

· 临床研究 ·

不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株与 HtrA 关系的研究*

杨江华¹, 郭夕源², 王光平¹, 李明霞¹, 刘兴容^{1△}

(1. 泸州医学院附属口腔医院, 四川泸州 646000; 2. 泸州医学院免疫学教研室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨不同龋敏感儿童口腔变异链球菌 HtrA mRNA 和蛋白质的表达情况与乳牙龋坏程度和 HtrA 的关系。

方法 以高龋、中龋和无龋儿童口腔中分离得到的变异链球菌为实验菌株, 复苏, 增菌, 分离纯化核酸, 采用逆转录 PCR(RT-PCR)法, 提取变异链球菌临床分离株总 RNA, 凝胶电泳检测 RNA 完整性, 合成 cDNA, PCR 扩增, 将扩增产物凝胶成像系统下观察记录结果, 将目的基因 HtrA 及内参的电泳图像利用凝胶定量分析软件 Gel-Pro analyzer 4.0 进行灰度扫描, 分析计算基因相对表达值; 采用蛋白质印迹(Western blot)法, 验证变异链球菌临床分离株总蛋白, 结果用 Bio-Rad 凝胶摄影分析系统扫描入计算机中, 凝胶定量分析软件 Quantity One 4.4.0 分析其灰度值, 计算蛋白的相对表达水平。**结果** 高龋、中龋及无龋儿童口腔变异链球菌临床分离株 HtrA mRNA 的表达和 HtrA 蛋白的表达均存在差异, 从高到低为高龋组、中龋组、无龋组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离菌株 HtrA mRNA 的表达和 HtrA 蛋白的表达均存在差异, 龋敏感性越高, HtrA mRNA 的表达和 HtrA 蛋白的表达越高。

关键词: 龋齿; 乳牙; 变异链球菌; HtrA; 龋敏感; mRNA; 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)24-2834-03

Evaluation of the relationship between HtrA and streptococcus mutans isolated from the children with different caries experience*

Yang Jianghua¹, Guo Xiuyan², Wang Guangping¹, Li Mingxia¹, Liu Xingrong^{1△}

(1. Hospital of Stomatology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Immunology Teaching and Research Section, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To evaluate the relationship between mRNA and protein expression of HtrA and Streptococcus mutans isolated from the children with different caries experience and to provide the theoretical and experimental basis on prediction of dental caries in deciduous teeth. **Methods** The strains of Streptococcus mutans isolated from children with different carious experiences in the preliminary experiments were divided into three groups: high caries-susceptible group, middle caries-susceptible group, caries-free group. All strains were reanimated on the agar plate of MS, and after smear pure culture examination, typical bacteria were incubated in BHI, then purified nucleic acid and extracted all the RNA of streptococcus mutans by reverse transcription PCR and detected it by agarose gel electrophoresis integrality. Synthetic cDNA and take further PCR amplification with cDNA products. Observe records results by Gel imaging system. HtrA of target gene and electrophoresis image were gray scan by Gel quantitative software Gel-Pro analyzer 4.0 was used to analyze relative expression value of gene. After purifying protein, collected total protein of Streptococcus mutans strains by Western Blot method, then tested the concentration of total protein sample. The results of Chemiluminescence imaging were scanned into computer by Bio-Rad analyzing system, calculated the gray value by software Quantity One 4.4.0 which showed the relative expression level of protein. **Results** There were significant differences in HtrA mRNA and protein expression of different Streptococcus mutans isolated from the children with different caries susceptibility. high caries-susceptible group > middle caries-susceptible group > caries-free group ($P < 0.05$). **Conclusion** There were significant differences in HtrA mRNA and protein expression of different Streptococcus mutans isolated from the children with different caries susceptibility. The higher caries susceptibility the group was, the more HtrA mRNA and protein the strain express.

Key words: dental caries; deciduous teeth; streptococcus mutants; HtrA; caries experience; mRNA; protein

龋病是世界范围内的常见病和多发病, 而乳牙龋又是儿童常见的多发病, 不仅直接破坏儿童的咀嚼器官, 还可以影响全身的营养和发育, 同时可以成为某些慢性疾病的病灶, 并导致颌面部发育障碍及各种口腔疾病, 对小儿心理造成不良的影响, 使儿童身心健康受到严重损害^[1-4]。因此, 如何有效预防乳牙龋的发生具有重要意义, 但龋病的病因复杂, 发病机制尚不清楚, 目前仍未找到一种十分有效的预防方法, 龋病的防

治存在相当大的难度^[5]。变异链球菌(streptococcus mutans, S. mutans)作为人类龋病主要的致病菌和致龋生物膜形成的必需细菌, 在人类口腔中占有重要的生态地位, 具备了在牙面定植的多种特性, 是牙菌斑生物膜的重要组成部分, 也是致龋生物膜中数量较多的细菌之一。高温需要 A(high temperature requirement A, HtrA)蛋白是细菌体内一种热休克蛋白质分子, 为丝氨酸蛋白酶家族成员。HtrA 在细菌的耐热特性中发

* 基金项目: 四川省卫生计生厅课题基金资助项目(100247)。 作者简介: 杨江华(1984~), 医师, 硕士, 主要从事牙体牙髓病的基础与临床研究。 △ 通讯作者, Tel: 18980254696; E-mail: liuxingrong163@163.com。

挥着重要的作用,当环境温度正常时作为分子伴侣存在,当环境温度升高时则作为蛋白酶参与细胞质内异常蛋白的降解。研究显示,变异链球菌表面同样存在 HtrA,不同细菌 HtrA 基因位点不同,通过插入复制失活方式使链球菌 HtrA 基因缺陷后,可以改变菌细胞的分化,引起生长的缺陷,毒力因子表达减弱,自然转化能力下降,毒力下降,因此可以推测,HtrA 作为细菌表面的蛋白酶,调控着其它毒力因子的产生,在细菌致病过程中发挥着关键作用,是关键的毒力因子。以变异链球菌表面丝氨酸蛋白酶-HtrA 为靶点探索龋病发病的关键环节具有重要的意义。

本实验在前期研究的基础上,对不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株 HtrA 信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)和 HtrA 蛋白质的表达进行分析研究,初步分析乳牙龋破坏程度和 HtrA 之间的关系,为进一步完善龋危险性预测方法提供有力的理论和实验依据。

1 材料与与方法

1.1 实验菌株及细菌培养 前期实验从 3~5 岁学龄前儿童口腔中分离得到的不同龋敏感患儿变异链球菌 45 株,龋失补牙数(decay miss fill teeth, dmft),其中,高龋(dmft≥6)组 15 株;中龋(dmft 4~6)组 15 株;无龋(dmft=0)组 15 株。变异链球菌国际标准菌株(S. mutans) ATCC 25175(血清型 C)即 SM 组,由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供。

将前期实验甘油保种的变异链球菌临床分离株分别接种于 MS(Murashige and Skoog)固体培养基,37℃,厌氧(80% N₂、10% H₂、10% CO₂)复苏 48 h,检查生长情况,镜检鉴定无污染后,挑取单个菌落转种于 BHI 液体培养基增菌,厌氧(80% N₂、10% H₂、10% CO₂)培养 24 h,涂片检查为纯培养并经生化鉴定为变异链球菌后,离心,收集细菌。

1.2 主要的仪器和设备 厌氧培养箱 YQX 型(上海跃进医疗器械厂);SW-LJ-IF 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);8751 超低温冰箱(美国 Forma 公司);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);GeneAmp 9700 型 PCR 仪(ABI);ND-1000 核酸蛋白检测仪(美国 Nanodrop 公司);Tan-non2500 凝胶图像扫描系统(美国 BIO-RAD 公司);Mini-P3 垂直电泳仪(美国 Biorad 公司);湿转电转移仪(美国 Biorad 公司);高速多功能冷冻离心机(THERMO Biofuge stratos);电子天平(德国 Sartorius 公司);涡轮震荡器(北京六一仪器厂);塑料薄膜封口机(温州正雄包装机械有限公司);侧摆摇床(碧云天生物技术研究所);水浴锅(余姚市东方电工仪器厂);电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医用光学仪器厂);MSE Micro-Centaur Centrifuge 微型台式离心机(日本 Sanyo 公司);水平电泳仪(美国 Biorad 公司);FUJI 凝胶成像系统(美国冷泉港公司);微量移液器(法国 Gilson 公司);Maxi-Mix II 试管震荡器(美国 Barnstead/Thermolyne 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 不同龋敏感儿童变异链球菌临床分离株 HtrA mRNA 的表达 提取变异链球菌临床分离株总 RNA,在核酸蛋白检测仪上检测提取的各分离株总 RNA 浓度、纯度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,合成 cDNA,进行 PCR 反应,反应结束后将扩增产物进行 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳,以 DL500 DNA Marker 为分子量参照标准,凝胶成像系统下观察记录结果。将所得的目的基因 HtrA 及内参的电泳图像利用凝胶定

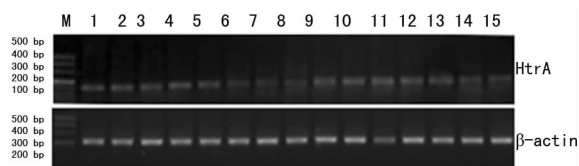
量分析软件进行灰度扫描,分析计算基因相对表达值。

1.3.2 不同龋敏感儿童变异链球菌临床分离株 HtrA 蛋白的表达 提取细菌总蛋白,检测总蛋白样品浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,考马斯亮蓝染色、转膜(槽式湿转法)、封闭及杂交,化学发光显影后进行图像处理分析,结果用 Bio-Rad 凝胶摄像分析系统扫描入计算机中,凝胶定量分析软件分析其灰度值,表示蛋白的相对表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对所得数据进行统计分析,方差齐性检验后多组间的比较采用单因素方差分析法,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同龋敏感儿童变异链球菌临床分离株 HtrA mRNA 的表达 目的基因 HtrA 和内参 β -actin 在各样品中均能被特异性扩增,产物大小与设计相符(图 1)。



1~5:高龋组;6~8:无龋组;9~11:SM组;12~15:中龋组。

图 1 变异链球菌 RT-PCR 扩增结果

不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株 HtrA 基因表达的比较见表 1。

从表 1 可以看出,高龋、中龋和无龋儿童口腔中变异链球菌临床分离株 HtrA 基因表达量是有差异的,从高到低为 SM 组、高龋组、中龋组、无龋组,且差异有统计学意义($F = 27.80$, $P < 0.05$)。

表 1 不同龋敏感儿童变异链球菌 HtrA 基因的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	IODHtrA/IOD β -actin
高龋组	0.58±0.08
中龋组	0.48±0.04
无龋组	0.28±0.03
SM 组	0.73±0.08

2.2 不同龋敏感儿童变异链球菌临床分离株 HtrA 蛋白的表达 不同组 HtrA 蛋白表达的电泳图,见图 2。

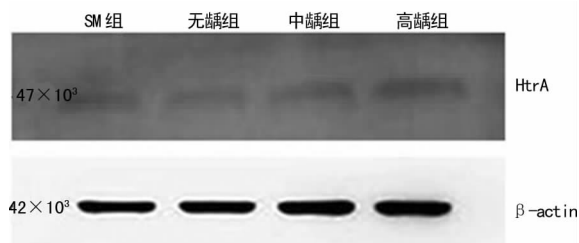


图 2 Western blot 分析不同龋敏感儿童变异链球菌 HtrA 的表达情况

不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株 HtrA 蛋白表达的比较见表 2。

从表 2 可以看出,高龋、中龋和无龋儿童口腔中变异链球菌临床分离株蛋白表达量是有差异的,从高到低为 SM 组、高

龋组、中龋组、无龋组,且差异有统计学意义($F=108.97, P<0.05$)。

表 2 不同龋敏感儿童变异链球菌 HtrA 蛋白的表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	IODHtrA/IOD β -actin
高龋组	0.13 \pm 0.01
中龋组	0.10 \pm 0.01
无龋组	0.02 \pm 0.01
SM 组	0.15 \pm 0.02

3 讨 论

乳牙龋是儿童最常见的口腔疾病,其中变异链球菌是主要的致龋菌之一。龋损发生的直接原因是牙菌斑生物膜内致龋菌的产酸活动。变异链球菌的致龋性主要是通过其毒力因子来完成的,而 HtrA 作为细菌表面的蛋白酶,调控着其它毒力因子的产生,在细菌致病过程中发挥着关键作用,是关键的毒力因子。本实验正是以不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株 HtrA 表达差异为研究点,探索 HtrA 与乳牙龋发生的关系。

国内外的研究表明变异链球菌 DNA 和毒力因子存在基因多态性,并且与其致龋力关系密切^[6-7],在发生龋病的过程中,高龋组个体所携带的部分产酸能力强的菌株的作用可能起重要作用,基因型或其他表达的不同可能是导致菌株致龋性差异的因素。变异链球菌不同菌株的致龋毒力存在很大差异,有研究认为这种差异主要与该菌致龋毒力因子的表达水平密切相关^[8]。曹元书等^[9]以高龋、中龋和无龋儿童口腔中分离得到的变异链球菌为实验菌株,配制菌悬液,在不同 pH 值的 BHI 液体培养基中厌氧培养,比较细菌的产酸能力和细菌的生长情况,发现儿童高、中龋患者口腔中分离出的变异链球菌临床分离株的产酸和耐酸能力明显高于无龋者,龋敏感性高者的变异链球菌临床分离株具有高致龋性。杨铁崎等^[10]收集了不同龋敏感性儿童口腔分离的变异链球菌,通过逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)方法对所有菌株 HtrA 的 mRNA 的表达水平进行了检测;此外,还检测了在分别含有 10、20 mmol/L 乳酸的培养基中生长的变异链球菌 UAI59 菌株 HtrA mRNA 的表达变化,发现 HtrA 基因的表达与变异链球菌的致龋性和耐酸性有着一定的相关性。本实验在前期对不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株基因分型研究的基础上,检测不同龋敏感儿童变异链球菌 HtrA mRNA 和蛋白的表达情况,结果发现,不同龋敏感儿童口腔变异链球菌临床分离株 HtrA 基因表达量和蛋白表达量是有差异的,从高到低为高龋组、中龋组、无龋组,且差异有统计学意义,龋敏感性越高, HtrA 基因和蛋白表达越高。这一结论可以为龋病疫苗的研发和有效的药物作用靶点寻找提供方向,并可根据靶点的特点设计出相关的疫苗和药物进行靶向治疗。

季晓黎等^[11]研究发现 HtrA、clpP 基因单独或同时缺失可抑制变异链球菌的生长。黄远师等^[12]通过插入复制失活的方式使肺炎链球菌 HtrA 基因缺失,通过 RT-PCR 分析毒力因子表达,并用动物试验观察 HtrA 基因缺陷株毒力改变情况,结果显示 HtrA 缺陷株毒力因子表达低于野毒株,转化试验发现

缺陷菌株转化力下降;HtrA 基因缺陷使肺炎链球菌多种毒力因子表达减弱,自然转化能力下降,毒力降低,由此可以推测,变异链球菌 HtrA 基因缺陷是否也会使细菌的毒力降低,致龋性下降,目前国内外还未见相关报道,对这一方面的深入认识有待进一步的研究和探索。

参考文献:

- [1] Carletto Korber FP, Cornejo LS, Gimenez MG. Early acquisition of streptococcus mutans for children[J]. Acta Odontol Latinoam, 2005, 18(2): 69-74.
- [2] Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission[J]. Pediatr Dent, 2006, 28(2): 106-109.
- [3] Aguilera Galaviz LA, Aceves Medina Mdel C, Estrada Garcia IC. Detection of potentially cariogenic strains of streptococcus mutans using the polymerase chain reaction[J]. J Clin Pediatr Dent, 2002, 27(1): 47-51.
- [4] Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, et al. Genome sequence of Streptococcus mutans UAI59, a cariogenic dental pathogen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 14434-14439.
- [5] Gilbert P, McBain A, Sreenivasan P. Common therapeutic approaches for the control of oral biofilms: microbiological safety and efficacy [J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13 (Suppl 4): S17-24.
- [6] Truong TL, Menard C, Mouton C, et al. Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. J Med Microbiol, 2000, 49 (1): 63-71.
- [7] Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T, et al. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from Streptococcus mutans TM8148 [J]. J Dent Res, 2002, 81(2): 109-113.
- [8] Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushima K, et al. Comparative analysis of GTF isozyme production and diversity in isolates of Streptococcus mutans with different biofilm growth phenotypes[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42 (10): 4586-4592.
- [9] 曹元书, 刘兴容. 不同龋敏感儿童变形链球菌临床分离株产酸耐酸能力的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2009, 25(1): 103-106.
- [10] 杨铁崎, 聂庆东, 郑鹏, 等. 变异链球菌致龋性及酸性压力对其 HtrA 表达情况的影响[J]. 口腔医学研究, 2013, 29 (2): 164-166.
- [11] 季晓黎, 于丹妮, 王拓, 等. HtrA、clpP 基因缺失对变异链球菌生长影响的初步观察[J]. 天津医药, 2012, 40(4): 330-333.
- [12] 黄远师, 许颂霄, 朱旦, 等. HtrA 基因缺陷对肺炎链球菌毒力影响的研究[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(17): 1542-1546.