

# 高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究 合成细胞外多糖能力的实验研究

黄晓晶 刘天佳 杨锦波 陈舟 刘建国

**摘要** 目的:探讨来自不同龋敏感者的变形链球菌(血清型c)临床分离株合成细胞外多糖的能力。方法:采用红外光谱分析对葡聚糖样本作定性分析,用葱酮法分别定量测定水溶性和水不溶性葡聚糖含量。结果:同一个体所带不同基因型变形链球菌菌株合成细胞外多糖能力具有差异;高龋组个体定植的合成水溶性及水不溶性葡聚糖能力强的菌株所占比例显著高于无龋组。结论:高龋组变形链球菌(血清型c)临床菌株的高致龋力与其携带有合成细胞外多糖能力强的菌株密切相关。

**关键词** 变形链球菌 龋敏感性 水溶性葡聚糖 水不溶性葡聚糖 致龋性能

## Evaluation of Cariogenic Potential of *Streptococcus mutans* Isolated from Caries-free and -active Persons : Abilities to Synthesize Water-soluble and -insoluble Glucans

Huang Xiaojing, Liu Tianjia, Yang Jinbo, et al

Department of Oral Medicine, College of Stomatology,

West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** In this study, authors investigated abilities of *Streptococcus mutans* (serotype c) strains to synthesize water-soluble and water-insoluble glucans. **Methods:** *Streptococcus mutans* strains were isolated from people with different carious experiences, which were divided into two groups: caries-free (DMFS = 0) group including 19 persons and caries-active group (DMFS ≥ 6) including 40 persons. Totally 105 genotypes of *Streptococcus mutans* strains were obtained, including 22 strains from the caries-free group and 83 strains from the caries-active group. The differences of abilities to synthesize water-soluble and water-insoluble glucans between these two groups were compared in order to find the relationship between the synthesis of glucans and caries experience. Then, *Streptococcus mutans* were cultured in TPY liquid medium containing 1% sucrose in an anaerobic incubator at 37°C for 24 hours. Glucans synthesized by *Streptococcus mutans* was qualified by using infrared spectrophotometry. The amounts of water-soluble and water-insoluble glucans were measured by using the anthron method. **Results:** According to the same absorption tops position analysed by infrared spectrophotometry, glucans samples were certified. The amounts of glucans synthesized by *Streptococcus mutans* strains were different between strains of different genotypes even isolated from the same person. Mostly, the amount of water-insoluble glucans was higher than that of water-soluble glucans between different genotype *Streptococcus mutans* strains. The oral environments of patients in the caries-active group harbored more *Streptococcus mutans* strains with higher water-soluble glucans producing ability than those of the caries-free group did ( $P < 0.05$ ), and patients of the caries-active group also harbored more *Streptococcus mutans* strains with higher water-insoluble glucans producing ability than those of the caries-free group did ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Glucosyltransferases of different genotype strains are different in glucans production, and different genotype strains relate to different cariogenic abilities. Glucans was one of cariogenic factors, and water-insoluble glucans was more important than water-soluble glucans in cariogenic ability of *Streptococcus mutans*. The differences in glucans production of isolated strains might relate to differences in carious experiences.

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院(黄晓晶现在福建医科大学附属口腔医院,刘建国现在遵义医学院)

**Key words:** *S. mutans* caries experience cariogenicity water-soluble glucans water-insoluble glucans

在致龋活动中,变形链球菌 (*Streptococcus mutans*,简称变链)通过合成细胞外多糖发挥重要作用。细胞外多糖,尤其是水不溶性葡聚糖,可高度促进变链在牙面的不可逆性粘附和集聚<sup>1</sup>。变链能产生两种胞外糖基转移酶,即葡糖基转移酶(glucan transforase, GTF)和果糖基转移酶(fructan transforase, FTF)<sup>2,3</sup>。GTF是变链自发合成的固有酶,可特异性地利用蔗糖合成葡聚糖<sup>4</sup>。本实验旨在比较高龋组和无龋组变链临床分离株在体外利用蔗糖合成水溶性、水不溶性葡聚糖的能力。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验菌株

选取本实验室从19例无龋者和40例高龋患者自行分离、鉴定的105株不同基因型变链(血清型c)临床分离株,其中83株源自高龋组(DMFT=6),22株来自无龋组(DMFT=0)。

#### 1.2 方法<sup>5</sup>

##### 1.2.1 合成细胞外多糖定量检测实验

各变链(血清型c)临床分离株常规复苏,挑取单菌落接种于TPY液体培养基,厌氧培养24h,3000 r/min离心15 min,弃上清,细菌沉淀物用无菌生理盐水稀释,于紫外分光光度计540 nm处制备成吸光度ABS=1.0的菌悬液备用。

取制备好的各变链菌悬液,按菌液与含1%蔗糖的TPY液体培养基1:10(v/v)比例接种细菌,37℃厌氧培养24h,培养液3000 r/min离心20 min,收集上清液,细菌沉淀物用5 ml蒸馏水洗涤,再离心2次,合并3次上清液;水洗后的细菌加入0.5 mol/L NaOH洗涤、离心3次,合并上清液。两部分上清液各取适量,分别加入3倍体积无水乙醇,4℃冰箱放置过夜,离心,弃水相,沉淀分别加入5 ml蒸馏水及5 ml 0.1 mol/L NaOH溶液溶解,用蒽酮法<sup>6</sup>分别测定水溶性及水不溶性葡聚糖含量,每个样品一式3份。

##### 1.2.2 葡聚糖样品的定性鉴定

将葡聚糖样品与葡聚糖标准品同时作红外光谱分析,比较二者主要基团吸收峰的位置,判断二者是否为相同物质。

### 2 结果

#### 2.1 定性实验

葡聚糖样品经红外光谱分析,主要基团吸收峰的位置与葡聚糖标准品基本一致,可判断二者为相同物质。

#### 2.2 定量检测

研究发现变链(血清型c)基因型不同,合成水

溶性和水不溶性葡聚糖的能力不同。其中,水不溶性葡聚糖的合成能力又普遍强于水溶性葡聚糖(表1)。表中未列出的无龋组其余个体,每人仅携带1种AP-PCR基因类型,未列出的高龋组其余个体菌株合成细胞外多糖的情况与表中所列类似。

表1 变形链球菌(血清型c)临床分离株合成葡聚糖的情况( $\bar{x} \pm s$ , mg/ml)

组别	受试者编号	菌株号	AP-PCR基因类型	水溶性葡聚糖合成量	水不溶性葡聚糖合成量
无龋组	4	402	4	0.104 ± 0.032	0.278 ± 0.005
		403	5	0.127 ± 0.017	0.243 ± 0.032
	9	902	11	0.256 ± 0.014	0.166 ± 0.016
		904	10	0.156 ± 0.025	0.120 ± 0.006
	19	1902	21	0.158 ± 0.050	0.113 ± 0.011
		1904	22	0.105 ± 0.010	0.278 ± 0.005
高龋组	25	2503	33	0.526 ± 0.040 *	0.595 ± 0.020 *
		2504	34	0.261 ± 0.011	0.477 ± 0.019 *
	52	5201	87	0.346 ± 0.063 *	0.482 ± 0.044 *
		5202	88	0.167 ± 0.028	1.207 ± 0.015 *
	5205	89	0.352 ± 0.006 *	0.329 ± 0.024 *	

\* 表示高合成能力菌株,合成量 > 0.3

高龋组个体定植的合成水不溶性及水溶性葡聚糖能力强的菌株所占比例显著高于无龋组(分别为  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) (图1, 2)。

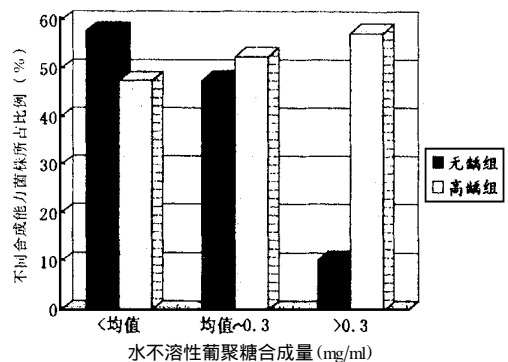


图1 水不溶性葡聚糖不同合成能力变形链球菌菌株在高龋和无龋人群中的分布

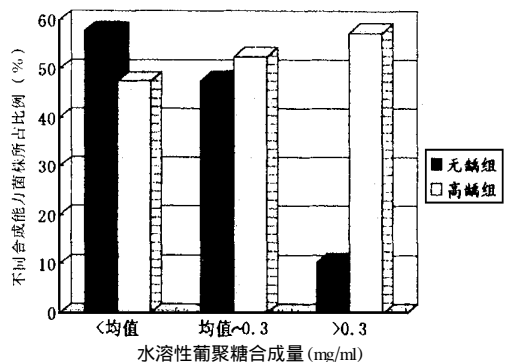


图2 水溶性葡聚糖不同合成能力的变形链球菌菌株在高龋和无龋人群中的分布

### 3 讨 论

变链具有 3 种 GIFs,即主要合成水不溶性葡聚糖的 GfB (GIF<sup>-</sup>) 和 GfC (GIF-SI),及只合成水溶性葡聚糖的 GfD (GIF-S)。不同血清型变链产生的 GIF 在结构、性质上都存在差异。各种血清型中,c 型合成的水溶性葡聚糖较多<sup>1</sup>。有关参考菌株 GIF 基因 *gff* 的表现型已有许多研究,而对变链临床株的 GIFs 产物及其临床意义却研究甚少。本研究立足于变链临床株,通过 GIFs 产物(水溶性及水不溶性葡聚糖)的合成情况间接反映 GIFs 的合成能力。

研究探讨不同基因型变链(血清型 c)临床株 GIFs 产物的合成情况,发现变链基因型不同,合成水溶性和水不溶性葡聚糖的能力不同,提示变链基因型的不同可能与其毒性密切相关。研究还发现,高龋组同一个体常有几种 GIFs 合成能力不同的变链菌株同时定植,其中有 1~2 株高合成能力的菌株存在。提示几种 GIFs 合成能力不同的变链菌株同时定植可能也具有某种临床意义。

同时发现高龋组个体定植的合成水溶性及水不溶性葡聚糖能力强的菌株所占比例显著高于无龋组 ( $P < 0.05$ )。说明 GIFs 的合成能力是变链致龋的重要毒力因子之一。其中,水不溶性葡聚糖的合成能力又强于水溶性葡聚糖。考虑到本实验菌株均分离自光滑面龋,提示水不溶性葡聚糖在光滑面龋的发生中占有重要地位。与其它口腔链球菌相比,只有变形链球菌群细菌能在蔗糖存在的情况下聚集于光滑表面,而这一特性有赖于从蔗糖合成水不溶性葡聚糖的能力。这一结果也与前人的研

究相符:Munro 等<sup>6</sup>的研究表明,在鼠龋模型中,缺乏编码合成水不溶性葡聚糖的基因缺陷株与母代菌株相比,致光滑面龋的能力显著下降。由于高龋组个体定植的合成水溶性葡聚糖能力强的菌株所占比例也显著高于无龋组,故也不能排除水溶性葡聚糖合成在蔗糖介导的聚集中的作用。

本研究发现高龋组个体通常携带有 GIFs 合成能力高的菌株,GIFs 合成能力的不同可能是导致菌株致龋性能差异的原因之一。

### 参考文献

- 1 Tsumori H, Kuramitsu H. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GfC enzyme. *Oral Microbiol Immun*, 1997, 12(5):274~278
- 2 Fujiwara T, Terao Y, Hoshino T, et al. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 161(2):331~335
- 3 Alaluusua S, Gronroos L, Zhu X, et al. Production of glucosyltransferases by clinical *mutans streptococcal* isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. *Archs Oral Biol*, 1997, 42(6):417~422
- 4 Chia JS, Yang CS, Chen JY. Functional analysis of a conserved region in glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*, 1998, 66(10):4797~4803
- 5 刘琪,罗宗莲,杨继虞.变形链球菌遗传型和型利用不同糖类合成葡聚糖的研究. *口腔医学纵横*, 1996, 12(1):15~16
- 6 Munro C, Michalek SM, Macrina HL. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. *Infect Immun*, 1991, 59(5):2316~2323

(2000-08-28 收稿)

(本文编辑 刘怡)

### 唇腭裂综合序列治疗和病理语音学习班通知

上海第二医科大学口腔医学院和上海第二医科大学唇腭裂治疗研究中心承办的唇腭裂综合序列治疗和病理语音学习班(国家级继续教育项目)将于 2001 年 5 月下旬至 6 月上旬举办,为期 8 天。上课内容:唇腭裂手术治疗进展;病理语音学基础;唇腭裂患者语音特点及其治疗;唇腭裂患儿系列正畸治疗和正颌外科治疗;唇腭裂患者听力和心理问题等方面内容。课程由长期从事以上课题研究并获各级科技奖励的教授及研究人员主讲。本学习班注重理论联系实际,并进行实验室和手术示教,内容丰富,形式多样,欢迎参加。招生对象:主治医师以上职称者。学习结束授予国家继续教育学分 19 分,并颁发证书。参加者每人需交纳学习费 1000 元,食宿统一安排,费用自理。

有意参加者请于 2001 年 3 月 31 日前来函。来函请寄上海市制造局路 639 号,上海第二医科大学附属第九人民医院口腔颌面外科刘浩清女士收。邮政编码:200011;联系电话:(021) 63138341 转 5338;传真:(021) 63136856。收到回执单后将另发正式通知,告之详细讲课时间地点和其它未尽事宜。

上海第二医科大学唇腭裂治疗研究中心