聚糖可能通过提供葡聚糖结合蛋白Gbps的结合位点而直接影响变形链球菌初始粘附^[8]。

由上述可见变形链球菌初始粘附是多因素参与的非常复杂的过程,其机制有待于进一步明确。本实验为系列课题之一,证实了一定范围内高浓度的葡萄糖可促进变形链球菌的初始粘附,这可能是由于充裕的葡萄糖为变形链球菌合成蛋白质的过程提供了更多的前体和能源,从而有利于变形链球菌表面粘附素的表达,也可能是充裕的葡萄糖影响转肽酶SrtA和内源性表面蛋白释放酶SPRE的活性,其确切的分子机制是今后研究的方向。更好的理解变形链球菌粘附机制,将有利于发现控制牙菌斑生物膜的有效措施,预防龋病的发生。

[参考文献]

- [1] Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*[J]. *Microbiol Rev*, 1980, 44(2):331-384.
- [2] 黄晓晶, 刘天佳, 陈舟, 等. 高龋者及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究. 对唾液包被羟基磷灰石的粘附实验[J]. *华西口腔医学杂志*, 2000, 18(6):416-418. (HUANG Xiao-jing, LIU Tian-jia, CHEN Zhou, et al. Evaluation of cariogenic potential of *Streptococcus mutans* isolated from caries-free and active persons. Part 2: Adherence properties to saliva-coated hydroxyapatite[J]. *West China J Stomatol*, 2000, 18(6):416-418.)
- [3] Yamanaka A, Kimizuka R, Kato T, et al. Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral *Streptococci* and biofilm formation[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2004, 19(3):150-154.
- [4] Idone V, Brendtro S, Gillespie R, et al. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(8):4351-4360.
- [5] Lee SF, McGavin MK. Identification of a point mutation resulting in loss of cell wall anchoring activity of SrtA of *Streptococcus mutans* NG5[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(7):4314-4317.
- [6] Vats N, Lee SF. Active detachment of *Streptococcus mutans* cells adhered to epon-hydroxylapatite surfaces coated with salivary proteins in vitro[J]. *Arch Oral Biol*, 2000, 45(4):305-314.
- [7] Lamont RJ, Demuth DR, Davis CA, et al. Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria[J]. *Infect Immun*, 1991, 59(10):3446-3450.
- [8] Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*[J]. *Infect Immun*, 1992, 60(1):284-295.

(本文编辑 汤亚玲)

本刊对“ 通讯作者 ” 有关事宜的声明

请作者投稿时注意:凡文章内注明通讯作者的稿件,与稿件相关的一切事宜(包括邮寄稿件收稿单、退稿、退修稿件、作者校样、版面费、稿费)均与通讯作者联系;如文内未注明通讯作者的文章,按照国际惯例,有关稿件的一切事宜均与第一作者联系,特此声明。