frtR基因对变异链球菌产酸及脱矿能力影响的研究^{*}

敬美玲, 卢 森, 郑 婷, 龚 涛, 李雨庆, 周学东[△] □ 腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】目的 研究TetR家族frtR基因对变异链球菌产酸能力和诱导牙体脱矿能力的影响。方法 检测frtR基因框 内缺失株(ΔfrtR)及回复株(ΔfrtR/pDL278-frtR)的生长情况;通过共聚焦激光扫描显微镜观察菌株的生物膜结构,并用蒽 酮-硫酸法定量检测生物膜中的水不溶性胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS);通过糖酵解pH drop实验检测菌株的 产酸能力;通过横断显微放射技术(transverse micro radiography, TMR)检测菌株诱导牛牙脱矿的能力。结果 菌株生长曲 线结果表明frtR基因对变异链球菌的生长无明显影响;共聚焦激光扫描显微镜观察结果显示frtR基因对变异链球菌生物膜 形成无明显影响,硫酸-蒽酮法检测发现frtR基因对变异链球菌EPS合成亦无明显影响;糖酵解pH drop实验结果表明,当蔗 糖为唯一碳源时, 敲除frtR基因延缓了变异链球菌的产酸速率; TMR实验结果表明, 敲除frtR基因降低了变异链球菌在牛牙 表面诱导形成的脱矿深度和脱矿量。结论 frtR基因缺失会减弱变异链球菌的产酸能力及诱导牙体组织脱矿能力。

【关键词】 变异链球菌 TetR家族 产酸 磷酸转移酶系统

frtR Gene Affects Acid Production and Demineralization Ability of Streptococcus mutans JING Mei-ling, LU Miao, ZHENG Ting, GONG Tao, LI Yu-qing, ZHOU Xue-dong^{\triangle}. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China \triangle Corresponding author, E-mail: zhouxd@scu.edu.cn

(Abstract) Objective To study the effect of the *frtR* gene of TetR family on the acid production ability of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and the bacteria's ability to induce tooth demineralization. **Methods** The growth of two strains of *S. mutans* UA159, $\Delta frtR$, the *frtR* gene in-frame deletion strain, and $\Delta frtR/pDL278-frtR$, the complement strain, was examined. The structure of biofilm was observed by laser scanning confocal microscopy (LSCM). The quantitative determination of water-insoluble extracellular polysaccharide (EPS) in the bacterial biofilms was done by anthrone-sulfuric acid method. The acid production capacity of *S. mutans* was measured by glycolytic pH drop. The demineralization-inducing ability of the strains on bovine teeth was determined by transverse microradiography (TMR). **Results** The growth curves of the strains showed that *frtR* did not affect the growth of *S. mutans*. According to the findings of LSCM observation, *frtR* did not affect the biofilm formation. According to the findings of the anthrone-sulfuric acid method, *frtR* did not affect the biofilm formation. According to the findings of the anthrone-sulfuric acid method, *frtR* did not affect the biofilm formation. According to the findings of the anthrone-sulfuric acid method, *frtR* did not affect the biofilm formation. According to the findings of the anthrone-sulfuric acid method, *frtR* did not affect the biofilm formation. According to the findings of the anthrone-sulfuric acid method, *frtR* did not affect the deletion of *frtR* delayed the rate of acid production by *S. mutans* when sucrose was the only carbon source. In addition, according to the TMR results, knocking out *frtR* reduced the depth and amount of demineralization induced by *S. mutans* on the surface of bovine teeth. **Conclusion** The deletion of *frtR* can weaken the acid production ability and the demineralization ability of *S. mutans*.

Key words *Streptococcus mutans* TetR family Acid production Phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system

龋病是一种多因素复合导致的牙齿硬组织进行性病 损,表现为无机物的脱矿及有机物的分解^[1]。变异链球菌 是最早发现也是目前研究最多的口腔致龋菌之一,亦是 致龋性生物膜中的重要定植菌之一^[2-4]。变异链球菌的主 要致龋毒力包括产酸、耐酸和合成胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)等。变异链球菌可以通过磷酸烯醇式 丙酮酸依赖的磷酸转移酶系统(the phosphoenolpyruvatedependent phosphotransferase system, PEP-PTS)和结合蛋 白运输系统(binding-protein transport system, BPTS)转运 环境中的糖类物质并将其磷酸化,再通过糖酵解途径将 磷酸化的糖发酵为丙酮酸,丙酮酸又可以通过一系列支 链途径形成乳酸、甲酸、乙酸等酸性物质^[5-8]。变异链球 菌产生的酸性物质可以有效降低牙菌斑微环境的pH值, 形成局部酸性位点,促进牙体组织脱矿^[9]。

TetR家族转录因子在细菌中普遍存在,参与新陈代 谢、抗生素合成、群体感应、生物膜形成和耐药性等多种 生命活动^[10-14]。变异链球菌UA159编码至少18个TetR家 族转录因子,其中frtR基因已被证实通过调控frtP基因表 达量影响变异链球菌对氟化物的敏感性^[7,15]。然而frtR基 因是否参与调控变异链球菌的产EPS能力、产酸及脱矿

^{*} 国家自然科学基金面上项目(No. 31870065、No. 32170046)资助

[△] 通信作者, E-mail: zhouxd@scu.edu.cn

能力等致龋毒力尚未可知。本研究围绕致龋毒力对变异 链球菌UA159、frtR基因缺失株(ΔfrtR)和回复株 (ΔfrtR/pDL278-frtR)的产酸能力、EPS合成能力和诱导牙 体组织脱矿能力进行了系统的检测。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株及生长条件

本研究中使用的变异链球菌UA159来自于口腔疾病 研究国家重点实验室口腔微生物资源库, ΔfrtR和ΔfrtR/ pDL278-frtR来自课题组前期制备^[15]。变异链球菌 UA159及其突变株使用牛脑心浸出液(BHI, BD)作为培 养基,在37℃,体积分数分别为90% N₂、5% CO₂、5% H₂环境下培养。培养变异链球菌生物膜时则在BHI培养 基中添加1%蔗糖(命名为BHIS培养基)。过夜培养回复 株时,在BHI培养基中添加1000 µg/mL壮观霉素。

1.2 生长曲线

将过夜培养的变异链球菌菌株1:10稀释至BHI培养 基中,继续培养至指数生长期〔600 nm下的光密度值 (OD₆₀₀)=0.5〕,再用新的BHI培养基将其1:100稀释。将 稀释后的菌液加入无菌96孔板(Corning, NY)中(200 μL/ 孔),并在菌液上覆盖无菌矿物油,利用无菌BHI作为空白 对照。使用Multiskan Spectrum (Thermo, Multiskan Go, USA)每半小时测量OD₆₀₀,每个样本均有至少3个重复。

1.3 水不溶性EPS定量检测

将过夜培养的变异链球菌菌株1:10稀释至BHI培养 基中,继续培养至指数生长期(OD₆₀₀=0.5),再用新的 BHIS培养基将其1:100稀释。将稀释后的细菌立即转移 到无菌24孔板(Corning, NY)(1 mL/孔)中,在37℃,体积 分数分别为90% N₂、5% CO₂、5% H₂中孵育24 h。孵育 后,轻轻倒出培养基,用无菌PBS轻柔洗涤生物膜3次,以 去除浮游细胞和贴壁疏松的细胞。最后用1 mL无菌 PBS重悬生物膜后,离心(6 000 r/min, 10 min,4℃)。丢 弃上清液后,重新悬浮细胞颗粒,用无菌PBS洗涤3次,以 去除水溶性细胞外多糖。从这些样品中提取的水不溶性 EPS在37℃下用1 mol/L NaOH振荡溶解2 h。将离心得到 的上清液与3倍体积的蒽酮-硫酸试剂混合,在95℃水浴 中加热6 min,冷却至室温后,测定样本在625 nm处的 OD值并记录。每组实验重复3次。

1.4 共聚焦显微镜观察生物膜

将过夜培养的变异链球菌菌株1:10稀释至BHI培 养基中,继续培养至指数生长期(OD₆₀₀=0.5),再用新的 BHIS培养基将其1:100稀释。将稀释后的细菌立即转 入含有无菌玻璃圆片的24孔板(Corning, NY)(1 mL/孔) 中,在菌液中加入1 µmol/L的Alexa Fluor 647葡聚糖偶联物(Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)以标记葡聚糖, 37 ℃,体积分数分别为90% N₂、5% CO₂、5% H₂中孵育24 h后,用双蒸水清洗盖玻片2次,以去除浮游和松散结合的细胞。随后,用2.5 µmol/L SYTO 9 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)染色 15 min。采用尼康共聚焦激光扫描显微镜(CLSM; Nikon, N-SIM), 60×油浸物镜观察生物膜。SYTO 9的激光波长设置为495 ~ 515 nm, Alexa Fluor 647的激光波长设置为655 ~ 690 nm,每个生物膜随机选择5个位置进行扫描。除此之外,利用COMSTAT和Image J软件分析上述生物膜中的菌体含量及EPS含量,每组样本至少含3次重复。

1.5 细菌产酸能力检测

本研究通过糖酵解pH drop实验检测细菌的产酸能 力^[16]。首先将过夜培养的变异链球菌菌株1:10稀释至 BHI培养基中,继续培养至指数生长期(OD₆₀₀=0.5)。取 等体积菌液离心(4000 r/min, 10 min, 4 \mathbb{C}),去除上清,用等 体积pH=6.5的0.5 mmol/L磷酸钾缓冲液(含37.5 mmol/L KCl和1.25 mmol/L MgCl₂)重悬菌体沉淀,离心后用等体 积含不同糖(10 g/L蔗糖、10 g/L果糖、10 g/L葡萄糖)的上 述磷酸钾缓冲液重悬,间隔相同时间检测并记录溶液 pH值。每组实验重复3次,计算平均值。

1.6 细菌脱矿能力检测

利用横断显微放射技术(transverse microradiography, TMR)检测菌株诱导牙体组织脱矿的能力^[17]。首先选择 肉眼观察表面光滑、平整一致且无裂痕无着色无缺损的 牛牙(汶川百瑞农业,中国),将其冠根切开。牙冠制备为 直径1 cm、高0.5 cm的类圆柱体,利用AB胶包埋样本。后 续使用砂纸在牙釉质面开窗,周围利用指甲油封闭,检测 显微硬度以淘汰已脱矿的样本。剩余的样本经高压蒸汽 灭菌处理后,在含有变异链球菌菌株(OD₆₀₀=0.5)的 BHIS培养基中培养24 h,后续每天更换新鲜的BHIS培养 基,持续5 d。将处理后的样本切割并打磨抛光至厚度为 100~150 nm,再利用横断面显微成像系统(SOFTEX)通 过与标准"铝阶"对比,利用软件(TMR 2012, Inspektor Research BV, Amsterdam, The Netherlands)计算样本脱矿 深度及脱矿量。

1.7 统计学方法

以上实验均重复3次,每次重复实验均设置3组平行 对照。组间差异使用单因素方差分析(ANOVA)进行比 较,两两差异用Student's t test进行比较, P<0.05为差异有 统计学意义。

结果 2

2.1 frtR缺失对变异链球菌生长的影响

如图1所示, $\Delta frtR$ 的生长曲线相较于UA159和 $\Delta frtR$ / pDL278-frtR,没有明显差异。这说明frtR缺失不影响变异 链球菌的生长。

2.2 frtR缺失对变异链球菌水不溶性EPS合成的影响

通过硫酸-蒽酮法定量检测水不溶性EPS,发现变异 链球菌UA159、ΔfrtR、ΔfrtR/pDL278-frtR之间水不溶性 EPS合成量无明显差异(图2A)。分别用不同的荧光染料 对生物膜中的变异链球菌和水不溶性EPS进行染色,在共 聚焦激光扫描显微镜下观察发现,变异链球菌UA159、ΔfrtR、 ΔfrtR/pDL278-frtR之间细菌生物量和水不溶性EPS含量 均无明显改变(图2B、图2C)。说明敲除frtR不影响变异 链球菌水不溶性EPS合成。

2.3 frtR缺失对变异链球菌产酸的影响

如图3A所示,在蔗糖作为唯一碳源时,ΔfrtR的菌液 pH值在7~19min时间段与UA159及∆frtR/pDL278-frtR的 差异有统计学意义(P<0.05)。当果糖或葡萄糖作为唯一 碳源时, ΔfrtR的菌液pH值与UA159和ΔfrtR/pDL278-





Fig 1 The growth curves of Streptococcus mutans (S. mutans) (n=3)

frtR之间无明显差异(图3B,图3C)。以上结果说明,蔗糖 作为唯一碳源时, 敲除frtR会延缓变异链球菌的产酸速率。 2.4 frtR缺失对变异链球菌诱导牙体组织脱矿能力的 影响

经变异链球菌UA159、ΔfrtR和ΔfrtR/pDL278-frtR处 理后的牙体组织都表现出明显的脱矿(图4A)。相比于 UA159和ΔfrtR/pDL278-frtR, ΔfrtR在牛牙牙体组织表面诱 导形成的脱矿深度和脱矿量均降低(P<0.05,图4B、4C)。 说明敲除frtR会减弱变异链球菌诱导牙体组织脱矿能力。



图 2 变异链球菌水不溶性EPS含量及生物膜形成

Fig 2 The water-insoluble EPS content and biofilm formation of S. mutans strains

A: Water-insoluble EPS content of biofilms quantified using the anthrone-sulfuric method (a: S. mutans UA159, b: S. mutans $\Delta frtR$, c: $\Delta frtR/pDL278$ -frtR, n=3); B: The biofilm dual-labeled images of EPS (red, Alexa Flour 647) and bacteria (green, SYTO 9), which were captured using a 60× oil immersion objective; C: The quantitative analysis of biofilms performed using COMSTAT and Image J (n=3).



Fig 3 Acid production of S. mutans under different growing conditions

Glycolytic pH drop of S. mutans solution with 1% sucrose (A), 1% fructose (B) and 1% glucose (C). n=3, *P<0.05, vs. UA159 and $\Delta frtR$ /pDL278-frtR.



图 4 变异链球菌菌株诱导牙釉质脱矿的检测结果 Fig 4 Measuring enamel demineralization induced by *S. mutans*

A: The cross-section of demineralized enamel by transverse microradiography (TMR); B: The mineral loss of enamel; C: The depth of enamel lesion. *n*=5, *****P*<0.01.

3 讨论

本研究发现frtR基因缺失会导致变异链球菌在蔗糖 环境中产酸能力下降以及诱导牙体组织脱矿能力显著降 低,说明frtR基因除了参与调控变异链球菌的氟化钠敏感 性^[15],还参与调控变异链球菌的产酸能力和诱导牙体组 织脱矿能力。

在齲病的发生发展过程中,细菌会代谢环境中的碳 水化合物产生酸性物质,环境的酸化是打破牙釉质脱矿 与再矿化平衡,诱导牙体组织脱矿能力的重要原因之 一^[18-19]。变异链球菌的产酸途径受到多种因素调控,转录 因子在其中起着重要的作用。研究发现,转录因子Rex可 以通过调控变异链球菌中乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)的表达影响丙酮酸转化乳酸途径^[20-21]。CcpA和 CodY直接调控变异链球菌中磷酸转乙酰酶(phosphotransacetylase, Pta)和乙酸激酶(acetokinase, Ack)的转录,从而 影响丙酮酸转化乙酸途径^[22]。在本研究中,敲除frtR会导 致变异链球菌产酸能力减弱,但根据前期研究中ΔfrtR的 转录组分析,敲除frtR对变异链球菌ldh、pta、ack的转录 表达均没有显著影响^[15],这说明frtR可能不是通过调控丙 酮酸转化为乳酸和乙酸途径关键酶的转录起作用。

TetR家族转录因子已被证明与多种细菌的毒力表型 相关^[23-25]。除此之外,研究发现TetR家族转录因子参与调 控脂肪酸、甘油、烟酸、苯乙酸和间苯二酚等不同碳分解 代谢途径^[25-28]。在前期研究中,我们发现与变异链球菌 UA159相比,ΔfrtR中有16个差异表达基因与碳水化合物 的转运和代谢相关,其中13个下调,3个上调^[15]。经过GO 富集分析发现,这16个差异表达基因又多与PEP-PTS相 关,例如smu.115(果糖特异性酶 II A)、smu.114(果糖特异 性酶 II BC)、smu.1961c(N-乙酰半乳糖胺特异性酶 II A)、 smu.1598(纤维二糖特异性酶 II A)、smu.1600(纤维二糖 特异性酶 II B)、smu.1596(纤维二糖特异性酶 II C)、 lacF(乳糖特异性酶 II A)和lacE(乳糖特异性酶 II BC)在 ΔfrtR中显著下调,而smu.100~smu.103(甘露糖特异性酶 II ABCD)显著上调^[15]。这提示frtR可能参与调控变异链 球菌碳水化合物转运及代谢途径。

综上所述,本研究发现TetR家族基因frtR与变异链球 菌产酸能力和诱导牙体组织脱矿的能力密切相关,进一 步说明frtR是一个潜在的抗龋作用靶点。在后续的研究 中,本课题组将会就碳水化合物的转运与代谢和变异链 球菌产酸及诱导牙体组织脱矿能力之间的分子机制进行 探究,并且进一步研究frtR调控碳水化合物的转运与代谢 的具体作用机制。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] MACHIULSKIENE V, CAMPUS G, CARVALHO J C, et al. Terminology of dental caries and dental caries management: Consensus report of a workshop organized by ORCA and cariology research group of IADR. Caries Res, 2020, 54(1): 7–14.
- [2] VALM A M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. J Mol Biol, 2019, 431(16): 2957–2969.
- [3] BOWEN W H, BURNE R A, WU H, et al. Oral biofilms: Pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. Trends Microbiol, 2018, 26(3): 229–242.
- [4] 陈婧,程磊,周学东,等. 龋病微生物因素研究进展. 华西口腔 医学杂志, 2018, 36(1): 104-108.
- [5] VADEBONCOEUR C, PELLETIER M. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. FEMS Microbiol Rev, 1997, 19(3): 187–207.
- [6] TAKAHASHI N. Oral microbiome metabolism: From "Who Are They"? to "What Are They Doing"? J Dent Res, 2015, 94(12): 1628–1637.
- [7] AJDIĆ D, MCSHAN W M, MCLAUGHLIN R E, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen.
 Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(22): 14434–14439.
- [8] ZENG L, BURNE R A. Molecular mechanisms controlling fructosespecific memory and catabolite repression in lactose metabolism by *Streptococcus mutans*. Mol Microbiol, 2021, 115(1): 70–83.
- [9] SEKIYA M, IZUMISAWA S, IWAMOTO-KIHARA A, et al. Protonpumping F-ATPase plays an important role in Streptococcus mutans under acidic conditions. Arch Biochem Biophys, 2019, 666: 46–51.
- [10] 吴攀攀,李博文,陈克涛,等.TetR家族转录调控因子配体的研究进 展.生物工程学报,2021,37(7):2379-2392.
- [11] WANG K, SYBERS D, MAKLAD H R, et al. A TetR-family transcription factor regulates fatty acid metabolism in the archaeal model organism *Sulfolobus acidocaldarius*. Nat Commun, 2019, 10(1): 1542.
- [12] GRAU F C, JAEGER J, GROHER F, et al. The complex formed between a synthetic RNA aptamer and the transcription repressor TetR is a structural and functional twin of the operator DNA-TetR regulator complex. Nucleic Acids Res, 2020, 48(6): 3366–3378.
- ZHOU S, BHUKYA H, MALET N, *et al.* Molecular basis for control of antibiotic production by a bacterial hormone. Nature, 2021, 590(7846): 463–467.
- [14] 倪静姝, 汪焰胜, 吴杭, 等. 放线菌中与抗生素合成相关TetR家族转录 因子的研究进展. 微生物学通报, 2019, 46(2): 407-414.
- [15] LU M, XIANG Z, GONG T, et al. Intrinsic fluoride tolerance regulated

by a transcription factor. J Dent Res, 2020, 99(11): 1270–1278.

- [16] VIJAYAKUMAR K, MUHILVANNAN S. 3, 5-Di-tert-butylphenol combat against *Streptococcus mutans* by impeding acidogenicity, acidurance and biofilm formation. World J Microbiol Biotechnol, 2021, 37(12): 202.
- [17] FAN M, ZHANG M, XU H, *et al.* Remineralization effectiveness of the PAMAM dendrimer with different terminal groups on artificial initial enamel caries *in vitro*. Dent Mater, 2020, 36(2): 210–220.
- [18] ABRANCHES J, ZENG L, KAJFASZ J K, et al. Biology of oral Streptococci. Microbiol Spectr, 2018, 6(5): 10.1128/microbiolspec. GPP3-0042-2018.
- [19] PITTS N B, ZERO D T, MARSH P D, et al. Dental caries. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17030[2021-10-15]. https://www.nature.com/articles/ nrdp201730. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.
- [20] BITOUN J P, WEN Z T. Transcription factor Rex in regulation of pathophysiology in oral pathogens. Mol Oral Microbiol, 2016, 31(2): 115-124.
- [21] BITOUN J P, LIAO S, YAO X, et al. The redox-sensing regulator Rex modulates central carbon metabolism, stress tolerance response and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. PLoS One, 2012, 7(9): e44766[2021-10-15]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044766.
- [22] KIM J N, BURNE R A. CcpA and CodY coordinate acetate metabolism in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(7): e03274– 16[2021-10-15]. https://doi.org/10.1128/AEM.03274-16.
- [23] COLCLOUGH A L, SCADDEN J, BLAIR J M A. TetR-family transcription factors in Gram-negative bacteria: conservation, variation and implications for efflux-mediated antimicrobial resistance. BMC Genomics, 2019, 20(1): 731.
- [24] SARANATHAN R, PAGAL S, SAWANT A R, et al. Disruption of tetR type regulator adeN by mobile genetic element confers elevated virulence in Acinetobacter baumannii. Virulence, 2017, 8(7): 1316–1334.
- [25] DONG W, NIE X, ZHU H, et al. Mycobacterial fatty acid catabolism is repressed by FdmR to sustain lipogenesis and virulence. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(16): e2019305118[2021-10-15]. https://doi.org/10.1073/ pnas.2019305118.
- [26] CHRISTEN S, SRINIVAS A, BÄHLER P, et al. Regulation of the Dha operon of *Lactococcus lactis*: A deviation from the rule followed by the Tetr family of transcription regulators. J Biol Chem, 2006, 281(32): 23129–23137.
- [27] JIMÉNEZ J I, JUÁREZ J F, GARCÍA J L, et al. A finely tuned regulatory circuit of the nicotinic acid degradation pathway in *Pseudomonas putida*. Environ Microbiol, 2011, 13(7): 1718–1732.
- [28] CHENG M, PEI D, HE X, et al. The operon encoding hydrolytic dehalogenation of 4-chlorobenzoate is transcriptionally regulated by the TetR-type repressor FcbR and its ligand 4-chlorobenzoyl coenzyme A. Appl Environ Microbiol, 2021, 87(6): e02652-20[2021-10-15]. https:// doi.org/10.1128/AEM.02652-20.

(2021-10-14收稿, 2021-12-14修回) 编辑 余 琳