

变形链球菌 mutans 表面蛋白 P1 对人唾液接受器研究

黄定明 罗宗莲 周学东 杨继虞

摘要 收集人刺激性腮腺唾液,在碱性条件下聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化唾液蛋白 7 种,命名为 B₁~B₇,分别包被羟磷灰石珠,用¹²⁵I 标记纯化的变形链球菌 MT₆R(血清型 c)粘附素蛋白 P1,观察其对每种唾液蛋白的粘附能力,以研究变形链球菌粘附素蛋白 P1 的接受器。结果显示变形链球菌 mutans 表面蛋白 P1 对不同唾液蛋白的粘附量不同,具有选择性(P<0.01),对 B₅,B₆ 粘附量特别高。已证实 B₅,B₆ 为酸性富脯氨酸,提示酸性富脯氨酸可能为变形链球菌粘附素蛋白 P1 的重要接受器之一。

关键词 变形链球菌蛋白 P1 唾液 粘附 富脯氨酸 接受器

变形链球菌(简称变链菌)是人类龋病最重要致龋菌之一,而变链菌在牙面上粘附和定居形成致龋性牙菌斑是变链菌致龋最重要的生物学特性之一。人口腔中始终存在唾液,牙齿一经萌出于口腔,唾液蛋白在牙面吸附形成获得性膜^[1],即便刷洗除去,立即又会形成。因此,变链菌在牙面上粘附和定居实际上是与牙面上唾液蛋白发生作用。作者已研究表明变链菌 MT₆R(血清型 c)表面蛋白 P1 可能是变链菌 MT₆R 的重要粘附素(adhesins)之一^[2]。在牙面获得性膜内是否具有与变链菌表面蛋白 P1 特异性粘附的接受器(acceptors),尚未见有报道,研究这一问题,对于探讨变链菌粘附机理,评价蛋白 P1 的重要地位,揭示人对龋病的敏感性,具有重要意义。

本研究对人腮腺唾液蛋白在碱性条件下经电泳分离纯化,包被羟磷灰石珠,与¹²⁵I 标记的变链菌蛋白 P1 进行离体粘附实验,初步探讨变链菌表面蛋白 P1 对人体唾液蛋白是否具有选择性粘附以及寻找变链菌表面蛋白 P1 的接受器。

1 材料和方法

1.1 腮腺唾液的收集

收集对象进食后 2 h 内禁饮禁食,在维生素 C 片

剂刺激下,用 Curby's 杯收集腮腺导管口的唾液,5~8℃ 低温离心(3000 rpm,15 min)取上清液,-20℃ 冰冻备用。

1.2 唾液蛋白的制备

采用 Laemmli 方法连续电泳^[3]。电泳条件:聚丙烯酰胺凝胶浓度(W/V)15%,缓冲体系为 pH 8.8,0.0375 mol/L Tris-HCl,恒压电泳至示踪剂距正极端 1 cm 处停止电泳,根据蛋白带位置切取凝胶,用氯化钾缓冲液(1 m mol/L pH 7.2 KH₂PO₄-K₂HPO₄ 磷酸盐缓冲体系中加入 50 m mol/L KCl,1 m mol/L CaCl₂,1 m mol/L MgCl₂)浸泡提取蛋白,用 Lowry 法测量蛋白浓度,获得 7 种唾液蛋白,命名为 B₁~B₇。

1.3 变链菌表面蛋白 P1 的分离、纯化、鉴定和¹²⁵I 标记

方法参见作者另篇报道^[2]。

1.4 羟基磷灰石珠表面处理

羟基磷灰石(简称 HA)由美国 Forsthy 牙科研究中心提供,呈微珠状。用精确度为 0.1 mg 电光分析天平准确称取 10 mg HA 置于测量管内,0.2 ml 氯化钾缓冲液室温浸泡过夜。

1.4.1 唾液蛋白膜的形:用微型台式真空泵将浸泡好的 HA 珠中氯化钾缓冲液抽吸干净,然后按实验分组各管加入 0.3 ml 纯化唾液蛋白 B₁~B₇,充分混匀,室温静置 2 h,吸取上清液,氯化钾缓冲液洗涤 3 次;2

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院(黄定明,罗宗莲,周学东),华西医科大学药学院(杨继虞)

mg/ml BSA 0.3 ml(牛血清白蛋白)封闭可能未包被的 HA 表面,氯化钾缓冲液洗涤 3 次,吸干。

1.4.2 牛血清白蛋白膜(B-HA)形成:在装有 HA 的试管内加入 2 mg/ml BSA 0.3 ml,混匀,室温放置 2 h,抽干,氯化钾缓冲液洗涤 3 次,即成 B-HA。

1.4.3 仅用氯化钾缓冲液浸泡 HA:在装有 HA 的测量管内加入 0.3 ml 氯化钾缓冲液浸泡 2 h 抽干液体。

1.5 蛋白 P1 对 HA 的粘附实验

在准备好的各组 HA 测量管内加入¹²⁵I-蛋白 P1 10 μl(总放射剂量为 75328 cpm),充分混匀,室温放置 1 h,吸干液体,氯化钾缓冲液反复洗涤 3 次,以除去未结合¹²⁵I-蛋白 P1,负压吸干,HJS-7 型自动定标器测量各管 CPM 值。

1.6 数据的统计分析方法

本研究结果为计量资料,单因素方差分析,两两之间 Newman-Keuls q 检验。

2 结 果

2.1 变链菌表面蛋白 P1 对不同唾液蛋白的粘附量不同,高者达 17245±180 cpm,粘附率为 314%,低者为 9522±180 cpm,粘附率仅为 65%,差异显著(P<0.01),见附表,提示变链菌表面蛋白 P1 对唾液的不同蛋白具有选择性粘附。

附表 变链菌表面蛋白 P1 对唾液各电泳蛋白的粘附 n=3

HA 预处理	蛋白 P1 粘附量 (cpm)	蛋白 P1 粘附率* (%)
缓冲液组	10621±347	100
牛血清组	7524±500	0
B ₁	10707±320	103
B ₂	9522±180	65
B ₃	11364±241	124
B ₄	12915±315	174
B ₅	17245±180	314
B ₆	14557±342	227
B ₇	13065±145	179

缓冲液组为阳性对照 牛血清组为阴性对照

* 蛋白 P1 粘附率计算公式为:

$$\frac{\chi - \text{牛血清组}}{\text{缓冲液组} - \text{牛血清组}} \times 100\%$$

χ 为蛋白 P1 在唾液蛋白膜上粘附量。

2.2 变链菌表面蛋白 P1 对唾液蛋白 B₅,B₆ 粘附较高,其粘附率大于 200%,q 检验,与 PBS 组相比,差异

显著(P<0.01)。提示变链菌表面蛋白 P1 对唾液蛋白 B₅,B₆ 可能存在特别亲和力。

3 讨 论

3.1 变链菌表面蛋白 P1 对唾液蛋白选择性粘附可能是人群患龋不同的生物学因素之一

本实验将腮腺唾液在凝胶浓度为 15% 的碱性电泳系统中分离其蛋白成份,分别包被 HA,观察变链菌表面蛋白 P1 对唾液蛋白粘附情况。结果显示蛋白 P1 对不同唾液蛋白粘附存在明显差异,对 B₅,B₆,B₇ 唾液蛋白粘附较高。作者研究已表明,变链菌表面蛋白 P1 可能为变链菌的重要粘附素之一^[2],患龋人群腮腺唾液电泳显示 B₅,B₆,B₇ 蛋白带出现率明显高于无龋组^[4],且 B₅,B₆ 对羟磷灰石有较高的吸附率^[4],这可能将导致变链菌表面蛋白 P1 在患龋人群 S-HA 上粘附高于无龋组。可以考虑,人群中唾液蛋白成份不同,可能导致局部获得性膜组成差异,从而引起口腔菌群的选择性粘附,为形成致龋性菌斑提供了有利条件,成为龋敏感个体差异的重要生物学基础之一。

3.2 唾液蛋白 B₅,B₆ 可能是变链菌 MT₆R(血清型 c)粘附素蛋白 P1 的接受器之一

研究表明^[4],唾液蛋白 B₅,B₆ 对羟磷灰石具有很高亲和力,参与唾液膜构成,是唾液膜的重要成份,其可能存在与变链菌粘附素蛋白 P1 在唾液膜内发生结合的基团——结合位点(binding sites)。本研究结果表明:变链菌表面蛋白 P1 与唾液蛋白 B₅ 粘附率高达 314%,其次 B₆ 为 227%。B₅ 蛋白带可能含有富脯蛋白 PRP-1 和 PRP-2,唾液蛋白带 B₆ 可能含有 PRP-3 和 PRP-4。Gibbons 等^[5]报告酸性 PRP 能促进变链全菌粘附,特别是唾液 PRP-1 比 PRP-3 更能促进变链菌 JBP 粘附。本实验结果与其基本一致,提示变链全菌对唾液 PRP 选择性粘附的机理之一在于变链菌表面粘附素蛋白 P1 对唾液 PRP 的特殊亲和力。

Bennick 等^[6]报告酸性富脯蛋白氨基末端

与牙面结合,可暴露其富含甘氨酸、脯氨酸残基等疏水基团。Koga 等^[7]发现变链菌疏水性越强,则其粘附性越高,而变链菌表面蛋白 P1 与变链菌疏水性有关,提示蛋白 P1 含疏水基团。氨基酸序列分析表明蛋白 P1 氨基末端富含丙氨酸等疏水氨基酸残基,且蛋白 P1 与唾液蛋白结合区域位于该段^[8,9]。由此蛋白 P1 与唾液膜的粘附是否通过蛋白 P1 的疏水基团与唾液膜内 PRP-1 的疏水基团形成疏水键,值得进一步研究。总之,变链菌粘附素蛋白 P1 对获得性膜内酸性富脯蛋白的结合可能是介导变链菌(血清型 c)初始粘附的重要机理之一。

4 参考文献

- 1 Hay DI. The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Arch Oral Biol, 1967; 12 : 937
- 2 罗宗莲,黄定明,周学东,等. 变形链球菌 mutans(血清型 c)表面蛋白 P1 的粘附作用. 待发表.
- 3 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during

assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227 : 680

- 4 罗宗莲,黄定明,杨继虞,等. 不同龋敏感人群唾液蛋白的研究,牙体牙髓牙周病学杂志,1995; 16(2) : 69
- 5 Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of S. mutans JBP to apatite surfaces. J Dent Res, 1989; 68 : 1303
- 6 Bennick A, Cannon M. The nature of the HA-binding sites in salivary acidic proline-rich protein. Biochem J, 1979; 183 : 115
- 7 Koga T, Asakawa H, Okahashi N, et al. Effect of subculturing of expression of a cell surface protein antigen by S. mutans. J Gen Microbiol, 1989; 135 : 3199
- 8 Crowley PJ, Brady LJ, Piacentini DA, et al. Identification of a salivary (agglutinin-binding) domain within cell surface adhesin P1 of S. mutans. Infect Immun, 1993; 61(4) : 1547
- 9 Hajshenglis G, Koga T, Russell MW. Affinity and specificity of the interactions between S. mutans antigen I / I and salivary components. J Dent Res, 1994; 73 : 1493

(1995-01-21 收稿, 1995-03-17 修回)

Study on the Human Salivary Acceptors of Streptococcus mutans MT₆R Surface Adhesin P1

Huang Dingming, Luo Zonglian, Zhou Xuedong

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Yang Jiyu

College of Pharmacology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The human parotid saliva was separated by anionic polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and seven bands of salivary proteins named B₁ ~ B₇ were purified, in order to find out the acceptors of Streptococcus mutans MT₆R (serotype c) adhesin P1, the adhesion of adhesin P1 labelled with ¹³¹I (¹³¹I-P1) to the different pellicles of seven purified salivary proteins were studied. The results showed that the ¹³¹I-P1 selectively adhere to the salivary protein components. The protein B₅ was most effective in promoting attachment of ¹³¹I-P1 (*P* < 0.01) and protein B₅, protein B₆ were less effective than protein B₅, but more effective than the rest proteins (*P* < 0.01). It has been demonstrated that protein B₅ and B₆ were the acidic proline-rich proteins. Therefore, acidic proline-rich proteins may be one of the most important acceptors of S. mutans MT₆R (serotype c) adhesin P1.