

# 应激状态下的变异链球菌差异蛋白组学

黄萍 万呼春 何永红

口腔疾病研究国家重点实验室 华西口腔医院(四川大学) 成都 610041

**[摘要]** 当外界生存环境发生变化时,变异链球菌可在短时间内通过诱导或抑制某些蛋白质表达而改变自身蛋白质的表达谱,使其能够在极端环境中存活。在pH5.5和有氧环境下,变异链球菌的蛋白质表达变化迅速且复杂,或上调或下降。细菌胞外的高渗透压可使变异链球菌通过激活或灭活特异性的酶和转运蛋白以及改变基因表达谱来调整其生理机能,在高渗透压环境下培养,变异链球菌的蛋白质点或上调或下降。充足的营养对变异链球菌的生长非常重要,为适应营养缺乏的生存环境,变异链球菌的细胞大小和脂肪酸组成会发生改变,其总的蛋白质合成率也会下降。在环境温度变化的应激状态下,变异链球菌细胞内会产生变性或异常的蛋白质,所产生的热休克蛋白可使蛋白质肽链重新折叠,恢复蛋白质原来的构象及原有的功能,其蛋白质或上调或下调。在某些中草药提取物存在的情况下,变异链球菌的蛋白质表达明显下调。应用蛋白组学技术,可以发现不同应激状态下变异链球菌的蛋白质表达图谱的改变,这可以揭示变异链球菌致龋的机制,从而为龋病的防治提供科学依据。

**[关键词]** 变异链球菌; 蛋白组学; 应激反应

**[中图分类号]** Q 51 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2014.01.021

**Differential proteomics of *Streptococcus mutans* under stress condition** Huang Ping, Wan Huchun, He Yonghong. (State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** When external environment changes, *Streptococcus mutans*(*S.mutans*) can change its protein expression profile through induction or inhibition of some protein expressions to ensure survival in extreme environments. Under pH 5.5 and aerobic condition, the protein expression of *S.mutans* changes rapidly in a complicated manner by increasing or decreasing. The extracellular high osmotic pressure of bacteria can induce *S.mutans* to adjust its physiological function by activating or inactivating some special enzymes and transport proteins and changing the gene expression profile. When cultivated under high osmotic pressure, protein points of *S.mutans* may be increased or reduced. Adequate nutrition is very important for the growth of *S.mutans*. To adapt to lack of nutrition, cell size and composition of *S.mutans* fatty acid change with decrease in total synthesis rate of proteins. When environment temperature changes, the cells will produce denatured or abnormal proteins with increased or reduced expressions. The heat shock protein produced can induce protein peptides to refold; it can also restore the original conformation and function of proteins. Some Chinese herbal medicine extracts can significantly reduce the protein expression of *S.mutans*. With the application of proteomics techniques, changes in *S.mutans* protein expression pattern can be found under different stress states. These techniques reveal information on the mechanism of *S.mutans* to caries and provide a scientific basis for prevention and control of caries.

**[Key words]** *Streptococcus mutans*; proteomics; stress response

在黏附于口腔牙体硬组织表面的菌斑生物膜中,变异链球菌以其较强的黏附、产酸和耐酸能力在龋病的发生发展中起着重要的作用<sup>[1]</sup>,是菌斑

中的主要致龋菌之一<sup>[2]</sup>。大多数疾病均是由毒素或者蛋白质水解酶引起的组织损伤,而龋病的病理因素几乎只与菌斑中细菌的代谢有关。细菌分解食物和唾液中的营养物质产生的酸和活性氧以及口腔内的其他压力因子,可对细菌的生物大分子造成损伤,因此致龋菌对环境压力的耐受与其致

**[收稿日期]** 2013-04-24; **[修回日期]** 2013-08-12

**[作者简介]** 黄萍, 硕士, Email: 407546541@qq.com

**[通讯作者]** 何永红, 副教授, 博士, Email: 577305172@qq.com

病能力密切相关<sup>[3]</sup>。

当外界生存环境发生变化时,细菌将在短时间内产生应激反应,可通过诱导或抑制某些蛋白质表达改变整个蛋白质的表达谱,使细菌能够在极端环境中存活<sup>[4-5]</sup>。对细菌应激反应进行研究,旨在寻找在压力条件下变化和发挥关键性作用的蛋白质,阐明应激反应的分子调节机制。

在应激状态下,细菌蛋白质的表达变化主要分为以下3类<sup>[6]</sup>。1) 普遍应激性蛋白质:主要是一些与DNA或蛋白质的修复有关的蛋白质,譬如分子伴侣DnaK、GroEL和GroES等,这类蛋白质的表达量在任何应激状态下都会发生变化,与应激种类没有特异性的联系;2) 应激特异性蛋白质:这类蛋白质表达只在某一种应激状态下才发生改变,与应激种类有特异性的联系;3) 在二种及其以上特定应激状态下发生改变的蛋白质,如一些与糖酵解途径相关的蛋白质。

Len等<sup>[7]</sup>用恒化器连续培养变异链球菌LT11,模拟变异链球菌在健康者口腔牙菌斑中的生存状态,对在该环境下生长的变异链球菌的胞内和胞外可溶性蛋白质进行研究。他们通过双向电泳技术分离的可溶性蛋白质,经过胰酶消化后经质谱分析得到421个蛋白质点。质谱分析显示,这些蛋白质与变异链球菌UA159基因组重叠群演绎出的200个不同的开放阅读框(open reading frame, ORF)的翻译产物匹配,约占该种细菌总ORF的11%。在所鉴定的蛋白质中,172个是胞内蛋白质,28个是胞外蛋白质,只有1个是膜固有蛋白质。该研究建立了一个比较全面的变异链球菌蛋白质组参考图谱。由于该图谱的建立基于标准化的连续培养,因此,它为将来比较分析与变异链球菌发病机制有关的模拟环境下所获得的蛋白质图谱提供了可能。

变异链球菌的应激反应主要由其生长环境中的酸碱度、氧分压、渗透压、营养物质和药物等因素引起。

## 1 酸应激

受宿主间歇性进食的影响,随着糖类的摄入,口腔内牙菌斑的pH值可以在20 min内从pH7.0迅速降到pH3.0以下,使定植于牙菌斑中的微生物经历着迅速的动态的pH变化,变异链球菌能在这种致死性的酸性环境下继续生存,对其致病性非

常重要<sup>[8]</sup>。

Hamilton等<sup>[9]</sup>在将对数生长期的变异链球菌LT11迅速从pH7.5转移至pH5.5的培养基中培养2 h后对其蛋白质表达进行分析发现,在这2 h内,变异链球菌的蛋白质表达变化迅速且复杂,共有36种酸调节蛋白质的表达上调,其中只有3种蛋白质的表达持续增强,其他34种蛋白质的表达都具有时间性,有25种蛋白质在最开始的30 min内表达增强。在表达增强的蛋白质中,根据其相对分子质量推测有热休克蛋白质(heat shock protein, HSP),膜结合质子转移腺苷三磷酸酶的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基,属于赖氨酸(lysine, Lys) R家族的DNA结合和激活蛋白质。膜结合质子转移腺苷三磷酸酶位于口腔链球菌细胞膜表面,细菌通过其排出胞内的氢离子以维持胞内质子平衡。显然,变异链球菌能在低pH环境中存活,不仅与诱导产生的酸调节蛋白的总数有关,还与可增强细菌胞内pH稳定的关键蛋白质的合成有关<sup>[10]</sup>。

有人将变异链球菌H7从pH7.5转移至pH5.5的培养基中培养2 h后,共有64个蛋白质点表达上调,49个蛋白质点表达下调,其中有25种为酸特异性应激蛋白。

Wilkins等<sup>[11]</sup>于pH7.0和pH5.2两种环境下培养变异链球菌UA159并提取其可溶性蛋白质,在对这两种环境中变异链球菌的蛋白质表达差异进行的研究中发现,95%以上的蛋白质点都集中于pH4~7范围内,两种环境条件下所培养的变异链球菌的蛋白质表达点总数分别为188和163个。在低pH条件下,蛋白质表达量变化在1.5倍及以上的有30种,包括分子伴侣、细胞分裂蛋白、烯醇化酶、果糖二磷酸醛缩酶和超氧化物歧化酶等18种蛋白质表达的上调;另有包括蛋白翻译延伸因子G、Tu和Ts,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组成成分等12种蛋白质表达下降。该研究还发现,变异链球菌的许多蛋白质都有同系物,如烯醇酶等。在不同的环境下,这些蛋白质同系物表达的种类及其丰度是不相同的。

Len等<sup>[12]</sup>在研究变异链球菌LT11在酸性环境中的生存和增殖能力时发现:变异链球菌在pH5.0的条件下培养后,共有199个蛋白质点表达发生改变;在167个蛋白质点中,61个蛋白质点与DNA复制、转录和翻译以及蛋白质的折叠和降解的过程有关。这61个蛋白质点属于30种蛋白质的亚基或

分解产物,有25种蛋白质在pH5.0时表达上调或特异性表达。这其中有5种蛋白质是在变异链球菌的酸应激中被鉴定出来的,其中包括单链结合蛋白(single-stranded binding protein, SSB)、糖皮质激素效应元件(glucocorticoid response element, GRE)A,多核苷酸磷酸化酶(polynucleotide phosphorylase, Pnp)A和2种蛋白水解酶酪蛋白裂解酶(caseinolytic protease, Clp)L和肽酶(peptidase, Pep)D。重组基因(recombination, Rec)A和SSB在同源DNA的重组以及染色体复制过程相关的DNA重组和修复中是不可或缺的。SSB为酸应激下产生的特异性蛋白质。RecA为DNA重组酶,在pH5.0的环境下,其表达量上调了6.8倍。转录延长因子GREA的两种亚型分别提高了7.5和5.1倍,GREA中的一种亚型只在胞外环境为pH5.0时特异性表达。与RNA降解有关的多核苷酸磷酸化酶PnpA的两种亚型上调了至少3.1倍。不能被分子伴侣折叠的蛋白质降解与Clp家族中具有腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)依赖性的蛋白酶有关,在环境pH5.0时,该家族蛋白质中与ATP结合的亚基只有ClpL表达,其表达量上调,这提示ClpL在酸耐受中发挥着重要的作用。

在Len等<sup>[13]</sup>的进一步研究中,变异链球菌LT11在pH5.0环境下有155个蛋白质点的表达上调1.5倍以上,对其中的123种蛋白质进行鉴定后发现,其中的70种蛋白质与代谢途径有关,而大多数蛋白质与糖分解、酸代谢产物的转变以及支链氨基酸的生成有关。在葡萄糖转运的透性酶系统中发挥重要作用的葡萄糖激酶上调2.1倍。与葡萄糖分解有关的葡萄糖-6-磷酸异构酶上调了2倍,果糖-1,6-二磷酸醛缩酶三种异构体的总表达量上调了1.5倍。在糖酵解途径中,有三种酶类参与到3-磷酸甘油醛向丙酮酸转化的过程中,与此过程相关的三种酶类在pH5.0条件下的表达均有改变。被检测到的两种磷酸甘油酸变位酶(phosphoglyceromutase),一种(PmgY)上调2.7倍,另一种(Pgm)不表达;丙酮酸激酶4个亚型的表达分别上调2.4、7.1、2.3和7.8倍;烯醇酶表达下调。参与氧化还原反应的L-乳酸脱氢酶的2个亚型表达分别上调2.5和1.7倍,乙酸激酶的表达下调2.1倍,磷酸转乙酰酶的表达上调1.7倍。研究还发现,部分与支链氨基酸生物合成有关的蛋白质表达上调,如支链氨基酸氨基转移酶和谷氨酰胺合成酶分别上调2.7和8.7倍。

## 2 氧化应激

变异链球菌属兼性厌氧菌,其对生存环境中氧分压的耐受性对其生存和致病能力也是非常重要<sup>[14]</sup>。氧自由基对变异链球菌细胞膜表面的生物合成以及毒力因子的表达和定位有深刻的影响,严重损伤细菌形成牙菌斑的能力,可能与细菌胞外多糖的代谢,细菌与牙体表面或细菌与细菌之间黏附的改变有关<sup>[15]</sup>。

有研究者将变异链球菌H7分别在不含过氧化氢和含 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢的培养基中培养2 h,结果在所提取分离出的510个细菌可溶性蛋白质点中,有69个蛋白质点因过氧化氢的作用表达上调,其中15个为氧化特异性应激蛋白;有24个表达下调,表达下调达5倍以上者有3个,其中2个为氧化特异性应激蛋白。这些蛋白质的结构和功能等还有待进一步研究。

有学者<sup>[16]</sup>从基因水平研究氧压力对变异链球菌影响的结果显示:在有氧环境下,表达上调的基因有83种,上调幅度最大的包括细菌自溶相关基因,编码细菌素、丙酮酸脱氢酶、三羧酸循环相关酶类以及部分糖类的转运和分解代谢相关的蛋白质基因;下调的基因有23种,如合成水溶性葡聚糖的葡糖基转移酶gtfB表达下调3.3倍。

## 3 渗透压应激

宿主进食后可使牙菌斑内营养物质的质量分数升高,其中的微生物代谢产酸使釉质表面矿物质,主要是钙盐溶解进入菌斑液中。有研究<sup>[17]</sup>显示在摄入蔗糖后,菌斑液中的离子强度可升高为原来的2倍左右,离子强度的变化使细菌生存环境的渗透压改变。细菌胞外渗透压改变可引起水沿渗透压梯度流动,低渗性外界环境可导致细胞膨胀甚至胀裂,高渗性外环境则会导致细胞的胞质皱缩和脱水。

胞外的高渗透压可使细菌通过激活或灭活特异性的酶和转运蛋白及改变基因表达谱来调整其生理机能,以维持胞内水平衡<sup>[18-19]</sup>。研究显示,变异链球菌H7在含 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基中培养2 h后,共分离出443个蛋白质点:表达量上调的蛋白质有52个,其中10个为渗透压特异性应激蛋白;下调的有47个,其中5个为渗透压特异性应

激蛋白。

细菌主要通过2种途径来应对外界的高渗透压：增加胞内钾离子浓度和积聚相容性溶质。变异链球菌UA159基因组中的渗透压相关基因，有3个与大肠埃希菌的基因*trkA*、*trkB*和*trkH*有着同源性，它们参与编码钾离子运载体；同时，在变异链球菌基因组中也发现了与转运相容性溶质相关的腺苷三磷酸结合盒转运蛋白（adenosine triphosphate（ATP）-binding cassette transporter, ABC）的Opu家族有着同源性的ORF。有人将变异链球菌UA159在含0.4 mol·L<sup>-1</sup>氯化钠的培养基中培养60 min后发现，高渗透压可以诱导*opcA*、*opuAA*和*Smu.2115*基因表达，抗氧化基因*sodA*和*nox*的表达上调。*opcA*编码的蛋白质与无乳链球菌和单增李斯特菌的转运季胺化合物的ABC转运蛋白的元件OpuCA有72%和62%的相似性。*opuAA*基因编码的蛋白质与化脓性链球菌和乳酸杆菌的转运季胺化合物的ABC转运蛋白的ATP结合部分有82%和66%的相似性。*opcA*和*opuAA*基因在高渗环境下被诱导表达，即变异链球菌从外界摄入并积聚相容性溶质对抵抗高渗透压有很重要的作用。

#### 4 营养物质

充足的营养对细菌的生长非常重要，当缺乏营养物质的供应时，菌细胞内的代谢活动会迅速减慢直至休眠<sup>[20]</sup>。细菌为适应营养缺乏的环境会伴随其细胞大小和脂肪酸组成的改变，总的蛋白质合成率下降。对于非芽孢细菌而言，当营养供应缺乏时，其胞内大量的RNA和某些蛋白质迅速发生降解，同时合成另一些新的蛋白质，以使细菌能长时间在这种环境下生存。

研究显示，变异链球菌H7在基础培养基稀释5/6的条件下培养2 h后，共分离出510个蛋白质点：表达上调的有58个，其中有11为饥饿特异性应激蛋白，在13个上调量达5倍以上的蛋白质点中只有1个为饥饿特异性应激蛋白；下调的有20个，其中下调量达5倍以上的只有1个，且这个蛋白质为饥饿特异性应激蛋白。

#### 5 温度应激

感受和抵御环境温度变化的冷热休克系统，是细菌最重要的全局调控系统。HSP是细胞在受

到外部高温刺激时明显表达的一种应激蛋白，其中包括HSP90、HSP70和HSP60以及小相对分子量HSP。HSP70和HSP60主要参与蛋白质的折叠和解折叠，HSP90则为细胞内许多功能蛋白的结合蛋白。在应激状态下，细胞内会产生变性或异常的蛋白质，同时产生的HSP可使蛋白质肽链重新折叠，恢复蛋白质原来的构象及原有的功能<sup>[21]</sup>。

研究发现，变异链球菌H7在42℃条件下培养后，共分离出573个蛋白点：表达上调的蛋白质有40个，其中6个高温特异性应激蛋白中有4个上调5倍以上；下调的有56个，有8个下调5/6以上，其中有5个为高温特异性应激蛋白。

#### 6 药物应激

中草药等提取物在抗龋方面的应用近年来也备受关注<sup>[22]</sup>。Brighenti等<sup>[23]</sup>发现，草莓蕃石榴叶在含提取物原液1.6%的体积分数下即可明显地抑制变异链球菌的产酸能力，同时蛋白质的表达也发生了明显的变化。他们将变异链球菌在含草莓蕃石榴叶的提取物原液1.6%体积分数的培养基中培养2 h后与对照组比较发现，683个蛋白质点中共有24个蛋白质点的表达发生了下调，而无一个上调。24个下调的蛋白质点中有2个蛋白质点因丰度太低不能被考马斯亮蓝染色所识别，有22个可以用质谱鉴定，它们主要是与翻译以及糖类、氨基酸、核苷酸和类脂的代谢等相关的蛋白质。其中在RNA和蛋白质合成中不可或缺的蛋白质的表达丰度明显下降。在糖类代谢过程中，有7种蛋白质表达下调，其中有5种是变异链球菌产生乳酸和糖酵解的关键酶，这些酶与龋的发生发展相关。

牙菌斑是由多菌种而非单一菌种组成的生物膜，相对于单一菌种的生物膜，变异链球菌在多菌种生物膜中抵抗抗生素和酸刺激的能力会增强。Luppens等<sup>[24]</sup>发现，当变异链球菌与非致龋菌韦荣球菌共存于同一生物膜中时，编码变异链球菌蛋白质的一些基因表达发生了变化，转录明显上调的有15种基因，明显下调的有19种基因，主要包括参与嘌呤代谢、氨基酸、胞内多糖和蛋白质合成等过程的蛋白质。

应用蛋白组学技术，可以发现在不同应激状态下变异链球菌的蛋白质表达图谱的改变。对表达变化的蛋白质进一步的研究可揭示变异链球菌致龋的机制，从而为龋病的防治提供科学依据。

## 7 参考文献

- [1] Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*[J]. Front Biosci, 2004, 9:1267-1277.
- [2] Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay[J]. Microbiol Rev, 1986, 50(4):353-380.
- [3] Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 11):3247-3255.
- [4] 朱力, 王恒裸, 黄培堂. 蛋白质组学在细菌应激反应研究的应用[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3):511-514.
- [5] 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.
- [6] Champomier-Vergès MC, Maguin E, Mistou MY, et al. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 771(1/2): 329-342.
- [7] Len AC, Cordwell SJ, Harty DW, et al. Cellular and extracellular proteome analysis of *Streptococcus mutans* grown in a chemostat[J]. Proteomics, 2003, 3(5):627-646.
- [8] Matsui R, Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*[J]. Future Microbiol, 2010, 5(3):403-417.
- [9] Hamilton IR, Svensäter G. Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacteria during acid shock[J]. Oral Microbiol Immunol, 1998, 13(5):292-300.
- [10] Sheng J, Marquis RE. Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism and with ATP synthase activity[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 262(1): 93-98.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Len AC, Harty DW, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 5): 1353-1366.
- [14] 姜颖, 刘天佳, 杨锦波. 变形链球菌抗氧化相关基因的研究进展[J]. 国外医学·口腔医学分册, 2005, 32(3):193-195.
- [15] Ahn SJ, Burne RA. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2007, 189(17):6293-6302.
- [16] Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*[J]. J Bacteriol, 2007, 189(23):8519-8527.
- [17] Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses[J]. Curr Issues Mol Biol, 2005, 7(1):95-107.
- [18] Abranches J, Lemos JA, Burne RA. Osmotic stress responses of *Streptococcus mutans* UA159[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 255(2):240-246.
- [19] Poolman B, Blount P, Folgering JH, et al. How do membrane proteins sense water stress[J]. Mol Microbiol, 2002, 44(4):889-902.
- [20] Cunningham AB, Sharp RR, Caccavo F Jr, et al. Effects of starvation on bacterial transport through porous media. Advan Water Res, 2007, 30(6/7): 1583-1592.
- [21] 尚进才, 王亚洲, 高岩, 等. 热休克蛋白的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2010, 23(5):527-529.
- [22] 陈宏, 张秀华. 中草药抑制口腔常见菌的实验研究进展[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(17):3085-3087.
- [23] Brighenti FL, Luppens SB, Delbem AC, et al. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production[J]. Caries Res, 2008, 42(2):148-154.
- [24] Luppens SB, Kara D, Bandounas L, et al. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm[J]. Oral Microbiol Immunol, 2008, 23(3):183-189.

(本文采编 王晴)