

[文章编号 1000-1182(2005)02-0116-03]

# 不同龋敏感人群变形链球菌分离株 乳酸脱氢酶活性的初步研究

杨德琴<sup>1</sup>, 刘天佳<sup>1</sup>, 周学东<sup>1</sup>, 何奎芳<sup>2</sup>, 李 颂<sup>3</sup>, 庄 姮<sup>4</sup>

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;  
2. 温州医学院 口腔内科教研室, 浙江 温州 325000; 3. 安徽医科大学口腔医院 牙体牙髓科, 安徽 合肥 230000;  
4. 第四军医大学口腔医院 牙体牙髓科, 陕西 西安 710032)

**[摘要]** 目的 初步探讨不同龋敏感人群变形链球菌乳酸脱氢酶(LDH)活性与龋病发生的关系, 筛选不同 LDH 活力菌株。方法 从高龋和无龋个体分离变形链球菌各 50 株, 应用经典考马斯亮蓝蛋白定量方法对菌细胞裂解液蛋白进行定量, 通过还原性辅酶 氧化法测定 LDH 活性, 比较两组菌株 LDH 活性差异以及不同 LDH 活性的菌株在两组人群的分布。结果 两组菌株 LDH 的酶活性均值总体无差异 ( $P > 0.05$ ); 不同 LDH 活性的菌株在两组人群的分布不同 ( $P < 0.05$ )。结论 变形链球菌 LDH 活性与龋病的发生有一定相关性。

**[关键词]** 变形链球菌; 乳酸脱氢酶; 蛋白定量; 酶活性

**[中图分类号]** R 781.1 **[文献标识码]** A

**Study on Lactate Dehydrogenase Activity of *Streptococcus mutans* Isolates Derived from Caries-active and Caries-free Individuals** YANG De-qin<sup>1</sup>, LIU Tian-jia<sup>1</sup>, ZHOU Xue-dong<sup>1</sup>, HE Kui-fang<sup>2</sup>, LI Song<sup>3</sup>, ZHUANG Heng<sup>4</sup>. (1. Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; 3. Dept. of Operative Dentistry and Endodontics, Stomatology College of Anhui University of Medical Sciences, Hefei 230000, China; 4. Dept. of Operative Dentistry and Endodontics, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract Objective** To preliminarily investigate the relationship between the Lactate dehydrogenase (LDH) activity of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and dental caries initiation. **Methods** 100 *S. mutans* strains derived from caries-active and caries-free individuals were cultured in BHI medium supplemented with glucose. Cells were extracted and ruptured, and the extracted liquid protein was quantified with Coomassie brilliant blue G250 staining methods. LDH activity was assayed using the pyruvate-dependent oxidation of NADH with and without FDP. **Results** LDH activity of the two groups strains had no difference ( $P > 0.05$ ), but the distribution of differ class enzyme activity strains in the two groups was different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** LDH activity of *S. mutans* is correlated to the initiation of dental caries to some extent. The measurement methods in this study can be applied in preliminary quantitation of LDH activity and the screening of *S. mutans* strains.

**Key words** *Streptococcus mutans*; lactate dehydrogenase; protein quantitation; enzyme activity

变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 是人类口腔中最主要的致龋菌, 利用碳水化合物发酵产乳酸是其致龋的重要特征<sup>1,2</sup>, 是龋病发生的直接原因。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 是合成乳酸的关键酶, 其生物学作用是致龋的关键环节。研究证实, 缺乏 LDH 活性的 *S. mutans* 在限菌啮齿类动物模型实验中体内致龋性显著降低<sup>2~4</sup>, 不同龋敏感人

群 *S. mutans* 的产酸能力除了受耐酸力等其他因素影响外<sup>5</sup>, 产酸关键酶 LDH 活性是其产酸力的重要决定因素。本研究对高龋和无龋个体的 *S. mutans* LDH 的活性进行初步定量和比较, 对不同 LDH 活性的分离株进行筛选, 探讨 LDH 的活性与龋病发生的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

本课题组前期研究所获的 *S. mutans* (血清型 c) 不同 AP-PCR 基因型的临床分离株高龋和低龋各 50 株。Brain Heart Infusion 培养基 (Difco 公司, 美国)。

### 1.2 试剂

0.5 g/L 牛血清白蛋白 (Sigma 公司, 美国),

[收稿日期 2004-09-21; 修回日期 2004-10-27]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30171013); 贵州省自然科学基金资助项目 [黔科合计 (2004) 3055]

[作者简介] 杨德琴 (1972-), 女, 广西人, 副教授, 博士, 现在遵义医学院附属口腔医院工作

[通讯作者] 刘天佳, Tel: 028-85501439

1 mmol/L 还原性辅酶 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原酶 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 溶液 (Boehringer 公司, 德国), 100 mmol/L 1,6 - 二磷酸果糖 (D-fructose-1,6-diphosphate, FDP) 溶液 (中国上海伯奥)。

1.3 仪器和设备

Sinoprep 150 超声细胞破碎仪 (SANYO 公司, 日本), UV-265 型紫外分光光度计 (日本岛津), R200D 电子天平 (Sartorius 公司, 德国), WH-1 微型旋涡混合仪 (中国上海), Surper T21 低温超速离心机 (Sorvall 公司, 美国), DY-2 型厌氧培养箱 (中国浙江义乌)。

1.4 *S. mutans* 培养

冻干 *S. mutans* 临床株复苏、形态学鉴定后接种于 BHI 固体平板, 37 °C, 95 %N<sub>2</sub>, 5 %CO<sub>2</sub> 培养 48 h, 挑取单菌落于 30 ml BHI 液体培养基 (添加 0.3 %葡萄糖) 于相同条件培养 24 h 增菌。菌液 5 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 收集沉淀, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液洗涤菌细胞 2 次, 以 2 ml 缓冲液混匀悬浮。冰浴下瞬时多次超声破碎菌细胞, 14 000 r/min、4 °C 离心 30 min, 收集上清 4 °C 保存。

1.5 菌细胞裂解上清液蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝 G250 染色比色分析法。在标号试管中各加入 0.5 g/L 牛血清白蛋白 40、50、60、70、80、90、100 μl, 分别加不同体积生理盐水补足 100 μl, 每管各加入 1 ml 考马斯亮蓝 G250 染色液, 室温振荡混匀 2 min, 每管作 3 个平行管。以生理盐水 100 μl 加 1 ml 染料作空白调零, 在 595 nm 测吸光度 A<sub>595</sub>, 通过统计分析计算标准曲线回归方程。测量菌细胞裂解上清液的 A<sub>595</sub>, 以回归方程求得蛋白浓度。

1.6 LDH 活性分析

采用依赖 FDP 的还原性辅酶 (NADH) 氧化法。1 ml 反应体系中: 磷酸钾 (pH 6.2) 100 μmol, NADH 0.2 μmol, 丙酮酸钠 10 μmol, 菌细胞裂解上清蛋白 18 μg。振荡混匀, 1 min 后加入 FDP 20 μmol 激活反应, 对照管不加 FDP。混匀后 37 °C 水浴 1 h, 测定 340 nm 波长下吸光度 A<sub>340</sub>, FDP 依赖反应管和 FDP 非依赖对照管均作 3 个平行管求均值, 对照管 A<sub>340</sub> 和反应管 A<sub>340</sub> 的差值即为酶活性相对定量。

1.7 统计分析

SPSS11.0 统计软件作回归分析, 回归方程 ANOVA<sup>b</sup> 检验, 不同龋敏感菌株分组酶活性均值作 *t* 检验, 不同分级酶活性在不同龋敏感菌株的分布采用<sup>2</sup> 检验。

2 结果

2.1 蛋白定量标准

表 1 以不同浓度牛血清白蛋白作为标准, 通过考

马斯亮蓝 G250 染色比色得出的定量值 (A<sub>595</sub>), 根据定量结果, 以不同牛血清白蛋白浓度为纵坐标 (*y*)、A<sub>595</sub> 为横坐标 (*x*) 作出蛋白定量标准曲线及回归方程:  $y = 1.451x - 0.268$ , 回归系数经 ANOVA<sup>b</sup> 显著性检验证实此回归方程有意义, 相关系数  $r = 0.995$ 。

表 1 牛血清白蛋白定量测定值

Tab 1 Quantitative determination of bovine serum albumin	
牛血清白蛋白 (g/L)	A <sub>595</sub> ( $\bar{x} \pm s$ )
0.20	0.316 ±0.002
0.25	0.355 ±0.010
0.30	0.395 ±0.020
0.35	0.453 ±0.010
0.40	0.467 ±0.040
0.45	0.494 ±0.020
0.50	0.516 ±0.010

2.2 *S. mutans* 临床分离株 LDH 活性相对定量

表 2、3 分别为高龋和无龋 *S. mutans* 不同基因型分离株 LDH 活性相对定量。无龋组 LDH 活性均值为 0.235 ±0.079, 高龋组 LDH 活性均值为 0.265 ±0.082, *t* 检验比较两者无显著性差异 ( $P = 0.069$ ), 但根据两组酶活性均值不同集中趋势以 1.7 和 3.1 为界值人为将 LDH 活性相对分为低、中、高 3 级进行比较, 在高龋和无龋两组菌株中 LDH 活性低、中、高分布不同 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

表 2 高龋个体变形链球菌临床分离株乳酸脱氢酶活性  
Tab 2 LDH enzyme activity of *S. mutans* strains isolated from caries-active individuals

菌株编号	活性	菌株编号	活性	菌株编号	活性
5802	0.368	3304	0.355	3601	0.391
5903	0.340	4901	0.438	3101	0.279
5202	0.383	2101	0.303	4402	0.342
2703	0.249	5501	0.260	3001	0.293
2202	0.243	4701	0.201	4302	0.344
4002	0.339	2901	0.306	2801	0.228
5205	0.337	5604	0.369	5606	0.336
2503	0.260	5803	0.237	2601	0.196
2401	0.145	5106	0.136	4401	0.218
3703	0.221	3801	0.121	3305	0.203
2001	0.215	5706	0.135	4203	0.202
3403	0.218	5502	0.190	3503	0.156
5305	0.228	3401	0.220	4503	0.223
4801	0.243	3901	0.153	2302	0.291
5702	0.147	2902	0.219	2201	0.218
5404	0.265	5004	0.423	3903	0.336
4105	0.397	3203	0.319		

表 3 无龋个体变形链球菌临床分离株乳酸脱氢酶活性  
Tab 3 LDH enzyme activity of *S. mutans* strains isolated from caries-free individuals

菌株编号	活性	菌株编号	活性	菌株编号	活性
802	0.391	1805	0.401	1001	0.242
402	0.351	601	0.401	902	0.366
1902	0.333	705	0.291	502	0.136
702	0.129	1903	0.164	401	0.212
1401	0.279	1101	0.127	403	0.234
1002	0.241	503	0.127	803	0.125
205	0.134	901	0.122	1105	0.126
204	0.137	1104	0.132	1201	0.136
703	0.120	1102	0.124	201	0.283
301	0.281	903	0.279	203	0.212
1803	0.210	405	0.218	1701	0.259
1202	0.285	1302	0.266	1703	0.291
801	0.280	1904	0.279	1901	0.236
501	0.285	1602	0.278	1502	0.283
1601	0.267	1402	0.275	1303	0.243
1804	0.278	1405	0.239	701	0.216
1501	0.220	1301	0.212		

表 4 高龋和无龋变形链球菌株不同 LDH 活性分布  
Tab 4 Distribution of LDH enzyme activity classes of *S. mutans* strains between caries-active and caries-free groups

分组	LDH 活性		
	高度	中度	低度
无龋组	6	30	14
高龋组	18	25	7
合计	24	55	21

3 讨论

广泛分布于细菌细胞内的 LDH 是“乳酸闸门”的主导者,是 Embden-Meyerhof 途径的终结酶,催化丙酮酸转化为乳酸是致龋菌的毒力所在。*S. mutans* 的 LDH 激活依赖 FDP 的存在,且高浓度的 FDP 能加强其活性,称之 FDP-dependent-LDH。酶蛋白每个亚基具备 1 个或多个活性结合 FDP 位点,结合可引起 LDH 分子发生变构效应。当细菌生长在糖丰富的培养基中,细菌细胞内高水平的 FDP 导致 LDH 激活,“乳酸闸门”开放,代谢丙酮酸生成大量乳酸导致牙磷酸钙溶解、脱矿,产生龋损。研究表明 LDH 活性缺乏会导致细胞内  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  代谢失衡和/或糖酵解毒性中间产物堆积<sup>6</sup>,对 *S. mutans* 产生致死效应,故 LDH 活性对 *S. mutans* 的生存和致龋作用扮演着关键

的角色,对 LDH 活性的研究是探讨致龋菌生物学功能和致龋差异以及龋病防治的重要内容。

NADH 在 340 nm 波长有最大的吸收,当乳酸脱氢酶和 NADH 与丙酮酸反应消耗 NADH 时,引起 340 nm 处 NADH 吸光度下降。故根据丙酮酸 + NADH + LDH  $\xrightarrow{\text{HDP}}$  乳酸 + NAD 反应式,测得 340 nm 下 NADH 吸光度降低,就可测出 LDH 活力。

国外对 LDH 活性的研究需要将酶提取纯化,或是用试剂盒进行蛋白的准确定量后再作活性测定,结果理想但操作复杂且价格昂贵。本研究用考马斯亮蓝定量的方法,通过测定考马斯亮蓝染料与待测蛋白的结合量,并与结合这种染料的不同量的标准蛋白质牛血清白蛋白比较来定量细菌细胞裂解蛋白,对定量蛋白进行 LDH 活性初步测定和分析。实践证实本实验所用方法简单、经济可行,适于对菌株 LDH 进行初步活性评价和筛选。

实验结果发现不同龋敏感人群 *S. mutans* 分离株 LDH 活性均值的总体差异比较没有显著性意义,但不同分级的 LDH 活性菌株在不同敏感人群的分布是不同的,提示 LDH 活性与龋病的发生有一定的相关性,无龋人群中 LDH 低活性的 *S. mutans* 株的分布高于高龋人群,而高龋人群中 LDH 高活性的 *S. mutans* 株的比例比无龋人群高。目前的研究尚无对高龋和无龋变形链球菌 LDH 的活性进行比较的报道,亦无可参考的确定界值,本文所用的分级界值是从测定结果的集中趋势予以确定的,以此分级进行分布比较,初步反应了 LDH 活性与龋敏感程度的相关性,而这种差异是否有其基因变异有待于进一步研究。

[参考文献]

1 ] Dong YM, Pearce EIF, Yue L, et al. Plaque pH and associated parameters in relation to caries J. Caries Res, 1999, 33(6):428-436.  
2 ] Hillman JD, Brooks TA, Michalek, et al. Construction and characterization of an effector strain of *Streptococcus mutans* for replacement therapy of dental caries J. Infect Immun, 2000, 68(3):543-549.  
3 ] Fitzgerald RJ, Adams BO, Sandham HJ, et al. Cariogenicity of a Lactate dehydrogenase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* serotype c in gnotobiotic rats J. Infect Immun, 1989, 57(3):823-826.  
4 ] Hillman JD. Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: isolation and preliminary characterization J. Infect Immun, 1978, 21(1):206-212.  
5 ] 杨德琴,刘天佳,杨锦波. 变形链球菌质子移位膜 ATP 酶研究进展 J. 国外医学口腔医学分册, 2004, 31(3):200-203.  
6 ] 杨德琴,刘天佳. 变形链球菌乳酸脱氢酶的结构及应用 J. 国外医学口腔医学分册, 2003, 30(3):203-205.

(本文编辑 汤亚玲)