

## 甜茶苷对变形链球菌致龋能力的影响

胡楠<sup>1</sup>, 熊兴耀<sup>2\*</sup>

1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128
2. 中国农业科学院蔬菜花卉所, 北京 100081

**摘要:** 目的 研究甜茶苷对变形链球菌 *Streptococcus mutans* 致龋能力的影响。方法 将变形链球菌菌液加入甜茶苷后于恒温厌氧环境下培养, 测试其 pH 值变化、黏附率, 运用碳氢化合物法测定其表面疏水率。采用 Bradford 法以 Neson-samogyi 分别测量总蛋白的量以及还原糖的量, 计算葡萄糖基转移酶 (glucosyltransferase, GTF) 活力, 采用 Anihrone 法测量水不溶性葡聚糖 (water-insoluble glucans, WIG) 的量。结果 加入甜茶苷的菌液 pH 变化值、黏附率、表面疏水率、GTF 活力及 WIG 的量与对照组之间均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结论 甜茶苷对变形链球菌产酸能力、黏附能力、GTF 活力及 WIG 合成具有显著抑制作用。

**关键词:** 甜茶苷; 变形链球菌; 黏附; 葡萄糖基转移酶; 水不溶性胞外多糖; 致龋能力

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)12-1743-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.12.017

## Effect of rubusoside on cariogenic potential of *Streptococcus mutans*

HU Nan<sup>1</sup>, XIONG Xing-yao<sup>2</sup>

1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China
2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agriculture, Beijing 100081, China

**Abstract: Objective** To study the inhibitory effect of rubusoside on the growth of *Streptococcus mutans*. **Methods** *S. mutans* was added to each group, cultured in anaerobic incubator with constant temperature, and the pH value was measured and compared. Microbial adhesion to hydrocarbons method was used to test the adhesion and cell surface hydrophobicity. Centrifugation was followed, Bradford method and Neson-samogyi method were used to measure the total contents of protein and reducing sugar and to calculate the viability of glucosyltransferase (GTF). Anihrone method was used to measure the contents of water-insoluble glucans (WIG). **Results** There were highly significant differences among the sweet tea groups, the experiment groups, and control groups on the pH value, adhesion, cell surface hydrophobicity, GTF activity, and total content of WIG ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Rubusoside has the strong inhibition on the ability of acid production, adhesion, cell surface hydrophobicity, GTF activity, and the synthesis of WIG of *S. mutans*.

**Key words:** rubusoside; *Streptococcus mutans*; adhesion; glucosyltransferase; water-insoluble glucans; cariogenic potential

变形链球菌 *Streptococcus mutans* 是目前医学界公认的最主要的口腔致龋病菌<sup>[1]</sup>, 其致龋机制是通过直接黏附, 然后在短时间内发酵口腔中碳水化物的残渍而产生酸液迅速腐蚀牙表面, 以及代谢过程中产生葡萄糖基转移酶 (glucosyltransferase, GTF) 以合成水不溶性葡聚糖 (water-insoluble glucans, WIG), 促进病菌黏附到牙齿表面形成牙菌斑, 阻止酸性物质扩散, 在牙表面形成脱矿致龋<sup>[2-4]</sup>。因此减少变形链球菌的产酸能力、黏附能力以

及降低 GTF 活性和 WIG 合成能力, 对于预防龋齿有重要意义。由于传统氟化物治疗方法中氟化物浓度的稳定性, 长期使用后口腔菌株产生的耐氟性以及氟过量导致使用者慢性中毒等问题, 使得氟化物的应用存在了诸多的局限性<sup>[5-6]</sup>。近年来寻找安全有效的天然提取物来取代目前的氟化物是防治龋齿领域的一大研究热点, 甜茶苷是甜叶悬钩子 *Rubus suarissimus* S. Lee 的特有功能成分, 具有抗菌、抗炎、降血糖、调血脂、辅助治疗糖尿病等作用<sup>[7]</sup>。

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 教育部创新团队项目: 园艺植物功能成分优异资源高效利用 (IRT0963)

作者简介: 胡楠 (1984—), 男, 湖南长沙人, 湖南农业大学园艺园林学院药用植物资源博士研究生。

Tel: 15388087268 E-mail: 465583380@qq.com

\*通信作者 熊兴耀 (1961—), 男, 白族, 湖南农业大学园艺园林学院院长、教授、博士生导师。

目前对于甜茶苷抑龋能力已有一些报道,但大部分都是针对其粗提物的功效研究,未见对其单体相关研究的报道。为进一步探讨其对于变形链球菌致龋能力的影响,本研究通过检测甜茶苷对于变形链球菌产酸能力、GTF产生和WIG合成能力的影响,来探讨甜茶苷抑制变形链球菌致龋的作用机制,为预防龋齿提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

变形链球菌菌株(国际标准菌株 ATCC 25175),由 ATCC (美国) 购得。甜茶苷(质量分数 99%,由 University of Kentucky 提供)。李氏菌增菌肉汤(LB)固体和液体基础培养基、TSBYE 液体培养基(EMD Millipore, Inc.);硫酸铵、葱酮、葡聚糖、磷酸盐缓冲溶液、考马斯亮蓝 G250 (Oxoid Ltd, 英国);小牛血清白蛋白 (Remel, 美国)。

### 1.2 主要仪器

恒温厌氧培养箱、紫外分光光度计 (Fisher Scientific, 美国);高速温控离心机 (Merck KGaA, 德国)。

### 1.3 实验菌株以及菌液培养

取出-80℃储存的变形链球菌 ATCC 25175,用常规方法接种到 4 mL TSBYE 溶液中,并在 37℃恒温箱厌氧环境下(80% N<sub>2</sub>、15% CO<sub>2</sub>、5% H<sub>2</sub>)培养 16 h,然后取出 800 μL 菌液加入 4 mL 新鲜 TSBYE 溶液内制成混悬液,备用。

### 1.4 变形链球菌产酸能力的检测

取出备用菌液 1 mL,分别加入盛有 5 mL 体积分数为 5% 甜茶苷、木糖醇的 TSBYE 溶液的试管中,并设置对照组(只加培养基)。以上实验组和对照组每组 3 支平行管,共计 9 支。将各组初始 pH 值调为 7.04,在 37℃恒温箱厌氧环境下(80% N<sub>2</sub>、15% CO<sub>2</sub>、5% H<sub>2</sub>)培养 48 h,室温下离心,取上清液,测量上清液的 pH 值,计算培养 48 h 内的 pH 值的变化。实验重复 3 次,结果取平均值,根据公式计算 pH 值变化量(ΔpH)来评价药物对变形链球菌产酸能力的影响。

$$\Delta\text{pH} = \text{初始 pH 值 (7.04)} - \text{终止 pH 值}$$

### 1.5 变形链球菌黏附能力的检测

将备用的菌液分别取 0.5 mL 接种至盛有 5 mL LB 液体培养基的试管中,对照组只加培养基,给药组分别加入甜茶苷或木糖醇,使其终质量浓度为 20、50、200、500 μg/mL,每组 3 支试管。在每支

试管中插入一只玻璃棒,玻璃棒直径 5 mm,长度 15 cm,在 37℃恒温箱厌氧环境下(80% N<sub>2</sub>、15% CO<sub>2</sub>、5% H<sub>2</sub>)培养 48 h,将试管从恒温箱中取出,轻轻地用生理盐水冲洗 3 次,每次 3~5 s,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液在振荡器上轻轻地将黏附的变形链球菌洗脱下来,然后在 2 500 r/min 的速率下离心 15 min,收集细菌加入 4 mL 生理盐水,混匀,在紫外可见分光光度计下测量 450 nm 处 A 值。每支试管重复测量 3 次,以减小误差,结果取平均值,计算黏附抑制率。

$$\text{黏附抑制率} = 1 - \text{样品组 A 值} / \text{对照组 A 值}$$

### 1.6 变形链球菌表面疏水率的测定

准确称取 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 22.2 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.26 g、MgSO<sub>4</sub> 0.2 g 和尿素 1.8 g,加蒸馏水溶解定容至 1 L (pH 7.1) 配制成 PUM 缓冲溶液备用。取备用菌株,每支试管中加入 5 mL 含不同质量浓度(20、50、200、500 μg/mL)甜茶苷或木糖醇的菌液,对照组加入 5 mL 含 PUM 缓冲溶液的菌液,每组 4 个平行管。碳氢化合物法(microbial adhesion to hydrocarbons, MATH)测定变形链球菌的表面疏水率。各试管菌液轻轻摇晃混匀,在 37℃水浴箱中加热 15 min,取出其中 5 mL 加入新试管,每支试管加入 400 μL 十六烷,超声震荡 15 s,使各管充分混匀,然后室温下静置使之分层,上层为油层,下层为水层,弃油层,用紫外可见分光光度计测量在 660 nm 处 A 值,各试管重复测定 3 次,结果取平均值,计算变形链球菌表面疏水率。

$$\text{表面疏水率} = (\text{加入十六烷后 A 值} - \text{初始 A 值}) / \text{加入十六烷后 A 值}$$

### 1.7 GTF 提取、活性检测及 WIG 的测定

取备用菌液 1 mL 分别加入盛有 5 mL 体积分数为 10% 甜茶苷、木糖醇的 TSBYE 溶液的试管中,在 37℃恒温箱厌氧环境下(80% N<sub>2</sub>、15% CO<sub>2</sub>、5% H<sub>2</sub>)培养 48 h。室温下离心,收集上清,加入硫酸铵固体,置于 4℃冰箱静置过夜,隔夜取出离心弃上清,将沉淀物中加入磷酸盐缓冲溶液透析至无 NH<sub>3</sub> 检出,室温下离心,上清液即为游离型 GTF 粗提物。

将 GTF 粗酶加入双蒸水,用 Bradford 法测定蛋白的量。将 GTF 粗提物,含蔗糖体积分数为 5% 的磷酸钠缓冲溶液,于 37℃恒温箱厌氧环境下(80% N<sub>2</sub>、15% CO<sub>2</sub>、5% H<sub>2</sub>)培养 1~2 h,放入 100℃的热水 10~15 min 终止反应,加入双蒸水,室温下离心,上清液中的还原糖用 DNS 法测定。

蒸馏水将沉淀物洗2次,加入NaOH再洗2次,室温离心弃上清,沉淀即为WIG,加入0.1 mol/L NaOH溶解,用蒽酮法测定试管中WIG的量。GTF活力单位定义为标准条件下反应1 h,每分钟从蔗糖释放1 μmol还原糖所需要的酶量,计算酶比活力(酶比活力=酶活力/总蛋白量)。

1.8 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行数据分析和处理,组间比较采取单因素方差分析(ANOVA);采用Student Newman Keuls检测进行样本组间均数的两两比较,变量之间的相关分析采用t检验。

2 结果与分析

2.1 甜茶苷对变形链球菌产酸能力的影响

变形链球菌经甜茶苷作用后产酸能力明显下降,ΔpH值仅为0.036±0.061,与对照组ΔpH值(2.913±0.032)比较明显降低(P<0.01),但在本实验中木糖醇可能由于未达到其有效的最小抑酸浓度,并未显现明显的抑制作用,木糖醇组的ΔpH值为2.773±0.405(P>0.05)。结果可以看出甜茶苷对变形链球菌的产酸能力具有显著的抑制作用。

2.2 甜茶苷对变形链球菌黏附能力的影响

不同质量浓度甜茶苷对变形链球菌黏附能力的影响通过其菌液在450 nm处的A值的大小来表示,数值越大表明管中的变形链球菌越多,反之则越少,其结果见表1。甜茶苷各组对变形链球菌的黏附抑制率随着质量浓度的升高而增加,呈正比关系。

2.3 甜茶苷对变形链球菌表面疏水率的影响

甜茶苷对变形链球菌表面疏水率的影响通过菌液于660 nm处的A值大小来表示,数值越大,表示

表1 甜茶苷对变形链球菌黏附能力的影响(̄x±s,n=3)

Table 1 Effect of rubusoside on adhesion of *S. mutans* (̄x±s,n=3)

组别	ρ/(μg·mL <sup>-1</sup> )	A <sub>450</sub> 值	黏附抑制率/%
对照	—	135.124±24.482	—
甜茶苷	20	100.937±29.372	25.30
	50	41.413±11.276*	69.35
	200	1.074±0.089**	99.21
	500	0.467±0.041**	99.65
木糖醇	20	95.257±7.648	29.51
	50	45.227±5.793*	66.53
	200	1.172±0.075**	99.13
	500	0.535±0.048**	99.60

与对照组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01,下同

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs control group, same as below

其表面疏水率越小,反之则越大。根据表2结果显示,甜茶苷组与木糖醇组对表面疏水率的影响随着质量浓度的增加而提升,甜茶苷组表面疏水率与对照组比较显著降低(P<0.01),且甜茶苷作用强度大于木糖醇。

表2 甜茶苷对变形链球菌疏水率的影响(̄x±s,n=3)

Table 2 Effect of rubusoside on hydrophobic rate of *S. mutans* (̄x±s,n=3)

组别	ρ/(μg·mL <sup>-1</sup> )	A <sub>660</sub> 值	疏水率/%
对照	—	0.227±0.069	54.60
甜茶苷	20	0.289±0.024	41.60
	50	0.301±0.015*	39.19
	200	0.307±0.018*	37.98
	500	0.413±0.102**	16.56
木糖醇	20	0.212±0.013	57.17
	50	0.297±0.028*	40.60
	200	0.301±0.068*	39.19
	500	0.368±0.037**	25.66

2.4 甜茶苷对变形链球菌GTF活力和WIG合成的影响

甜茶苷、木糖醇对GTF活力和WIG合成的影响见表3。甜茶苷组的总蛋白的量、酶活力以及比活力相对于对照组各项指标有显著性差异(P<0.05、0.01)。实验结果表明,变形链球菌在甜茶苷的影响下,GTF活力明显下降,说明甜茶苷对变形链球菌葡GTF活力有强烈的抑制作用。同时变形链球菌在甜茶苷的影响下,WIG合成受到明显抑制。

3 讨论

研究表明,变形链球菌首先通过黏附于牙齿表面形成菌斑,随后在新陈代谢过程中产生大量酸液,同时利用GTF以合成葡聚糖,以及水不溶性胞外多糖特别是WIG,这是变形链球菌最主要的致龋毒力因子<sup>[8]</sup>。因此针对这几个方面来进行考察,找到合适的预防龋齿的作用靶点。变形链球菌通过发酵口腔中多种碳水化合物的残渍而产生大量酸液直接对牙表面进行腐蚀,而其本身也依然能稳定生存于pH值为4.5的口腔环境中,从而产生龋齿,因此对于控制变形链球菌的产酸能力是抑制其产生龋齿的重要环节<sup>[9]</sup>。从产酸的实验结果来看,甜茶苷组较对照组,其pH值变动量非常小,说明其对变形链球菌产酸能力有强烈的抑制作用。

通过抑制黏附的实验结果表明,随着质量浓度的升高甜茶苷的黏附抑制率随之升高,在200 μg/mL

表3 甜茶苷对变形链球菌 GTF 活力和 WIG 合成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 3 Effect of rubusoside on GTF viability and WIG synthesis of *S. mutans* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	酶活力 / mU	总蛋白量 / $\mu\text{g}$	比活力 / ( $\times 10^3 \text{ mU} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ )	WIG / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
对照	23.77 $\pm$ 0.49	47.35 $\pm$ 6.21	0.50 $\pm$ 0.05	17.212 $\pm$ 6.327
甜茶苷	0.41 $\pm$ 0.09**	59.60 $\pm$ 5.83*	0.01 $\pm$ 0.01**	8.371 $\pm$ 2.330
木糖醇	11.98 $\pm$ 0.71**	42.69 $\pm$ 7.18	0.27 $\pm$ 0.04**	15.323 $\pm$ 2.907

时黏附抑制率达到 99% 以上。变形链球菌的选择性黏附是与细胞壁成分密切相关的, 细胞壁主要成分是脂磷壁酸和蛋白, 脂磷壁酸是 GTF 在变形链球菌表面的受体, 它通过促进葡萄糖基转移酶和细菌表面的结合来调节对于牙齿表面的黏附效果<sup>[10]</sup>。高分子表面蛋白抗原是目前研究比较多的变形链球菌的黏结素, 所谓黏附作用, 就是黏结素与生物膜中受体成分的特异性结合<sup>[11]</sup>。而对于表面疏水率的实验结果表明, 甜茶苷质量浓度逐渐升高其表面疏水率逐渐降低, 表明其对于变形链球菌的表面疏水率有一定的抑制作用。综合 2 个实验结果推断, 甜茶苷对变形链球菌黏附作用的抑制, 主要是针对黏结素表面高分子蛋白, 降低 GTF 活力影响脂磷壁酸与受体结合能力以及其对于表面疏水率控制所导致的, 但其具体抑制机制还需深入研究。

GTF 是公认的致龋菌毒力因子, 变形链球菌产生的 GTF 可以利用蔗糖为底物合成胞外多糖, 其中包括水不溶性胞外多糖 WIG, 而 WIG 是黏附的关键因素之一, 因此抑制合成 WIG 的关键酶 GTF 的活性, 是研究治龋的核心之一<sup>[12]</sup>。通过对 GTF 活力测试的实验结果表明, 甜茶苷对 GTF 酶活性有显著的抑制能力, 其能力要强于木糖醇组。本实验还对变形链球菌菌液中的总蛋白的量进行测定, 结果表明甜茶苷组蛋白质的量要明显高于木糖醇组和对照组, 根据文献报道<sup>[13]</sup>, 甜茶苷水解产物中含有 18 种氨基酸, 其中谷氨酸的量高达 12.56 mg/g, 这些氨基酸可能被变形链球菌作为底物合成蛋白质, 从而导致甜茶苷组总蛋白质的量增高。

WIG 的合成是细菌的一种保护性生长方式, 同时也是变形链球菌在口腔内生存在致龋的重要条件之一, 是牙菌斑聚集和发展的重要因素, 因此本实验也对 WIG 进行了测定<sup>[14]</sup>。结果表明甜茶苷作用下的菌液中 WIG 的量要明显低于对照组以及木糖醇组, 其抑制了 GTF 的活性, 则 GTF 的量也随之减少, GTF 活性与 WIG 量之间呈正相关关系。

综上所述, 甜茶苷对变形链球菌产酸能力、黏附能力、GTF 活力以及 WIG 合成能力有较强的抑

制作用, 可期望其在龋齿防治领域成为一种有应用前景的药物。

#### 参考文献

- [1] Tamesada M, Kawabata S, Fujiwara T, *et al.* Synergistic effects of streptococcal glucosyltransferases on adherence bio-film formation [J]. *J Dent Res*, 2004, 93(11): 875-879.
- [2] 俞晓峰. 防龋天然药物的筛选及其粗提物对变链菌的体外作用研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
- [3] 何志明, 童继明. 白屈菜对于口腔致龋菌的体外实验研究 [J]. *华西药学杂志*, 2003, 34(9): 837-838.
- [4] Siliva M, Arruda M A Z. Mechanization of the Bradford reaction for the spectrophotometric determination of the total proteins [J]. *Analytical Biochem*, 2006, 351(1): 155-157.
- [5] 疏新红, 何磊. 高校幼儿园学龄前儿童龋齿调查分析及防治现状 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 21(16): 78-81.
- [6] 李君, 徐喜鸿, 卢莺燕, 等. 复方中药漱口水对于变形链球菌致龋的实验研究 [J]. *浙江医学杂志*, 2004, 26(3): 187-189.
- [7] 林继元. 广西甜茶中甜茶素和甜茶茶多酚的提取与应用研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [8] Song J H, Kim S K, Chang K W, *et al.* *In vitro* inhibition effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* [J]. *Arch Oral Biol*, 2006, 51(13): 1141-1147.
- [9] 黄正伟, 周学东, 李佳瑶, 等. 中药五倍子对于口腔致龋菌影响的体外研究实验 [J]. *中草药*, 2003, 34(9): 874-878.
- [10] 李娟, 卢莹莹, 徐锡鸿, 等. 中药复方漱口水对于变形链球菌致龋的实验研究 [J]. *华西医药杂志*, 2004, 26(3): 187-192.
- [11] Rosenberg M, Jude H, Weiss E, *et al.* Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganism *in situ* [J]. *Infect Immun*, 2003, 42(2): 831-834.
- [12] 姜丹, 宁美芝, 葛建平, 等. 远源链球菌粘附与游离状态下合成胞外多糖的比较 [J]. *上海口腔医学*, 2007, 15(1): 77-81.
- [13] 陆健, 邱伟浩, 李远志, 等. 甜茶的保健成分及其鉴别方法研究 [J]. *广东茶业*, 1998(2): 69-71.
- [14] 胡涛, 徐蓉蓉, 葛建平, 等. 不同生存条件下变形链球菌合成胞外多糖的研究 [J]. *临床口腔医学*, 2006, 21(1): 79-80.