

脂磷壁酸合成相关基因 *dltD* 对高致龋力 变异链球菌株耐酸能力的影响*

杜景云¹, 吴敏婧^{1,2}, 李艺君¹, 黄珊¹, 江山^{1,3}, 陈帅¹, 黄晓晶^{1△}

1. 福建省口腔疾病研究重点实验室, 福建省口腔生物材料工程技术研究中心, 福建省高校口腔医学重点实验室, 福建医科大学口腔医学院/附属口腔医院 牙体牙髓一科(福州 350000); 2. 南方医科大学口腔医院 牙体牙髓科(广州 510000); 3. 南方医科大学深圳口腔医院(坪山) 牙体牙髓科(深圳 518000)

【摘要】目的 通过构建变异链球菌593(*Streptococcus mutans* 593, SM593)*dltD*基因缺失株,探究*dltD*在SM593耐酸能力中的作用和可能机制,为龋病的生态防治提供理论依据。**方法** ①同源重组构建SM593 *dltD*基因缺失株SM593- Δ *dltD*;②采用全自动生长曲线分析仪绘制在不同pH培养条件下SM593和SM593- Δ *dltD*的生长曲线,比较二者耐酸能力;通过SM593和SM593- Δ *dltD*不同时间点的菌落计数(colony forming unit, CFU)计算其生存率并比较二者耐酸反应(acid tolerance response, ATR)能力;③通过不同pH条件下的糖酵解能力检测、质子通透性检测、质子移位膜腺苷三磷酸酶(H^+ -ATPase)活性检测初步探究*dltD*基因缺失影响耐酸的可能机制。**结果** ①PCR及测序结果显示SM593 *dltD*基因缺失株构建成功;②随着培养基pH逐渐降低,SM593- Δ *dltD*生长减缓,当培养基pH=5.0时无法生长,与SM593相比耐酸能力下降;SM593- Δ *dltD*与SM593相比ATR能力下降;③不同pH条件下,SM593- Δ *dltD*与SM593相比,糖酵解能力无明显差异,质子通透性增加($P<0.05$), H^+ -ATPase活性下降($P<0.05$)。**结论** *dltD*基因缺失株较原始株相比耐酸能力明显下降,可能是由于*dltD*基因缺失导致质子通透性显著增强、 H^+ -ATPase活性显著降低,从而使菌株维持胞内pH稳态能力下降所致。

【关键词】 变异链球菌 *dltD* 耐酸

Effect of Lipoteichoic Acid Synthesis-Related Gene *dltD* on Acid Tolerance of Highly Cariogenic Strains of *Streptococcus mutans* DU Jing-yun¹, WU Min-jing^{1,2}, LI Yi-jun¹, HUANG Shan¹, JIANG Shan^{1,3}, CHEN Shuai¹, HUANG Xiao-jing^{1△}. 1. Fujian Provincial Key Laboratory of Oral Diseases, Fujian Provincial Engineering Research Center of Oral Biomaterial, Key Lab of Stomatology for Higher Education Institutions in Fujian Province, and Cariology and Endodontics Department I, School/Hospital of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350000, China; 2. Department of Cariology and Endodontics, Southern Medical University Stomatological Hospital, Guangzhou 510000, China; 3. Department of Cariology and Endodontics, Shenzhen Stomatology Hospital of Southern Medical University (Pingshan), Shenzhen 518000, China

△ Corresponding author, E-mail: xiaojinghuang@fjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the role and possible mechanism of *dltD* in the acid tolerance of *Streptococcus mutans* 593 (SM593), and to provide a theoretical basis for the ecological prevention and control of dental caries by constructing the *dltD* gene deletion strain of SM593 (SM593- Δ *dltD*). **Methods** 1) SM593- Δ *dltD* was constructed by homologous recombination. 2) The growth curve of SM593 *dltD* and SM593- Δ *dltD* under different pH culture conditions was drawn by the automatic growth curve analyzer to compare their acid tolerance. Colony forming unit (CFU) at different time points was used to calculate the survival rate and to compare the acid tolerance response (ATR) of SM593 and SM593- Δ *dltD*. 3) Under different pH conditions, glycolysis experiments, proton permeability test and H^+ -ATPase activity test were conducted to make preliminary exploration into the mechanisms of how *dltD* gene deletion may affect acid tolerance. **Results** 1) PCR and sequencing results showed that the SM593- Δ *dltD* was constructed successfully. 2) With decreasing pH value of the culture medium, the growth of SM593- Δ *dltD* slowed down. When the pH value of the culture medium was 5.0, SM593- Δ *dltD* was not allowed to grow, and its acid tolerance was lower than that of SM593. Compared with SM593, the ATR capability of SM593- Δ *dltD* was decreased. 3) SM593 *dltD* and SM593- Δ *dltD* did not show obvious difference in their glycolysis ability under different pH conditions. Compared with SM593 *dltD*, the proton permeability of SM593- Δ *dltD* under different pH conditions was increased significantly ($P<0.05$), and H^+ -ATPase activity decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with SM593 *dltD*, SM593- Δ *dltD* showed obvious decrease in acid tolerance, which may be caused by the significant increase in proton permeability and significant decrease in the H^+ -

* 国家自然科学基金(No. 81600861)和闽江学者科研启动基金(No. 2018-KQMJ-01)资助

△ 通信作者, E-mail: xiaojinghuang@fjmu.edu.cn

ATPase activity induced by the deletion of the *dltD* gene, hence reducing its ability to maintain intracellular pH homeostasis.

【Key words】 *Streptococcus mutans* *dltD* Acid tolerance

龋病是最常见的口腔流行病之一^[1],第四次全国口腔健康流行病学调查报告显示,我国35岁以上人群患龋率高达89%以上^[2]。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S.mutans* or *SM*)是龋病发生的关键病原菌之一^[3],同时具备产酸和耐酸能力,能够适应牙菌斑生物膜内pH快速且极端变化,在酸性环境中持续生存、代谢产酸,最终导致牙体硬组织脱矿、龋齿形成^[4]。*SM*耐酸能力包括两个部分:固有耐酸能力、耐酸反应(acid tolerance response, ATR)能力。ATR是指诱导的耐酸能力,即通过将指数生长期的细菌置于亚致死性pH环境中生长,从而提高其在致死性pH环境中的生存率^[5]。*SM*的耐酸机制主要包括以下几方面:细胞内pH稳态维持、新陈代谢改变、大分子的保护与修复和双组分感应系统调控^[6]。

脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)是革兰阳性菌细胞壁的重要组成成分,也是革兰阳性菌重要的表面抗原,有助于维持细菌膜稳态和毒力^[7]。不同菌株的LTA侧链取代基不同,D-丙氨酸(D-alanine, D-Ala)是*SM*胞壁LTA侧链的主要取代基^[8]。D-Ala通过*dlt*操纵子调控的D-丙氨酰化掺入LTA,*dlt*操纵子由*dltA*、*dltB*、*dltC*、*dltD*四个基因组成,目前*dltA*、*dltB*和*dltC*的功能已明确,但*dltD*的功能尚未明确^[9]。近年有学者发现,在大鼠的龋病模型中,*SM* UA159 *dltD*变异株与原始株相比致龋力显著下降,体外实验结果显示该变异株对氧化应激的耐受能力明显下降^[10],据此推测*dltD*可能参与调节*SM*对外界环境压力的耐受。*SM*致龋力包括形成生物膜的能力、产酸能力及耐酸能力^[9],其中耐酸能力与其对外界环境压力耐受密切相关。

本课题组前期分别从高龋患者(龋失补指数 ≥ 6 且龋失补牙面数 ≥ 10 ,并且有两个以上未充填的龋洞)和无龋健康人(龋失补指数=0)口内分离获得血清C型*SM*临床株593号(*Streptococcus mutans* 593, *SM*593)和*SM*临床株18号(*Streptococcus mutans* 18, *SM*18)^[11],通过一系列体外致龋力实验比较发现,*SM*593致龋能力明显强于*SM*18,经强酸处理后*SM*593活菌数明显多于*SM*18^[12]。前期预实验结果显示*SM*593 *dltD*表达量显著高于*SM*18,据此推测,高致龋力株*SM*593的耐酸能力与*dltD*有关。

本研究通过构建*SM*593 *dltD*基因缺失株,探究*dltD*对*SM*593耐酸能力的影响,并从细胞内pH稳态维持和新陈代谢改变方面初步探究其影响耐酸的机制,为阐明*dltD*在*SM*中的功能以及*SM*的耐酸机制提供理论依据,为

龋病生态防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂:2×Taq PCR master Mix(Biomiga, 中国);BHI培养基(OXIOD, 英国);DNA纯化试剂盒(New England Biolabs, 美国);Luria-Bertani(LB)培养基(OXIOD, 英国);*T*₄ DNA连接酶(New England Biolabs, 美国);Taq DNA Polymerase(New England Biolabs, 美国);感受态刺激肽(competent stimulating peptide, CSP)(上海生工生物, 中国);马血清(Solarbio, 中国);细菌基因组提取试剂盒(Zymo Research, 美国);质粒小提试剂盒(Zymo Research, 美国);壮观霉素(spectinomycin, spe)(Sigma公司, 美国);甘氨酸(麦克林, 中国);Tris-HCl缓冲液(弗得生物, 中国);丁醇(汕头市西陇化工, 中国);甲苯(汕头市西陇化工, 中国);磷酸钾缓冲液(弗得生物, 中国);硫酸镁溶液(MgSO₄, 弗得生物, 中国);氯化钾(KCl, 弗得生物, 中国);氯化镁溶液(MgCl₂, 弗得生物, 中国);氢-钾ATP酶测试盒(南京建成, 中国);氢氧化钾(KOH, 汕头市西陇化工, 中国)。

主要仪器:PCR仪(ABI2720, Applied Biosystems, 美国);低温高速离心机(CF16R XII, 日本日立工机有限公司, 日本);电泳仪(DYCP-31CN, 北京六一生物科技有限公司, 中国);多功能酶标仪(SpectraMaxM5e, 美国);恒温摇床(NRT-100B, 上海培因实验仪器有限公司, 中国);凝胶成像系统(BIODOC-IT-220, UVP公司, 中国);全自动生长曲线分析仪(Bioscreen C MBR, 芬兰);细菌厌氧培养箱(DG250, Don Whitley Scientific, 英国);紫外可见分光光度计(UV-5200, 上海元析仪器有限公司, 中国);pH计[FE28, 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司, 中国]。

1.2 菌株及培养条件

本实验所用菌株血清C型*SM*593临床株(四川大学华西口腔医学院惠赠并由本实验室保存,*SM*593来源如前所述^[11-12])采用BHI液体培养基培养。基因缺失菌株采用含1 mg/mL spe的BHI液体培养基培养。*SM*593的培养条件为37℃厌氧培养(厌氧混合气体含体积分数10% CO₂、10% H₂、80% N₂)。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) DH5 α (New England Biolabs, 美国)采用含0.1 mg/mL spe的LB液体培养基培养。*E. coli*培养条件为37℃、200 r/min

振荡, 需氧培养。

1.3 SM593 *dltD*基因缺失株的构建

SM593 *dltD*序列与SM UA159序列一致, 因此参考NCBI提供的SM UA159全基因组序列, 利用Premier 5.0软件设计SM593 *dltD*基因上、下游引物(表1)。采用PCR扩增SM593 *dltD*基因上、下游片段, 琼脂糖凝胶电泳确定片段大小无误后, 分别对片段进行双酶切, 经过纯化后, 分别在T₄ DNA连接酶作用下与pFW5质粒(森灵质粒平台)进行连接, 并使用*E. coli* DH5 α 感受态细胞进行转化。采用含0.1 mg/mL spe的LB培养基过夜培养, 筛选阳性克隆。提取阳性克隆的质粒进行测序鉴定。使用终质量浓度1 mg/mL的CSP刺激SM593, 同时加入10 μ g线性化质粒混合均匀, 进行转化。转化完成后, 梯度稀释上述菌液, 并涂布于含1 mg/mL spe的BHI琼脂平板, 厌氧培养, 筛选阳性克隆。提取阳性克隆的DNA进行PCR及测序鉴定。将得到的SM593 *dltD*基因缺失株命名为SM593- Δ *dltD*。

1.4 不同pH条件下SM593和SM593- Δ *dltD*生长曲线测定

分别复苏SM593及SM593- Δ *dltD*, 挑取单菌落置于5 mL BHI液体培养基中过夜培养。分别将过夜培养的菌液与不同pH(7.5、6.0、5.5、5.0)BHI液体培养基以体积比1:20接种, 取200 μ L混合后的菌液于全自动生长曲线分析仪, 参数设置为波长600 nm, 每隔0.5 h检测一次光密度(optical density, OD)值, 时长24 h, 采用等体积的BHI培养基作为空白对照。Graphpad Prism 8.0绘制生长曲线。

1.5 SM593和SM593- Δ *dltD* ATR能力检测

菌株复苏及培养同前。取指数生长中期菌液, 4 000 r/min、4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清液。酸诱导组加入等体积的BHI液体培养基(pH=5.5)重悬, 直接酸化组加入等体积的BHI液体培养基(pH=7.5)重悬, 培养2 h后离心, 弃上清液, PBS漂洗。置于甘氨酸缓冲液(0.1 mol/L, pH3.5)每隔15 min取50 μ L梯度稀释涂板计数, 计算细菌

随时间变化的生存率。

1.6 不同pH条件下SM593和SM593- Δ *dltD*糖酵解能力检测

菌株复苏及培养同前。取指数生长中期菌液, PBS漂洗后重悬于不同pH(pH=7.5、pH=5.5)的0.5 mmol/L磷酸钾缓冲液(含1.25 mmol/L MgCl₂和37.5 mmol/L KCl)中, 调整OD_{600 nm} \approx 0.5。加入终浓度为1%(W/V)葡萄糖, 在120 min内以15 min为间隔监测pH值, 根据不同时间点测得的pH值绘制糖酵解曲线。

1.7 不同pH条件下SM593和SM593- Δ *dltD*质子通透性检测

菌株复苏及培养同前。取平台生长期菌液离心, 去培养基, 记录菌体质量。5 mmol/L MgCl₂清洗1次, 以5 mg/mL的质量浓度重悬于PBS缓冲液(pH=7.4, 含50 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl₂), 37 $^{\circ}$ C孵育2 h后离心, 弃上清, 以20 mg/mL重悬于不同pH(pH=7.5、pH=5.5)PBS缓冲液(含50 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl₂)。用100 mmol/L HCl(或KOH)将菌液调至pH4.5以下, 取5 mL菌液, 每10 min测量菌液pH。在50 min时加入终浓度10%的丁醇, 使细胞内外达到pH平衡。80 min时记录最终pH。

1.8 不同pH条件下SM593和SM593- Δ *dltD* H⁺-ATPase活性检测

菌株复苏及培养同前。分别绘制细菌干重与OD_{600 nm}值关系曲线: 取指数生长中期的菌液, 4 $^{\circ}$ C离心, 去培养基, 收集菌体; 用75 mmol/L Tris-HCl(pH=7.0, 含10 mmol/L MgSO₄)缓冲液洗涤2次, 重悬于10 mL 75 mmol/L Tris-HCl(pH=7.0, 含10 mmol/L MgSO₄)缓冲液; 取5 mL菌液放置于已称重的干净离心管中, 放于烤箱中, 烤干称重(W₂, 单位: mg), 细菌干重=W₂-W₁, W₁为干净离心管的质量(单位: mg); 剩余的5 mL菌液稀释成各种浓度, 测定其在600 nm处的吸光度; 以菌液细胞

表1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this experiment

| Primer name | Sequence | Application |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>dltD</i> -up-F | 5'-CGGATCCCGTTTTATGCTGTTTATGCCTACT-3' | 5' fragment for <i>dltD</i> mutation |
| <i>dltD</i> -up-R | 5'-CCCAAGCTTAAACTGGCCCCAAAATCAACC-3' | |
| <i>dltD</i> -down-F | 5'-CCCATGGGGGCCACTTATACTGGTAATCCT-3' | 3' fragment for <i>dltD</i> mutation |
| <i>dltD</i> -down-R | 5'-CCCCGGGACAGCTCTCACCCTCTTTCA-3' | |
| <i>dltD</i> -in-F | 5'-TGGTTCGTTCCAAAGGGGAC-3' | <i>dltD</i> sequencing confirmation |
| <i>dltD</i> -in-R | 5'-CGATCCGCTGTACTTCCTGT-3' | |
| <i>aad9</i> -F | 5'-TTGGATCAGGAGTTGAGAGTGGAC-3' | spe sequencing confirmation |
| <i>aad9</i> -R | 5'-GCCACTGCATTTCCCGCAATATCT-3' | |

质量浓度(mg/mL)为横坐标,以吸光度为纵坐标,做出细胞干重与吸光度的关系曲线。 H^+ -ATPase活性检测前,取指数生长中期的菌液,4℃离心,去培养基,收集菌体;75 mmol/L Tris-HCl(pH=7.0,含10 mmol/L $MgSO_4$)缓冲液洗涤2次,离心,去上清,保存于-80℃冰箱备用。使用前于-80℃冰箱取出,室温下融化,重悬在20 mL、75 mmol/L Tris-HCl(pH=7.0,含10 mmol/L $MgSO_4$)缓冲液中,加入0.2 mL甲苯,震荡90 s后,离心,除去上层悬浮物。将菌体重悬于不同pH值(pH=7.5、pH=5.5)75 mmol/L Tris-HCl(含10 mmol/L $MgSO_4$)中,吸取2 mL菌液,测量菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,根据细菌干重与吸光度曲线的关系,用于推算菌液浓度。将上述制备好的细胞按照氢-钾ATP酶测试盒说明书进行操作。将测定出的结果代入公式:ATPase活力=(测定管OD值-对照管OD值)÷标准管OD值×0.1 $\mu\text{mol} \times 6 \div$ 细菌干重,计算得到 H^+ -ATPase活力值。

1.9 统计学方法

以上实验均每组设置3个样本,重复3次。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SM593- $\Delta dltD$ 鉴定结果

SM593 *dltD*基因缺失株鉴定结果显示,BHI琼脂平板

内长出具有spe抗性的菌落为疑似*dltD*基因缺失株(图1A);采用引物*dltD*-in-F/R进行PCR,产物琼脂糖凝胶电泳结果(图1Ba)显示PCR产物大小491 bp,第7、9泳道菌株为疑似*dltD*基因缺失株;采用*dltD*-in-F/R和*aad9*-F/R进行PCR,产物琼脂糖凝胶电泳结果(见图1Bb)显示1、2泳道模板DNA为SM593- $\Delta dltD$,引物依次为*dltD*-in-F/R(产物大小491 bp)和*aad9*-F/R(产物大小535 bp),3、4泳道模板DNA为SM593,引物依次为*dltD*-in-F/R和*aad9*-F/R,5、6泳道分别为*dltD*-in-F/R和*aad9*-F/R的阴性对照,结果显示上述步骤选取的疑似*dltD*基因缺失株基因组*dltD*完全被spe抗性基因取代;对上述结果筛选出的疑似*dltD*基因缺失株测序结果显示同PCR结果一致,SM593 *dltD*基因缺失株SM593- $\Delta dltD$ 构建成功(图1C)。

2.2 不同pH条件下SM593- $\Delta dltD$ 生长曲线

随着培养基pH逐渐下降,SM593- $\Delta dltD$ 的生长速率减缓,到达平台期时的 $OD_{600\text{ nm}}$ 明显下降,当培养基pH=5.0时,SM593能够继续生长,SM593- $\Delta dltD$ 则无法继续生长(图2)。与SM593相比,SM593- $\Delta dltD$ 耐酸能力下降。

2.3 SM593- $\Delta dltD$ ATR能力检测结果

在致死性酸作用下,SM593与SM593- $\Delta dltD$ 的生存率均出现下降,在每个检测时间点SM593- $\Delta dltD$ 的生存率均低于SM593;经酸诱导后,SM593与SM593- $\Delta dltD$ 的生存率均增加,但SM593- $\Delta dltD$ 的酸诱导组在45 min时的生存率

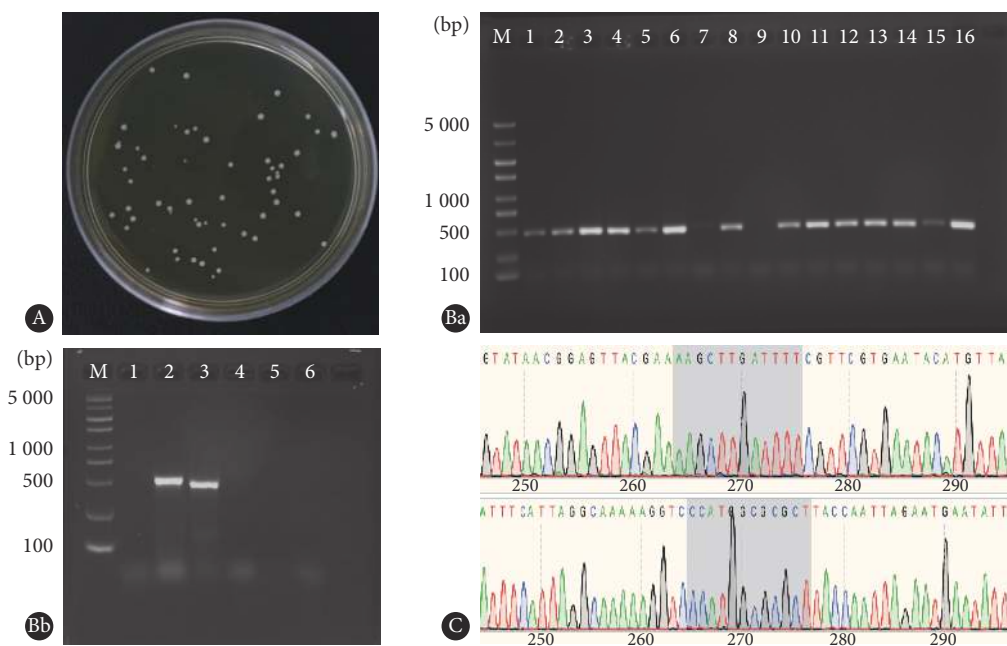


图1 SM593 *dltD*基因缺失株鉴定结果

Fig 1 Identification result of SM593 *dltD* gene deletion strain

A: Positive re-cloning screening (containing 1 g/L spectinomycin); Ba: The gel electrophoresis result of the suspected *dltD* gene deletion strain is primarily screened by PCR; Bb: The gel electrophoresis result of the suspected *dltD* gene deletion strain is verified by PCR; C: BLAST results of sequencing of suspected *dltD* gene deletion strains.

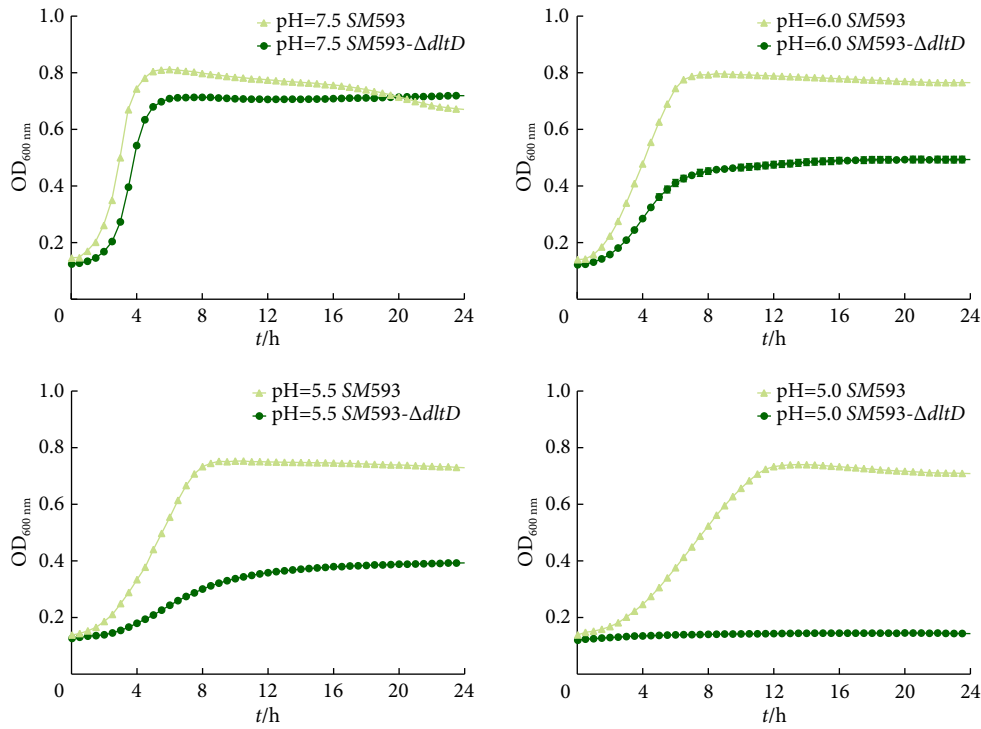


图 2 SM593和SM593- $\Delta dltD$ 在不同pH的BHI培养基中的生长曲线 ($n=3$)

Fig 2 Growth curves of SM593 and SM593- $\Delta dltD$ in BHI medium of different pH values ($n=3$)

比SM593的酸诱导组下降3个log值, 表明与SM593相比SM593- $\Delta dltD$ ATR能力下降(图3)。

2.4 不同pH条件下SM593- $\Delta dltD$ 糖酵解能力检测结果

在pH=7.5的条件下SM593和SM593- $\Delta dltD$ 在120 min的pH均值分别为3.72和3.96, 在pH=5.5的条件下SM593和SM593- $\Delta dltD$ 在120 min的pH均值分别为3.41和3.71, 由此可见在上述pH条件下SM593- $\Delta dltD$ 均具备糖酵解能力, 且均能够将环境pH值降至4.0以下, 二者糖酵解能力没有显著差异(图4)。

2.5 不同pH条件下SM593- $\Delta dltD$ 质子通透性检测结果

在pH=7.5和pH=5.5的条件下SM593- $\Delta dltD$ 的终末pH值均低于SM593 ($P < 0.05$), 该结果表明在相同的时间内流入SM593- $\Delta dltD$ 的质子量大于SM593, 因此SM593- $\Delta dltD$ 的质子通透性强于SM593(图5)。

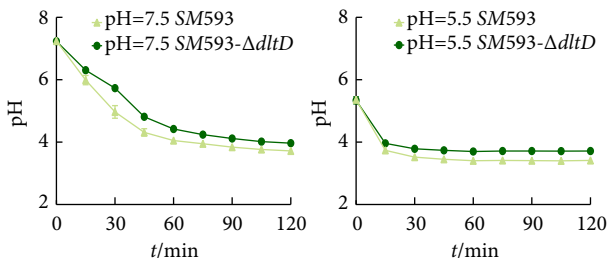


图 4 SM593和SM593- $\Delta dltD$ 在不同pH条件下糖酵解能力比较 ($n=3$)
Fig 4 Comparison of glycolysis abilities of SM593 and SM593- $\Delta dltD$ at different pH values ($n=3$)

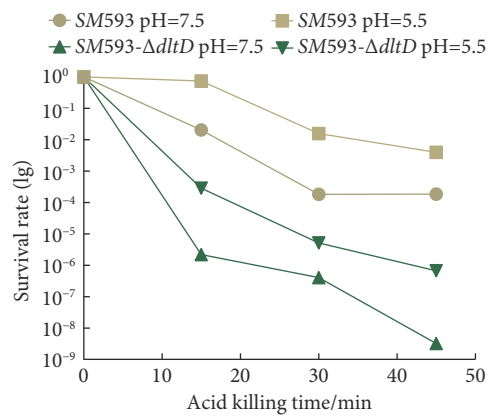


图 3 SM593和SM593- $\Delta dltD$ 耐酸反应能力比较 ($n=3$)

Fig 3 Comparison of acid tolerance response between SM593 and SM593- $\Delta dltD$ ($n=3$)

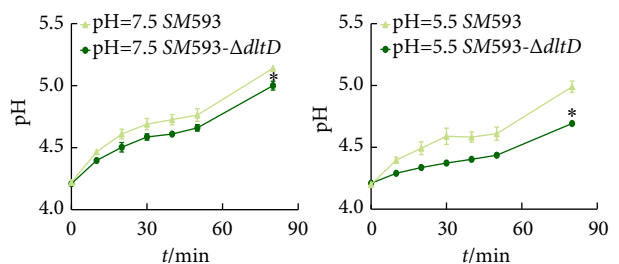


图 5 SM593和SM593- $\Delta dltD$ 在不同pH条件下质子通透性比较 ($n=3$)
Fig 5 Comparison of proton permeability of SM593 and SM593- $\Delta dltD$ at different pH conditions ($n=3$)

* $P < 0.05$, vs. SM593 at the same time.

2.6 不同pH条件下SM593- $\Delta dltD$ H⁺-ATPase活性检测结果

在不同的pH条件下SM593- $\Delta dltD$ 的H⁺-ATPase活力值均小于SM593($P < 0.05$)。该结果表明与SM593相比, SM593- $\Delta dltD$ H⁺-ATPase活性降低(图6)。

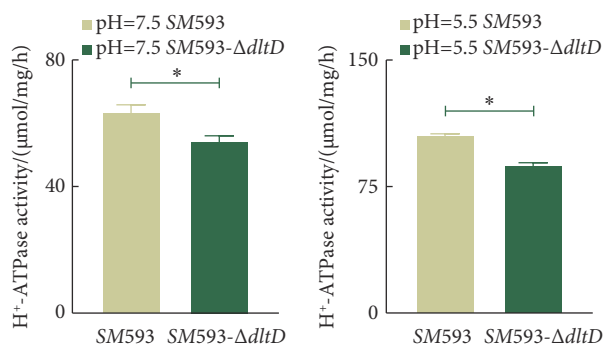


图6 SM593和SM593- $\Delta dltD$ 在不同pH条件下H⁺-ATPase活性比较 ($n=3$)

Fig 6 Comparison of H⁺-ATPase activities between SM593 and SM593- $\Delta dltD$ under different pH conditions ($n=3$)

* $P < 0.05$.

3 讨论

*dlt*操纵子调控SM胞壁LTA的D-丙氨酰化,由*dltA*、*dltB*、*dltC*、*dltD*四个基因组成。*dltA*、*dltB*、*dltC*、*dltD*分别编码不同的蛋白,参与SM胞壁LTA的D-丙氨酰化过程^[13]。有学者在SM中发现,*dltC*失活后无法在pH低于6.5的培养基中生长,ATR结果显示,经亚致死的酸诱导后其在致死性pH条件下的生存率明显低于原始株^[14]。低pH条件下*dlt*操纵子表达上调可能是细菌耐酸反应的一部分^[10],当戈登链球菌处于酸性环境中时,其*dlt*操纵子表达显示出上调趋势^[15]。据此推测,本实验中*dltD*缺失导致酸性条件下菌株*dltD*表达无法上调,因此耐酸能力下降。

SM在低pH条件下持续进行糖酵解是其重要的耐酸机制之一^[16]。糖酵解需要相对稳定的内环境,当外界pH较低时,细菌细胞内外将产生质子梯度差,为维持细菌细胞内相对稳定的内环境,SM通过降低膜的质子通透性阻挡质子内流,同时增强H⁺-ATPase活性,将质子转运到细胞外^[17]。通过上述机制SM能够维持细胞内环境稳态,保持相对碱性的胞质pH,以保护糖酵解相关蛋白酶和胞内正常生理活动^[17]。本实验从胞内pH稳态维持和糖酵解方面对*dltD*基因的耐酸机制进行初步探究,结果表明在不同的pH条件下,SM593- $\Delta dltD$ 表现出质子通透性增强、H⁺-ATPase活性降低的特点。

*dltD*参与LTA D-丙氨酰化^[11],LTA D-丙氨酰化可通过增加细胞壁密度的方式减少阳离子抗菌肽渗透进入细

胞^[18]。*dltD*缺失可能导致LTA D-丙氨酰化程度降低、细胞壁密度降低,使得SM593- $\Delta dltD$ 表现出质子通透性增强的特点。另外,质子通透性还与细胞膜脂肪酸比例有关,细胞膜不饱和脂肪酸比例越高,细胞的质子通透性越强^[19]。H⁺-ATPase活性也与细胞膜脂肪酸比例有关,细胞膜不饱和脂肪酸比例越高,H⁺-ATPase活性越低。在双歧杆菌中发现,其在平台期的耐酸能力强于指数生长期,通过对两种生长期细菌胞膜脂肪酸检测发现,指数生长期细胞膜不饱和脂肪酸比例较平台期高,H⁺-ATPase活性呈下降趋势^[20]。H⁺-ATPase是位于细胞膜上的一种应激蛋白,能够将质子转运到细胞外,与细胞外环境相比,可以使细菌胞内保持相对碱性的胞质pH环境^[21]。SM ATR机制的研究表明,SM能够改变其在酸性条件下的生理状态并长期在酸性环境中生存与H⁺-ATPase密切相关^[16]。由此可见,*dltD*缺失导致菌株质子通透性增强,质子内流量增多,与此同时H⁺-ATPase活性下降,细菌泵出质子能力下降,不利于细菌维持胞内相对碱性的pH环境,因此耐酸能力下降。

虽然本实验结果显示SM593- $\Delta dltD$ 维持细胞内pH稳态的能力下降,但是不同pH条件下其糖酵解能力与SM593相比并未发生明显改变。糖酵解属于SM的初级代谢,对维持细菌的生存具有非常重要的作用。SM糖摄入系统主要包括两种:磷酸转移酶系统(phosphatase transfer system, PTS)、非磷酸转移酶系统(non-phosphatase transfer system, NPTS)^[22]。葡萄糖通过PTS系统进入细胞质,在指数生长期会诱导*dlt*操纵子表达^[23]。糖酵解过程中的相关蛋白酶也会受到酸性环境的影响,有研究证明糖酵解过程的关键酶烯醇化酶最适pH为7.8,但该酶最适pH会随环境pH的降低而改变,当SM在pH5.5的条件下生长时,该酶的最适pH会根据环境调整为7.0^[23]。此外,糖酵解相关的其他酶类在酸性环境中呈现表达上调趋势,例如SM LT11在pH 5.0环境下葡萄糖激酶上调2.1倍,葡萄糖-6-磷酸异构酶上调了2倍,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^[24]。综上所述,*dltD*缺失后*dltA*、*dltB*、*dltC*可能被诱导表达以代偿*dltD*的功能;酸性条件下糖酵解相关蛋白酶也可出现上调,推测二者共同维持了SM593- $\Delta dltD$ 的糖酵解能力,因此在本实验中并未检测到SM593- $\Delta dltD$ 糖酵解能力发生改变。

本文初步探究了*dltD*在SM中的功能,结果表明*dltD*缺失后,菌株质子通透性增强、H⁺-ATPase活性降低,导致SM593耐酸能力下降。耐酸能力是SM重要的致病力之一,可维持SM在酸性环境中存活并持续代谢产酸,从而破坏脱矿和再矿化平衡,最终导致釉质脱矿龋病发

生。已有研究证明,在大鼠的龋病模型中,SM UA159 *dltD* 变异株与原始株相比致龋力显著下降^[10],本实验结果证明 *dltD* 缺失后高致龋力株 SM593 耐酸能力下降,因此 *dltD* 可作为潜在的防龋药物调控靶点,以减少龋病的发生。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 冯希平. 中国居民口腔健康状况—第四次中国口腔健康流行病学调查报告. 西安: 中华口腔医学会第十八次口腔预防医学学术年会论文集汇编, 2018: 2.
- [3] LEMOS J A, PALMER S R, ZENG L, *et al*. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(1): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
- [4] ZHU W, LIU S, ZHUANG P, *et al*. Characterization of acid-tolerance-associated small RNAs in clinical isolates of *Streptococcus mutans*: Potential biomarkers for caries prevention. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9242-9250.
- [5] BOISEN G, DAVIES J R, NEILANDS J. Acid tolerance in early colonizers of oral biofilms. *BMC Microbiol*, 2021, 21(1): 45.
- [6] MATSUI R, CVITKOVITCH D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol*, 2010, 5(3): 403-417.
- [7] WEI Y, JOYCE L R, WALL A M, *et al*. *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis*, and *S. oralis* produce a phosphatidylglycerol-dependent, *ltaS*-independent glycerophosphate-linked glycolipid. *MSphere*, 2021, 6(1): e01099-20[2021-08-23]. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSphere.01099-20>. doi: 10.1128/mSphere.01099-20.
- [8] RISMONDO J, GILLIS A, GRÜNDLING A. Modifications of cell wall polymers in Gram-positive bacteria by multi-component transmembrane glycosylation systems. *Curr Opin Microbiol*, 2021, 60: 24-33[2021-08-23]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527421000138>. doi: 10.1016/j.mib.2021.01.007.
- [9] WOOD B M, SANTA MARIA J P, MATANO L M, *et al*. A partial reconstitution implicates DltD in catalyzing lipoteichoic acid d-alanylation. *J Biol Chem*, 2018, 293(46): 17985-17996.
- [10] CASTILLO PEDRAZA M C, ROSALEN P L, DE CASTILHO A R F, *et al*. Inactivation of *Streptococcus mutans* genes *LytST* and *dltAD* impairs its pathogenicity *in vivo*. *J Oral Microbiol*, 2019, 11(1): 1607505[2021-08-23]. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20002297.2019.1607505>. doi: 10.1080/20002297.2019.1607505.
- [11] 黄晓晶,刘天佳,陈国弟,等. 变形链球菌(血清型C)临床分离株 AP-PCR 基因分型. *中华口腔医学杂志*, 2001, 36(4): 281-284.
- [12] 江山. 变异链球菌生物膜致龋差异初步研究. 福州: 福建医科大学, 2010.
- [13] RAJAGOPAL M, WALKER S. Envelope structures of gram-positive bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 404: 1-44.
- [14] YIN J, MENG Q, CHENG D, *et al*. Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(9): 3771-3780.
- [15] BOYD D A, CVITKOVITCH D G, BLEIWEIS A S, *et al*. Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J Bacteriol*, 2000, 182(21): 6055-6065.
- [16] MCCORMICK N E, HALPERIN S A, SONG F, *et al*. Regulation of D-alanylation of lipoteichoic acid in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology*, 2011, 157(8): 2248-2256.
- [17] BEDOYA-CORREA C M, RINCÓN RODRÍGUEZ R J, PARADA-SANCHEZ M T. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *J Oral Biosci*, 2019, 61(1): 22-31.
- [18] GUAN N, LIU L. Microbial response to acid stress: Mechanisms and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(1): 51-65.
- [19] ASSONI L, MILANI B, CARVALHO M R, *et al*. Resistance mechanisms to antimicrobial peptides in Gram-positive bacteria. *Front Microbiol*, 2020, 11: 593215[2021-08-23]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.593215/full>. doi: 10.3389/fmicb.2020.593215.
- [20] JIJAKLI K, JENSEN P A. Metabolic modeling of *Streptococcus mutans* reveals complex nutrient requirements of an oral pathogen. *mSystems*, 2019, 4(5): e00529-19[2021-08-23]. <https://msystems.asm.org/content/4/5/e00529-19>. doi: 10.1128/mSystems.00529-19.
- [21] JIN J, SONG J, REN F, *et al*. Investigation of growth phase-dependent acid tolerance in *Bifidobacteria longum* BBMN68. *Curr Microbiol*, 2016, 73(5): 660-667.
- [22] 高敬,黄文明. 变异链球菌耐酸毒力因子质子移位膜ATP酶在龋病进展中的动态变化. *华西口腔医学杂志*, 2016, 34(2): 200-204.
- [23] GONG T, HE X, CHEN J, *et al*. Transcriptional profiling reveals the importance of RcrR in the regulation of multiple sugar transportation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *mSystems*, 2021, 6(4): e0078821[2021-08-23]. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00788-21>. doi: 10.1128/mSystems.00788-21.
- [24] COSTA OLIVEIRA B E, RICOMINI FILHO A P, BURNE R A, *et al*. The route of sucrose utilization by *Streptococcus mutans* affects intracellular polysaccharide metabolism. *Front Microbiol*, 2021, 12: 636684[2021-08-23]. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.636684>. doi: 10.3389/fmicb.2021.636684.

(2021-08-08收稿, 2021-12-22修回)

编辑 余琳