

变异链球菌的比较蛋白质组学研究进展

曾郑祥综述 周学东审校

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 四川 成都 610041)

[摘要] 最近公布的变异链球菌全基因组序列, 使得对变异链球菌全面的蛋白组图谱分析成为可能。变异链球菌的蛋白质组学研究将进一步揭示其致龋的分子机制。比较蛋白质组学是蛋白质组学的一个重要分支, 因此下面就变异链球菌对酸反应的比较蛋白质组学研究和变异链球菌浮游态与生物膜态的比较蛋白质组学等研究, 介绍比较蛋白质组学在变异链球菌中的研究进展。

[关键词] 蛋白质组学; 比较蛋白质组学; 变异链球菌

[中图分类号] Q 51 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.04.029

Development of studies on comparative proteomics of *Streptococcus mutans* ZENG Zheng-xiang, ZHOU Xue-dong. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] The announced *Streptococcus mutans* genome sequence recently makes its comprehensive proteome map analysis possible. *Streptococcus mutans* in proteomics research will further reveal the molecular mechanism of its carcinogenicity. Comparative proteomics is an important branch of proteomics, so the paper review development of studies on comparative proteomics of *Streptococcus mutans* in several aspects, such as the comparative proteomics research of *Streptococcus mutans* to acid reaction, the comparative proteomics research of planktonic-state and biofilm-state *Streptococcus mutans* and so on.

[Key words] proteomics; comparative proteomics; *Streptococcus mutans*

蛋白质组是指由一个基因组或一个细胞和组织通过转录翻译表达的所有蛋白质, 是由威尔金斯和威廉斯于 1994 年在第 1 届意大利锡耶纳蛋白质会议上提出来的^[1]。蛋白质组学是指从整体角度去分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态, 进而了解蛋白质之间的相互作用和联系, 揭示蛋白质功能与细胞生命活动规律的一个新的研究技术。比较蛋白质组学则针对不同空间和不同时间上动态变化着的蛋白质组整体进行比较, 分析不同蛋白质组之间蛋白质在表达数量、表达水平和修饰状态上的差异。

目前, 病原微生物的比较蛋白质组学研究主要集中在: 同一种病原微生物的不同生理状态的比较蛋白质组学, 同一种病原微生物的不同菌株之间的比较蛋白质组学与病原微生物的分泌蛋白、膜蛋白等亚单位的蛋白质组学研究等方面^[2-4]。下面就近年来比较蛋白质组学在变异链球菌中的研究进展作一综述。

1 变异链球菌对酸反应的比较蛋白质组学

产酸和耐酸是变异链球菌的重要致龋特性。Wilkins等^[2]于变异链球菌在 pH5.2 和 7.0 状态下的菌细胞内可溶性蛋白研究中发现, 在低 pH 条件下, 共有 30 种蛋白发生了表达变化。其中包括相对分子质量为 60 000 的分子伴侣以及中性肽链内切酶、葡萄糖磷酸变位酶、细胞分裂蛋白、烯醇化酶、乳酸脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶、3-羟基丁酮还原酶、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和乳酸酰谷胱甘肽裂解酶(lactoyl-glutathione lyase, LGL)等 18 种蛋白表达增加, 另外有蛋白翻译延伸因子(elongation factor, EF)-G、Tu、Ts、DnaK、核糖体蛋白小亚基 S1P、核糖体蛋白大亚基 L12P、蛋白磷酸转移酶和多糖结合转运系统等 12 种蛋白表达下降。

相对分子质量 60 000 的分子伴侣、LGL 这种醛酮变位酶的同系物和 SOD 都是普遍性的应激蛋白。分子伴侣一般是在变性蛋白的重新折叠和降解过程中起着非常重要的作用, 而相对分子质量 60 000 的分子伴侣在酸性环境下合成量的增

[收稿日期] 2009-08-25; [修回日期] 2010-02-04

[作者简介] 曾郑祥(1985-), 男, 四川人, 博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501438

加,可能与抵御周围酸化环境的影响有关。变异链球菌细胞内的 SOD 与肺炎链球菌内的一样,都含有锰(Mn-SOD),并且都在氧化应激反应过程中起着重要作用^[3]。醛酮变位酶 在哺乳动物以及线虫和酵母的氧化耐受应激反应中起作用,其中许多来自沙门属细菌的醛酮变位酶 基因被克隆和鉴定出来。虽然变异链球菌与口腔链球菌的 LGL 的差异表达是否一致尚未得到证实,但有关肺炎链球菌的研究却发现:在低 pH 条件下,lgI 基因及其在 DNA 上位点接近的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide H, NADH)氧化酶基因表达上升。尽管 LGL 的作用尚不清楚,但 NADH 氧化酶家族成员一般均与变异链球菌的氧化应激反应过程相关^[4]。

Len 等^[5]在研究变异链球菌酸耐受反应蛋白表达时发现,199 个细胞内外蛋白的表达发生了变化,167 种蛋白中有 61 种蛋白与酸应激途径相关,并且在 DNA 的基因表达以及蛋白质多肽链的折叠和蛋白质的水解过程中起重要作用。这 61 种蛋白均来自另外 30 种蛋白的亚型或者单体,其中有 25 种蛋白在变异链球菌的酸耐受反应中表达上升。在这 25 种蛋白质中,DNA 单链结合蛋白(Ssb)、转录延伸因子(GreA)、多(聚)核苷酸磷酸化酶(PnpA)、腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)结合蛋白酶亚基(ClpL)和二肽酶(PepD)等是在变异链球菌的酸耐受反应,甚至是在口腔链球菌的酸耐受反应中首次被分析鉴定出的。

Len 等^[6]通过对变异链球菌蛋白表达水平的变化并结合对碳的最终副产物的利用率(Y_{Glc} , Y_{ATP})的分析发现:在酸耐受环境下,变异链球菌的细胞排出质子(H^+)的能力增强。该发现与其他学者的研究结论相同^[7-9]。研究还发现,变异链球菌通过支链氨基酸合成途径来降低烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate H, NADPH)的生成量,并把原来的还原量用于合成酸的副产物和 NH_3 ,从而起到缓冲细胞质酸性环境的作用。但是,支链氨基酸合成途径在变异链球菌耐受酸性环境中的具体作用尚不清楚。

Korithoski 等^[10]在分析菌细胞的蛋白质组时发现,变异链球菌由中性环境转到酸性环境时,LGL 的表达量增加。即 LGL 具有分解丙酮醛的功能,导致变异链球菌的耐酸性能力增强。

2 变异链球菌浮游态和生物膜态的比较蛋白质组学

变异链球菌在浮游态和生物膜态的致病能力完全不同。Svensäter 等^[11]就变异链球菌在浮游态和培养在恒化器中生物膜态的菌细胞蛋白表达研究显示,生物膜态和浮游态下分别有 57 种和 13 种蛋白表达上升,69 和 9 种蛋白表达下降;质谱差异表达蛋白鉴定显示,生物膜态细胞中的与酸形成相关联的糖酵解酶的合成被抑制,而糖的生物合成过程却增强。该研究还发现生物膜态细胞中存在着新的蛋白质,但其功能还不是很清楚。

Welin 等^[12]在生物膜态和浮游态下的变异链球菌细胞从 pH7.5 转到 5.5 时的蛋白表达研究中发现,酸耐受反应对浮游态细胞的诱导,使得细胞内的糖酵解酶合成下降,从而降低了细胞外酸化环境对细胞的伤害,而生物膜态细胞的糖酵解酶合成下降却不明显,一些核心酶(如乳酸脱氢酶)合成反而上升,即生物膜态细胞对酸的耐受能力较浮游态细胞强。这与生物膜态细胞通过膜 ATP 酶把质子泵出和乳酸盐的脱氢等途径来维持细胞 pH 的内稳态相关。Welin 等^[13]在变异链球菌与物质表面接触黏附时的蛋白表达研究中发现,生物膜态下有 25 种蛋白表达增加,8 种蛋白表达下降,另有 33 种蛋白与黏附应激反应相关。该结果表明,生物膜态细胞最显著的变化是糖分解代谢中的某些酶合成量增加。当变异链球菌黏附于物质表面时,代谢过程发生了从蛋白合成代谢向能量合成代谢的转变。

Rathsam 等^[14]在研究变异链球菌由浮游态转化成成熟的生物膜态时的蛋白表达时发现了 242 种蛋白,其中有 48 种蛋白表达发生了变化($P < 0.05$),有 4 种蛋白与变异链球菌感受态的维持有关系,而且这 4 种蛋白编码基因的上游存在着像 cin 盒子样的元素。例如,RecA 是其中的一种感受态蛋白,它在变异链球菌的转化过程中表达量上升。在人因进食糖类后导致环境 pH 降低的情况下,RecA 能够迅速的在生物膜内启动 SOS 应激反应。因此,变异链球菌能够耐受一个较低的 pH 环境与菌细胞内长期维持有一个较高水平的 RecA 有关。此外,分子伴侣 DnaK 以及 GroEL 和 GroES 都是由非应激性基因编码的,它们在生物膜态下表达量上升。对其余的蛋白组进行分析还发现,变异链球菌细胞内很多与碳的摄取和细胞分裂相

联系的细胞功能都减弱了。

以上研究提示：变异链球菌在成熟生物膜态的转化过程中，伴随着感受态基因的上调，不伴随环境应激蛋白表达的上升；变异链球菌在成熟生物膜态生长速度的减慢只是变异链球菌的一种调控过渡态，非为变异链球菌对生长环境营养的缺乏而产生的饥饿应激反应所导致。上述研究结论与 Lemos 等^[15]的一致。Rathsam 等^[16]在以双向荧光差异凝胶电泳技术研究变异链球菌的生物膜时发现了 73 种蛋白，其中 9 种蛋白在生物膜态下表达增加。该结果与以前总结得到的假说相一致，即处于成熟生物膜态的变异链球菌的细胞代谢能力会下调。该研究还提示，环境应激蛋白的表达对变异链球菌生物膜的形成并非必需。

Luppens 等^[17]通过对变异链球菌的生物膜形成方式以及不同菌株之间、不同生理状态(生物膜态和浮游态)的蛋白表达进行了综合分析后认为，不同菌株之间的差异和不同生物膜形成方式的差异所导致的蛋白表达变化，较不同生理状态条件下的差异所导致的蛋白变化更显著。因此，在比较不同文献的研究结果时，最好采用同一菌株，这样可避免由菌株差异带来的巨大蛋白质差异。但是，正如最近流行的一个“分散式基因组”假说^[18-19]的那样，“一个菌种的绝大多数基因不可能在该菌种的所有菌株里都能找到，而是分散存在于不同菌株里”，如果只使用某一菌株，会丢失较多有用的信息。所以，建议还是选用多个菌株进行相关的研究和试验，而菌株的数目主要应根据研究目的来决定。

3 其他

Svensäter 等^[20]在用 2-DE 和放射自显影图像分析系统分析变异链球菌在温度、pH、盐、氧化和饥饿等不同环境应激状态的蛋白表达差异时发现：在氧化条件下，有 69 种蛋白表达上升(其中 15 种蛋白是氧化特异性应激蛋白)，24 种蛋白表达下降；在饥饿条件下，有 58 种蛋白表达上升(其中 11 种是饥饿特异性蛋白)，20 种蛋白表达下降；在盐和温度应激条件下，分别有 52 和 40 种蛋白表达上升，10 和 6 种蛋白表达下降；同时，还有 6 种蛋白在所有这些应激反应中表达都增加，称其为普遍应激性蛋白。由此可见，变异链球菌为了适应不同的环境条件，菌细胞内发生了一系列复杂的蛋白表达变化。

Guo 等^[21-23]在研究了变异链球菌 9-1 和 9-2 临床分离株间的蛋白表达差异后发现，有 12 种蛋白仅在 9-1 菌株中表达，有 3 种蛋白仅在 9-2 菌株中表达。它们皆与蛋白质合成、蛋白质肽链折叠、细胞壁合成、脂肪酸合成、核酸合成、DNA 损伤修复、糖代谢和信号转导密切相关。因此，该研究对了解龋病的发病机制提供了新的信息。

细菌的膜蛋白由于低丰度、溶解性差和疏水性强，所以其在 2-DE 的蛋白组图谱上较少发现。Zuobi-Hasona 等^[24]分别采用了 3 种方法对变异链球菌膜蛋白增溶后的 2-DE 进行了研究。后来，他们以一种新的方法分离提取细菌膜蛋白，选择了变异链球菌作为试验菌，最后采用 2-DE 对膜蛋白进行了分析^[25]。

4 参考文献

- [1] Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. Progress with proteome projects :Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13 :19-50.
- [2] Wilkins JC, Homer KA, Beighton D. Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (5) 2382-2390.
- [3] Nakayama K. Nucleotide sequence of *Streptococcus mutans* superoxide dismutase gene and isolation of insertion mutants[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(15) 4928-4934.
- [4] Higuchi M, Yamamoto Y, Poole LB, et al. Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans* [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(19) 5940-5947.
- [5] Len AC, Harty DW, Jacques NA. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 5) :1339-1351.
- [6] Len AC, Harty DW, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 5) :1353-1366.
- [7] Jonathan R, Alan P. Sugar transport and metabolism in Gram-positive bacteria[M]. London :Ellis Harwood, 1987 : 94-133.
- [8] Iwami Y, Abbe K, Takahashi-Abbe S, et al. Acid production by *streptococci* growing at low pH in a chemostat under anaerobic conditions[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 1992, 7(5) 304-308.
- [9] Miyagi A, Ohta H, Kodama T, et al. Metabolic and energetic aspects of the growth response of *Streptococcus rattus* to environmental acidification in anaerobic continuous culture [J]. *Microbiology*, 1994, 140(Pt 8) :1945-

1952.

[10] Korithoski B, Lévesque CM, Cvitkovitch DG. Involvement of the detoxifying enzyme lactoylglutathione lyase in *Streptococcus mutans* aciduricity[J]. J Bacteriol, 2007, 189(21) :7586-7592.

[11] Svensäter G, Welin J, Wilkins JC, et al. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205(1) :139-146.

[12] Welin J, Wilkins JC, Beighton D, et al. Effect of acid shock on protein expression by biofilm cells of *Streptococcus mutans*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 227(2) :287-293.

[13] Welin J, Wilkins JC, Beighton D, et al. Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6) :3736-3741.

[14] Rathsam C, Eaton RE, Simpson CL, et al. Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 6) :1823-1837.

[15] Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic *streptococci* to environmental stresses[J]. Curr Issues Mol Biol, 2005, 7(1) :95-107.

[16] Rathsam C, Eaton RE, Simpson CL, et al. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoretic analysis of *Streptococcus mutans* biofilms[J]. J Proteome Res, 2005, 4(6) :2161-2173.

[17] Luppens SB, ten Cate JM. Effect of biofilm model, mode of growth, and strain on *Streptococcus mutans* protein expression as determined by two-dimensional difference gel electrophoresis[J]. J Proteome Res, 2005, 4(2) :232-

237.

[18] Antalis P, Gladitz L, Shen J, et al. Demonstration of extensive genomic plasticity among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and evidence for a population based supra-genome[C]. Proceedings of Biofilms, Victoria USA, 2003.

[19] Ehrlich GD. The distributed genome hypothesis explains many facets of bacterial persistence and chronicity of infection[C]. Proceedings of Biofilms, Victoria USA, 2003.

[20] Svensäter G, Sjögreen B, Hamilton IR. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins[J]. Microbiology, 2000, 146(Pt 1) :107-117.

[21] Guo LH, Wang HL, Liu XD, et al. Identification of protein differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by proteomic analysis[J]. Oral Microbiol Immunol, 2008, 23(2) :105-111.

[22] 郭丽宏, 史俊南, 张莹. 利用抑制消减杂交技术构建变形链球菌高毒力株特异的基因文库[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(6) :524-528.

[23] 郭丽宏, 史俊南. 变形链球菌高毒力株特异DNA片段的序列测定及生物信息学分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(6) :541-545.

[24] Zuobi-Hasona K, Crowley PJ, Hasona A, et al. Solubilization of cellular membrane proteins from *Streptococcus mutans* for two-dimensional gel electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2005, 26(6) :1200-1205.

[25] Zuobi-Hasona K, Brady LJ. Isolation and solubilization of cellular membrane proteins from bacteria[J]. Methods Mol Biol, 2008, 425 :287-293.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第476页)

32-48.

[5] Cole P, Kaufman Y, Momoh A, et al. Techniques in frontal sinus fracture repair[J]. Plast Reconstr Surg, 2009, 123(5) :1578-1579.

[6] Fattahi T, Johnson C, Steinberg B. Comparison of 2 preferred methods used for frontal sinus obliteration[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2005, 63(4) :487-491.

[7] Elahi MM, Vanduzer S, Spears J, et al. Frontal sinus obliteration with beta-tricalcium phosphate[J]. J Craniofac Surg, 2004, 15(6) :967-970.

[8] Aitasalo KM, Peltola MJ. Bioactive glass hydroxyapatite in fronto-orbital defect reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 120(7) :1963-1974.

[9] Kristin J, Betz CS, Stelter K, et al. Frontal sinus obliteration—a successful treatment option in patients with endoscopically inaccessible frontal mucocoeles[J]. Rhinology, 2008, 46(1) :70-74.

[10] D'Addario M, Haug RH, Talwar RM. Biomaterials for use

in frontal sinus obliteration[J]. J Long Term Eff Med Implants, 2004, 14(6) :455-465.

[11] Bluebond-Langner R, Jackowe D, Rodriguez ED. Simultaneous obliteration and treatment of infected frontal sinus fractures :Novel use of the fibula flap[J]. J Craniofac Surg, 2007, 18(3) :680-683.

[12] Pham AM, Strong EB. Endoscopic management of facial fractures[J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2006, 14(4) :234-241.

[13] Piccolino P, Vetrano S, Mundula P, et al. Frontal bone fractures :New technique of closed reduction[J]. J Craniofac Surg, 2007, 18(3) :695-698.

[14] Chandra RK, Kennedy DW, Palmer JN. Endoscopic management of failed frontal sinus obliteration[J]. Am J Rhinol, 2004, 18(5) :279-284.

[15] Sindwani R, Metson R. Image-guided frontal sinus surgery[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2005, 38(3) :461-471.

(本文编辑 王 晴)