

变异链球菌耐氟菌株的研究进展

吴也可综述 胡涛审校

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 成都 610041)

[摘要] 氟化物作为防龋制剂, 其广泛应用可能导致变异链球菌耐氟菌株的产生。为了解变异链球菌耐氟菌株致龋毒力的变化, 学者们对其超微结构、黏附力、耐酸性、产酸性及脱矿能力等致龋相关特性进行了研究, 并对耐氟菌株的致龋相关基因和其他分子生物学改变予以深入的研究和探讨。本文就此作一综述。

[关键词] 变异链球菌; 耐氟菌株; 致龋性; 致龋相关基因

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.03.017

Research progress on fluoride-resistant strains of *Streptococcus mutans* Wu Yeke, Hu Tao. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] As a caries-preventive agent, fluoride could probably lead to fluoride-resistant strains of *Streptococcus mutans*(*S.mutans*) with its wide application in the daily life. In order to understand the cariogenic changes in virulence of the fluoride-resistant strains of *S.mutans*, scholars conducted various studies concerning their ultrastructure, adhesion, acid resistance, acid production and demineralization ability, as well as cariogenic related genes and other molecular biological characteristics. This article was committed to review the research progress in recent years.

[Key words] *Streptococcus mutans*; fluoride-resistant strain; cariogenic capacity; cariogenic related genes

氟化物被用作防龋剂已有很长的历史, 1933 年就有学者注意到在斑釉流行地区, 龋患率较低。目前, 氟化物的防龋效果已被世人所公认, 其作用包括对羟磷灰石溶解度的作用, 对硬组织脱矿和再矿化的动力学作用^[1]以及对致龋菌的抑制作用^[2]。但是, 随着近年来为提高并维持菌斑内较高氟水平而在局部高频、高浓度、长时间应用氟化物^[3], 导致耐氟菌株的选择性生长^[4], 而耐氟菌株的出现, 将严重影响氟化物的防龋效果。

研究耐氟菌株可以前瞻性地了解变异链球菌耐氟突变后致龋毒力的变化, 为临床上合理应用氟化物及寻找新的防龋药物提供有力的实验依据。近年来, 耐氟菌株的形态结构、生物学行为和基因组学等内容也已成为研究热点。

1 变异链球菌耐氟菌株的发现和界定

变异链球菌是人类牙菌斑中检出率最高、致龋力最强的致病菌。1983 年, Brown 等^[2]在肿瘤放

疗后每日应用 1% 的 NaF 凝胶预防猛性龋的患者口腔中分离出可耐受 $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌株后, 而后又相继有学者在类似情形和口腔干燥症患者口腔中分离出变异链球菌耐氟菌株^[5]。但是根据目前掌握的关于细菌遗传和变异的情况, 可知变异链球菌耐氟菌株是在接触氟化物前就已存在, 并不是氟化物诱导使敏感菌逐渐适应于氟化物而变为耐氟株, 这就提示在正常人口腔中很可能存在耐氟菌株。然而受细菌分离技术所限和其他因素影响, 迄今为止未能从正常人口腔中分离出耐氟菌株^[6]。

氟化物作为应用最广泛的防龋剂, 菌斑中氟化物浓度要达一定水平 ($\geq 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 才能抑制致龋菌的生长, 且变异链球菌自身有一定的耐氟水平。氟耐受可分为表型与基因型 2 种, 前者当细菌离开高氟环境后, 耐氟性消失; 后者在无氟培养基中传代多次, 仍保持其原有耐氟水平^[7], 并且一般发生了致龋性和基因型的改变。而关于基因型耐氟菌株的界定, van Loveren 等^[1]认为细菌可以在高于自身氟耐受水平的氟化物中生存, 而且在无氟培养基中连续传代 20 次, 其耐氟性不消失就称之为耐氟菌株。

[收稿日期] 2011-12-13; **[修回日期]** 2012-01-22

[作者简介] 吴也可(1987—), 男, 四川人, 博士

[通讯作者] 胡涛, Tel: 028-85407723

2 耐氟菌株的诱导

为研究变异链球菌耐氟菌株,早期采用的是体内诱导法,即每天用1%的NaF凝胶预防肿瘤放疗患者发生猛性龋,并在其口腔中分离得到耐氟株。目前,学者们一般采用的是逐步诱导法和直接诱导法在体外使变异链球菌自发产生耐氟突变株,并进行人工选择分离。朱怡玲等^[8]采用将细菌接种至含有梯度增加NaF质量浓度(NaF质量浓度为0~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,以50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 递增)的胰酪大豆琼脂(trypcasein soy agar, TSA)培养基中的方法,诱导变异链球菌Ingbritt菌株成为耐氟菌株。

殷晓萍等^[9]认为,对某一给定的基因来说,细菌的自发突变频率大约是 $10^{-10}\sim 10^{-6}$,逐步诱导法和直接诱导法的分离频率均符合自发突变的频率,故取变异链球菌Ingbritt菌液直接涂布于含1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF的TSA(pH=7.2)上培养后诱导产生耐氟株,虽然其分离频率明显低于逐步诱导法,但2种方法分离获得耐氟株的形态、培养特性、生化反应、传代时间和最大耐氟水平均无统计学差异,而且直接诱导法更接近体内突变株自发产生的过程,其分离频率更能体现体内自发突变的频率,更具参考价值。

3 耐氟菌株的超微结构

氟化物不仅可抑制细菌生长、产酸等活动,还可对细菌的胞壁成分及其他结构组成造成影响,从而改变细菌的生理生化特性^[10]。变异链球菌胞壁主要含有多糖、肽聚糖、表面蛋白和脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)。其中,胞壁多糖决定变异链球菌群的抗原特性,表面蛋白与细菌和牙面黏附有关。氟化物可加速链球菌胞壁肽聚糖的转换^[11]。肽聚糖转换为革兰阳性细菌胞壁合成所必需,但过度转换可导致有活跃自溶系统细菌的细胞裂解。氟化物还可抑制胞壁大分子,LTA的合成。Leshner等^[12]发现,1~2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟可抑制变异链球菌利用甘油生成LTA,使LTA生成减少,胞膜稳定性下降。

盛江筠等^[13]将变异链球菌分为正常对照组、加氟孵育组和耐氟菌株组3组,用透射电镜分别观察3组细菌的超微结构,发现正常变异链球菌细胞结构清晰,胞壁完整,与细胞质膜结合紧密,菌体电子密度均匀。与氟化物共同孵育后,

个别细胞出现细胞质内电子密度减低区及细胞膜不连续。耐氟菌株形态学改变更为明显,细胞质内出现大面积电子密度降低区,细胞质内容物呈空泡状变性,个别细胞内容物完全消失而呈影子细胞,有的细胞壁甚至发生破裂,内容物外溢。

4 耐氟菌株的致病性

4.1 耐氟菌株的黏附能力

龋病学研究^[14-15]证实,龋病是菌斑在牙面聚集而引起的感染性疾病,而细菌对牙面黏附为其在宿主定居的第一步。变异链球菌的高致龋力与其对牙面高度选择性和高亲和力密切相关。早期的研究发现,变异链球菌耐氟株不仅产酸力不及亲代菌株,其蔗糖依赖性黏附力亦低于亲代株。动物实验显示,变异链球菌C180-2的耐氟菌株C180-2FR在与亲代菌株共同定居至大鼠牙齿表面时,其竞争能力不及亲代变异链球菌。

近年来,Patrich等^[16]在对变异链球菌UA130及其耐氟突变株体外研究中发现,耐氟菌株具有与亲代菌株相同的竞争黏附至唾液包被羟磷灰石珠上的能力。盛江筠等^[17]用同位素标记方法测定变异链球菌亲代及耐氟菌株黏附至唾液包被羟磷灰石表面的黏附量及黏附百分率,并比较两者的黏附能力,也发现二者无统计学差异。以上试验均提示耐氟菌株的产生不会降低变异链球菌的致龋性。

4.2 耐氟菌株的耐酸性和产酸性

糖酵解产酸是变异链球菌致龋毒力的重要环节,在其体内有2个糖酵解系统,一是磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS),为主要的糖酵解途径。当环境中糖过剩、pH值降低时,其作用被抑制,此时糖酵解主要依赖另一转运系统,即质子原动力透性酶转移系统,该系统与菌体内 H^+ -腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP)酶,又叫质子移位膜ATP酶的活性相关,而后者有与菌细胞的耐酸性密切相关。盛江筠等^[18]通过测定并比较变异链球菌耐氟株及其亲代株体内质子移位膜ATP酶的活性,发现耐氟株ATP酶活性增高,并直接导致其耐酸性和致龋潜能的增高。

产酸力的强弱为变异链球菌致龋的重要毒力特征,早期对变异链球菌耐氟菌株的研究发现^[19],变异链球菌耐氟菌株的产酸速度及产酸量皆低于亲代野生株,且无论有无氟化物存在,耐氟菌株

均不能将菌斑 pH 降至 5.5 以下。从而认为变异链球菌耐氟株不可能单独导致牙齿龋坏。研究证实,当氟化物存在时,耐氟株的产酸量大于亲代株;无氟化物存在时,初始 pH \geq 5.5 时其产酸量小于亲代株,pH $<$ 5.5 时则大于亲代株,差异有统计学意义,提示含有混合变异链球菌群体的牙菌斑中,野生菌株可能开始导致菌斑 pH 下降,当 pH 降至 5.5 以下时,耐氟株依其较强的产酸力,继续产酸并脱矿,致使菌斑致龋力增强^[5 20]。

4.3 耐氟菌株摄取葡萄糖的能力

葡萄糖是细菌进行代谢的主要糖类物质,变异链球菌主要是通过葡萄糖的无氧酵解产酸的。Hoelscher 等^[21]认为,氟抑制细菌摄入葡萄糖,是其抑制糖酵解的第一步。变异链球菌摄取糖的能力直接影响其代谢产酸能力。因而具有高摄取糖能力的变链菌产酸力就高,致龋力就强。研究^[22]显示,在氟化物存在时,耐氟菌株糖摄取量大于亲代菌株,认为可能是胞膜上的烯醇化酶发生改变导致氟化物不能有效抑制该酶活性或是变异链球菌耐氟株拥有更强能力的磷酸转移酶系统,使得氟化物不能有效降低变异链球菌耐氟株的糖摄取力。

4.4 耐氟菌株的脱矿能力和致龋性

龋齿是由于菌斑细菌酵解碳水化合物产生酸,酸积累达到一定数量和时间,牙齿中的矿物质发生溶解,钙和磷等无机离子由牙齿中脱出,发生脱矿而开始。研究^[22]显示,变异链球菌的国际参考株 Ingbritt 和实验室临床分离株 SSMU-M1 的亲代菌株和耐氟菌株产生的乳酸量皆可导致釉质片脱矿。在无氟条件下,脱矿量很大,且亲代株脱矿量均大于耐氟株。氟的加入,可减少钙和磷的溶出量。至 0.05 mmol·L⁻¹ 氟离子浓度时,二者脱矿量已无统计学差异。至 0.5 mmol·L⁻¹ 氟离子浓度时,脱矿量有大幅度下降,但仍有部分钙磷溶出,且钙与磷的溶出量基本呈平行关系,此时耐氟株脱矿量明显大于亲代株脱矿量。Eisenberg 等^[19]发现,正常情况下耐氟株脱矿量和致龋率较亲代株低,当 pH 降至 5.5~4.5 时耐氟株超过亲代株。

5 耐氟菌株的分子生物学特性

变异链球菌耐氟菌株之所以致龋力增强,是由于其上述表型的改变,而表型又是由基因型决定的。近年来迅速发展的分子生物学技术为相关

基因的研究带来了很大的推动力,为从基因层面揭示各类细菌分子同源性程度,从分子遗传水平客观地区分不同细菌在系统发生上的亲缘关系和判定、比较菌株间基因型是否存在显著性差异带来了契机。

根据每个生物种都有特定的 G+C 构成比例,而且每种细菌的 G+C 含量比较稳定,不受菌龄及外部环境影响的特点。采用高效液相色谱仪法对 DNA 中 G+C 的含量进行了测定,将各亲代菌株与相应耐氟菌株相比可发现 DNA G+C 构成比明显不同,耐氟株 G+C 构成比大于亲代株 5%,可判定两菌株不属于同一种菌株^[23]。朱怡玲等^[24]利用限制性内切酶对变异链球菌的 DNA 进行切割,经琼脂糖凝胶电泳,获得其独特的特征性“基因组指纹”图谱,经比较发现这些图谱上的带型有所不同,提示耐氟菌株的基因组已发生改变,具有自身的遗传特性。随后,他们又采用任意引物聚合酶链式反应技术,扩增基因组 DNA 片段,通过琼脂糖凝胶电泳显示其特征性条带模式指纹图谱,再次印证上述结论。盛江筠等^[25]又对变异链球菌 Ingbritt 菌株及其耐氟株 Ingbritt-FR 的 ATP 酶基因进行了 DNA 测序,发现耐氟株与其亲代株的核苷酸序列无统计学差别,表明 ATP 酶基因改变不是变异链球菌耐氟突变的机制。也有学者认为,ATP 酶基因的作用可能发生在转录或翻译水平,如 mRNA 的选择性剪接和编辑,氨基酸的改变等,但尚未予以证实,需进一步研究。

作为致龋性的重要组成部分,耐酸性及其相关基因正受到学者们的密切关注。张志民等^[26]发现,耐酸相关基因 ffh 和 sat 操纵子的 satC 基因发生突变。他们又对耐酸相关基因 dgk 进行了检测,发现 dgk 发生了点突变,突变点均位于密码子的第 3 位碱基,均不改变所编码的蛋白,因此属于同义突变。同义突变往往是中性的,但也可能在以下情况影响表型:1)由于某一种 tRNA 非常稀少而造成的密码子偏倚性;2)突变破坏了一个内在的调控元件;3)突变恰好产生了一个隐秘的剪切位点。因此,变异链球菌耐氟菌株耐酸性增强是否与此基因突变有关,还需进一步研究。

6 结束语

纵观近年来对变异链球菌耐氟菌株的研究,已由以前的表型研究进展到了基因型和分子生物学水平的研究,并逐渐摸索出了耐氟株的建立方

法,明晰了研究的方向,确立了耐氟株致龋力比亲代株高,尤其是在高氟和高酸条件下的观点。特别是致龋相关基因的发现,为第3代新型疫苗——核酸疫苗提供了作用靶点,为免疫防龋这种新型有效的龋病预防方式提供了理论基础,对构建防龋疫苗的合适抗原而进行主动免疫将具有重要意义。在不久的将来,随着研究的进一步深入和系统化,变异链球菌耐氟株的研究必将取得突破性进展,为人类龋病的防治带来曙光。

7 参考文献

- [1] van Loveren C, Buys JF, de Soet JJ et al. Competition between fluoride-resistant and fluoride-sensitive *Streptococcus mutans* in rat dental plaque [J]. Caries Res 1991, 25(6) :424-430.
- [2] Brown LR, White JO, Horton M. Effect of continuous fluoride gel use on plaque fluoride retention and microbial activity[J]. J Dent Res, 1983, 62(6) :746-751.
- [3] Vogel GL, Ma Y, Carey CM, et al. Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse[J]. J Dent Res, 1997, 76(3) :761-767.
- [4] Chansley PE, Kral TA. Transformation of fluoride resistance genes in *Streptococcus mutans* [J]. Infect Immun, 1989, 57(7) :1968-1970.
- [5] van Loveren C, Buijs JF, ten Cate JM. Protective effect of topically applied fluoride in relation to fluoride sensitivity of *mutans Streptococci*[J]. J Dent Res, 1993, 72(8) : 1184-1190.
- [6] 张志民, 赵洪岩, 张家颖. 变形链球菌耐氟菌株中耐酸相关基因*fmh*突变的检测[J]. 现代口腔医学杂志, 2007, 21(6) :570-572.
- [7] Bowden GH. Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque[J]. J Dent Res, 1990, 69(Spec) :653-659.
- [8] 朱怡玲, 吴补领, 孟艳玲, 等. 变形链球菌、远缘链球菌耐氟菌株与亲代菌株基因组REA的比较分析[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(11) :648-650.
- [9] 殷晓萍, 于丹妮, 陈锦英. 变形链球菌耐氟菌株体外诱导分离方法的研究[J]. 天津医药, 2004, 32(6) :321-323.
- [10] Hogg ST, Maning JE. Determination of *viridans Streptococci* surface lipoteichoic acid by enzyme linked immune sorbent assay[J]. FEMS Microbiol Lett, 1989, 49(2/3) : 239-242.
- [11] Thibodeau E, Ford C. Chain formation and de-chaining in *Streptococcus sobrinus* SL-1[J]. Oral Microbiol Immunol, 1991, 6(5) :313-315.
- [12] Leshner RJ, Bender GR, Marquis RE. Bacterolytic action of fluoride ions[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1977, 12(3) :339-345.
- [13] 盛江筠, 刘正, 李鸣宇. 变形链球菌和远缘链球菌耐氟菌株超微结构观察[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001, 11(6) :365-367.
- [14] Rosen S, Frey JI, Hsu SM. Effect of fluoride-resistant micro-organism on dental caries[J]. J Dent Res, 1978, 57(2) :180.
- [15] Eisenberg AD, Spitz LM. Characteristics of fluoride resistant *mutans Streptococci*[J]. Caries Res, 1988, 22(2) : 110.
- [16] Patrich J, Gullane JD, Tadgh OD. Juvenile angiofibroma : A review of the literature and a case series report[J]. Laryngoscope, 1992, 102(8) :926-931.
- [17] 盛江筠, 刘正. 变形链球菌和远缘链球菌耐氟菌株黏附能力的体外研究[J]. 上海口腔医学, 2000, 9(3) :145-147.
- [18] 盛江筠, 黄正蔚, 刘正. 变形链球菌耐氟菌株与亲代菌株质子移位膜ATP酶活性的比较[J]. 上海口腔医学, 2005, 14(1) :71-73.
- [19] Eisenberg AD, Spitz LM. Fluoride resistance in oral streptococci : Acid production[J]. J Dent Res, 1987, 66 (Suppl) :148.
- [20] 盛江筠, 刘正. 变形链球菌耐氟菌株的诱导及产酸性的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2000, 35(2) :95-98.
- [21] Hoelscher GL, Hudson MC. Characterization of an unusual fluoride-resistant *Streptococcus mutans* isolate[J]. Curr Microbiol, 1996, 32(3) :156-161.
- [22] 盛江筠, 刘正. 变形链球菌耐氟菌株脱矿能力的体外研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2000, 10(1) :13-15.
- [23] 盛江筠, 刘正. 变形链球菌和远缘链球菌耐氟菌株DNA G+C含量测定[J]. 上海口腔医学, 2001, 10(1) :47-51.
- [24] 朱怡玲, 吴补领, 孟艳玲, 等. 变形链球菌耐氟菌株、远缘链球菌耐氟菌株与亲代菌株基因组AP-PCR的比较[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(7) :382-385.
- [25] 盛江筠, 朱敏, 黄正蔚, 等. 耐氟菌株及其亲代菌株ATP酶基因的DNA测序[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(4) :340-341.
- [26] 张志民, 任宝华, 张家颖, 等. 变形链球菌耐氟菌株中耐酸相关基因*dgc*突变的检测及临床意义[J]. 吉林大学学报:医学版, 2008, 34(5) :850-853.

(本文编辑 骆筱秋)