

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.08.005

· 基础研究 ·

rnc 基因调节变异链球菌环境耐受性及其机制研究

张茹¹, 雷蕾², 杨英明², 胡涛²

1. 首都医科大学附属北京口腔医院牙体牙髓科, 北京(100050); 2. 四川大学华西口腔医院口腔预防科, 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川 成都(610041)

【摘要】 目的 rnc 基因敲除后, 观察变异链球菌的耐酸、耐氧化、耐高渗透压性能的改变及其可能的调节机制。方法 通过长链 PCR 连接诱变技术, 构建 rnc 基因缺失突变株, 分别对比突变菌株与野生菌株对氧化环境、酸性环境及高渗透压环境的耐受能力; 采用 real-time RT-PCR 验证 rnc 缺失后变异链球菌环境耐受相关基因的转录水平表达变化。结果 rnc 基因缺失后, 变异链球菌的耐酸性($\chi^2 = 13.464, P = 0.001$)及耐氧化性($\chi^2 = 4.505, P = 0.048$)较野生菌株显著下降, 但耐高渗透压性显著增加($\chi^2 = 11.971, P = 0.001$)。环境耐受相关基因 luxS 与 ropA 的表达水平显著下调($P < 0.001$), 分别为野生菌株的 0.64 倍、0.51 倍; 而 htrA 与 brpA 的表达水平显著上调($P < 0.001$), 分别为野生菌株的 1.56 倍、1.80 倍。结论 rnc 基因缺失影响变异链球菌环境耐受相关基因的表达, 降低了变异链球菌耐酸、耐氧化能力, 增强了对高渗透压的耐受能力。

【关键词】 变异链球菌; rnc 基因; 耐酸性; 氧化应激; 环境耐受性

【中图分类号】 R780.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)08-0504-04

【引用著录格式】 张茹, 雷蕾, 杨英明, 等. rnc 基因调节变异链球菌环境耐受性及其机制研究[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(8): 504-507.

Regulation mechanism of rnc gene on *Streptococcus mutans* environmental tolerance and its mechanism
ZHANG Ru¹, LEI Lei², YANG Yingming², HU Tao². 1. Department of Endodontics, School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Department of Preventive Dentistry, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, State Key Laboratory of Oral Diseases, Chengdu 610041, China

Corresponding author: LEI Lei, Email: leilei@scu.edu.cn, Tel: 0086-28-85503486

【Abstract】 Objective To study the changes of acid resistance, oxidation resistance and high osmotic pressure resistance of *Streptococcus mutans* after knockout of rnc gene and its possible regulatory mechanism. **Methods** Through PCR ligation mutagenesis, an rnc knockout mutant (*Smurnc*) was constructed. Acid tolerance, oxidation tolerance and high osmotic pressure tolerance were compared between *Smurnc* and the wild strain respectively. Real-time RT-PCR was used to verify the changes in expression of stress tolerance related genes at the transcriptional level. **Results** When rnc gene was knocked out, the acid tolerance ($\chi^2=13.464, P=0.001$) and oxidation tolerance ($\chi^2=4.505, P=0.048$) of *Streptococcus mutans* was significantly decreased, but the high osmotic pressure tolerance was significantly increased ($\chi^2=11.971, P=0.001$). Expression of stress tolerance related genes luxS and ropA (0.64 and 0.51 times expression of the wild strain) had been significantly downregulated ($P<0.001$). Expression of htrA and brpA (1.56 and 1.80 times expression of the wild strain) had been significantly upregulated ($P<0.001$). **Conclusion** The deletion of rnc gene affects the expression of the environmental tolerance related genes of *Streptococcus mutans*, which reduces its acid resistance and oxidation resistance, and enhances its tolerance to hypertonic pressure.

【Key words】 *Streptococcus mutans*; rnc gene; Acid tolerance; Oxidative stress; Stress tolerance

【收稿日期】 2018-01-11; **【修回日期】** 2018-03-06

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81300878, 81771068); 北京市自然科学基金项目(7144214); 北京市医院管理局青年人才培养青苗计划项目(QML20151403)

【作者简介】 张茹, 主治医师, 博士, Email: dr.zhangru@qq.com

【通信作者】 雷蕾, 主治医师, 博士, Email: leilei@scu.edu.cn

对环境压力的耐受能力在一定程度上显示了变异链球菌在生物膜内的生存竞争力。耐酸、耐氧化、耐高渗透压力是变异链球菌作为优势菌在口腔内持续存在的主要原因^[1-2]。变异链球菌因其独特的耐酸性能、可以在生物膜酸化时,存在选择性优势^[3]。高浓度营养物质的渗入可以为生物膜内细菌带来渗透压力^[4]。另外,口腔生物膜内的变异链球菌还承受着来自于活性氧及一些细菌代谢产生的过氧化氢带来的氧化压力。

前期实验证实了变异链球菌 *rnc* 基因可以通过调控 *vicRKX* 影响胞外多糖及生物膜形成,结合 *rnc* 基因在其他细菌中表现出的全局调控作用^[5-6],提示其可能广泛而系统地影响变异链球菌的致病性。本实验旨在比较 *rnc* 基因缺失后对变异链球菌环境耐受及相关基因表达水平的影响,探讨其参与变异链球菌对环境压力的耐受性及调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

变异链球菌 UA159 由口腔疾病研究国家重点实验室提供,保存于-80℃。*rnc* 基因缺失突变株 (*Smurnc*)由变异链球菌 UA159 通过长臂同源 PCR 连接诱变技术构建;分别接种于牛脑心浸液(BHI)培养基(Sigma-Aldrich Corp, 美国),其中 *Smurnc* 接种于补充 10 μg/mL 红霉素(Sigma-Aldrich Corp, 美国)的 BHI 培养基;细菌常规传代培养于 DY-2 型厌氧培养箱(浙江省义乌冷冻机总厂,中国)。

1.2 耐酸实验

离心收集对数生长中期变异链球菌 UA159 和 *Smurnc* 细菌,重悬于 2 mL 生长培养基(pH 值 5.0)、厌氧 37℃ 培养 2 h。培养前后分别从反应体系吸取 100 μL 菌液,梯度稀释后接种于 BHI 培养基,厌氧 37℃ 培养 48 h,进行活菌菌落计数,分别计算野生菌株与 *Smurnc* 的活菌百分比。

1.3 耐氧化实验

离心收集对数生长中期变异链球菌 UA159 和 *Smurnc* 细菌,重悬于 2 mL 含 0.34 g/mL 过氧化氢的培养基、厌氧 37℃ 培养 1 h。培养前后分别从反应体系吸取 100 μL 菌液,梯度稀释后接种于 BHI 培养基,厌氧 37℃ 培养 48 h,进行活菌菌落计数,分别计算野生菌株与 *Smurnc* 的活菌百分比。

1.4 耐高渗透压实验

离心收集对数生长中期变异链球菌 UA159 和

Smurnc 细菌,重悬于 2 mL 含 29.25 g/L 氯化钠的培养基、厌氧 37℃ 培养 0.5 h。培养前后分别从反应体系吸取 100 μL 菌液,梯度稀释后接种于 BHI 培养基,厌氧 37℃ 培养 48 h,进行活菌菌落计数,分别计算野生菌株与 *Smurnc* 的活菌百分比。

1.5 环境耐受相关基因的表达水平

取 1.5 mL 对数生长中期菌悬液,加入 3 mL RNA 稳定剂(QIAGEN, 德国)混匀,室温放置 5 min。4℃ 12 000 rpm 离心 2 min 收集菌体。用含有 30 mg/mL 溶菌酶的 200 μL TE 缓冲液重悬菌体,37℃ 孵育 10 min 后,采用 Trizol 法提取细菌 RNA。按照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa, 日本)说明进行逆转录反应。按照 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, 日本)说明进行反应体系加样和两步法 PCR 扩增程序进行目的基因的 real-time RT-PCR 扩增(目的基因扩增引物见表 1),扩增后获得各目的基因 Ct (cycle threshold) 值。选取细菌 *gyrA* 基因作为内参,实验结果通过 3 个独立的扩增实验获得。阴性对照为不含 cDNA 的 Master Mix 和相应的基因引物。采用相对定量的方法,通过 2^{-ΔΔCt} 法对目的基因的相对表达水平进行计算分析,获得变异链球菌 UA159 与 *Smurnc* 目的基因的表达差异。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 Real-time PCR primer sequence

Primers	Sequences (5'-3')
htrA-F	GGTGAAGTTGTTAGACCCGC
htrA-R	ACGCTACCTTCTTCCCATCA
clpP-F	TGACTGGTCTCTGTTGAAGAC
clpP-R	CCATGGAAGCAGCAATACCC
luxS-F	ACTCTATTCCGACTGCAGGC
luxS-R	TTGCTTTGATGACTGTGGCT
ropA-F	TGATGTTGTCACTCAGCCGA
ropA-R	TCACCTTCAACTGCTGCATC
brpA-F	GTAGCTCCAGTGCCTCAGAT
brpA-R	TACCAATTCCCGTTCCTGCA

1.6 统计学分析

数据采用 SPSS Statistics 21 专业统计软件分析处理,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

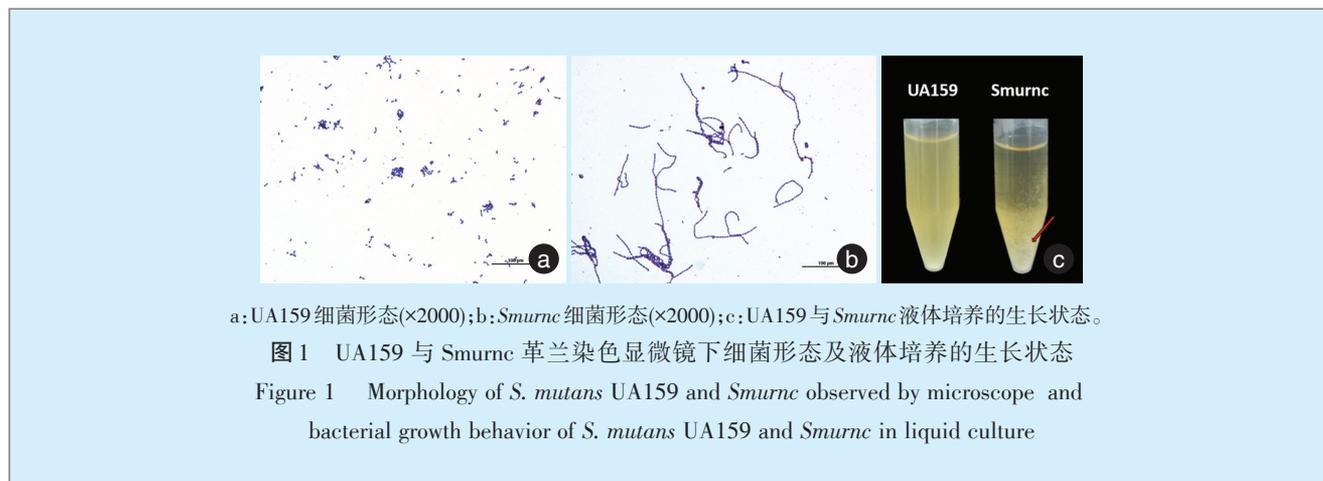
2 结果

2.1 *rnc* 基因缺失突变株形态改变

显微镜下观察突变株 *Smurnc* 的细菌形态与变

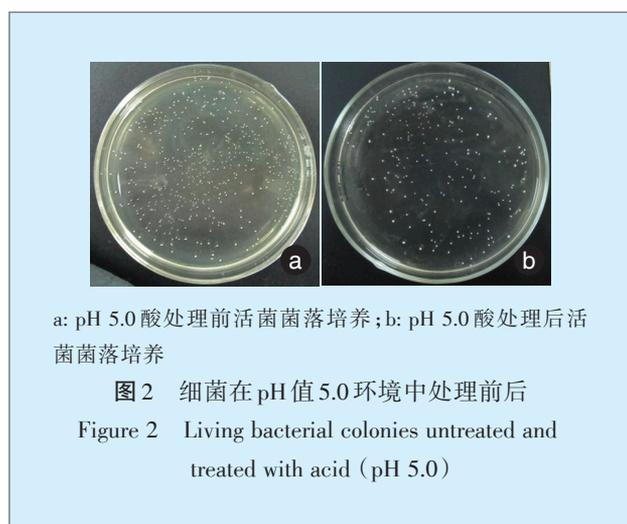
异链球菌 UA159 明显不同, 突变株的长链状结构较为明显。由液体培养基内的生长情况可以看出, *S. mutans* UA159 在培养基内分布均匀, 显示出

均质的混浊悬液, 而 *Smurnc* 则形成团块, 悬浮于较为清亮的培养基内(图1)。



2.2 rnc 基因缺失突变株耐酸、抗氧化能力下降

pH 值 5.0 环境中暴露 2 h 后, 野生菌株的活菌百分比 (42.33%) 显著高于 *rnc* 缺失突变菌株 (18.67%) (图 2)。0.34 g/mL 过氧化氢处理 1 h 后, 野生菌株的活菌百分比 (75.00%) 显著高于 *rnc* 缺失突变菌株 (61.00%)。两菌株之间在耐酸性 ($\chi^2 = 13.464, P = 0.001$)、抗氧化能力 ($\chi^2 = 4.505, P = 0.048$) 上差异均具有统计学意义。



2.3 rnc 基因缺失突变株耐高渗透压能力增加

含 29.25 g/L 氯化钠的高渗透环境处理 0.5 h 后, *Smurnc* 活菌数比例 (96.67%) 较 UA159 (81.67%) 多, 两者之间差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 11.971, P = 0.001$)。

2.4 环境耐受相关基因表达水平

与 UA159 相比, *Smurnc* 的 *luxS* ($t = -10.803, P < 0.001$) 与 *ropA* 基因 ($t = -123.303, P < 0.001$) 的表达水平显著下调, 分别为野生菌株的 0.64 倍、0.51 倍, 而 *htrA* ($t = 67.000, P < 0.001$) 与 *brpA* 基因 ($t = 96.885, P < 0.001$) 的表达水平显著上调, 分别为野生菌株的 1.56 倍、1.80 倍。

3 讨论

口腔是一个快速剧烈变化的动态环境, 变异链球菌依靠生物膜的方式持续在口腔内存活, 形成和发展了复杂的机制来应对环境压力^[7-8]。本实验通过对比 *rnc* 基因缺失突变株与 UA159 在酸性环境、高渗透压及氧化环境的耐受性, 证明 *rnc* 基因参与了变异链球菌对环境压力耐受能力的调节。变异链球菌对酸的耐受性, 可以保证其在生物膜内低 pH 值的酸性环境中继续存活与进行代谢活动, 成为生物膜的优势菌发挥其致龋作用^[9]。变异链球菌可以通过多种调控途径来适应生存环境中活性氧分压的变化, 这也是其作为主要致龋菌的重要毒力因子。本实验中, *rnc* 缺失突变株的耐酸性与抗氧化能力较野生株显著下降, 对高渗透压的耐受能力显著增加, 说明 *rnc* 基因参与调节了变异链球菌环境耐受相关毒力。实验观察到突变株细菌在培养基内呈团块状生长, 可能长链状细菌形态与相互集中的生存方式使环境中的物质难以渗透其中, 从而导致其对高渗透压的耐受能力增强。同时, *Smurnc* 细菌对 29.25 g/L 氯化钠渗

透压力的耐受性较 UA159 强,而耐酸和耐氧化能力弱于 UA159,也说明了 *rnc* 基因对变异链球菌环境压力耐受的协调上存在一定的异质性,*rnc* 可能通过不同的路径来调节不同环境压力下的反应。

影响变异链球菌环境压力耐受的调控因素较为复杂,众多基因产物同时影响一种或多种环境耐受反应^[10]。对环境压力耐受的基因又不仅仅参与细菌的生长与自稳状态,还可能影响到其他的毒力因子,在基因转录、转录后表达、蛋白质形成等不同阶段发挥调控作用^[10]。其中,*LuxS* 酶可以合成自体诱导物(autoinducer AIs),在高细胞密度下产生群体感应信号分子,进而调控相关基因的表达^[7]。本实验中,*rnc* 基因缺失后,*luxS* 的表达水平显著下调,细菌的耐酸与耐氧化性能也明显下降。*RopA* 具有与蛋白质生物合成和逆境生存有关的功能,*ropA* 缺失后会导致细菌生物膜形成障碍及对环境压力敏感增加^[8]。本实验中 *Smurnc* 菌株 *ropA* 表达显著下调,其对酸性环境及氧化环境的敏感性也显著增加,也证实了相关结论。*rnc* 基因缺失后,变异链球菌的耐酸性能下降,会导致生物膜 pH 值降低时,细菌对酸性环境的适应能力下降,影响其在生物膜内的正常代谢活动及致龋能力。另外,*rnc* 缺失突变株对氧化环境的耐受能力也显著降低,使其在口腔内或生物膜中面对氧化环境时更加敏感。

变异链球菌对不同环境耐受之间的反应存在一定的交互作用。变异链球菌能够迅速适应突然的环境波动,与其具有多种和相互交叉重叠的调控路径密不可分。*brpA* 与细菌表面蛋白与生物膜形成有关,也是影响变异链球菌环境压力耐受性的重要基因^[7]。前期研究表明 *luxS* 失活突变株内 *brpA* 表达水平下调^[7]。本实验中,*rnc* 缺失后 *luxS* 下调,而 *brpA* 出现显著上调,说明 *brpA* 可能受多个基因表达水平的影响。*HtrA* 在维持细菌应对外界环境改变的生理平衡中起着重要的作用,包括酸性环境、氧化和高渗透压环境^[11]。本实验中,*rnc* 缺失后,突变株对高渗透压的耐受能力明显增加,可能与 *htrA* 的表达水平显著上调有关。

clpP 与蛋白质活化及特异性蛋白降解的靶向有关,被认为参与了变异链球菌的氧化耐受性^[12]。*Smurnc* 中 *clpP* 表达水平略有上调,但不具有统计学意义。由此可见,变异链球菌应对环境压力的反应涉及众多的调控通路,是一个复杂而精细的调控网络。

rnc 缺失后,变异链球菌的耐酸性能及耐氧化

能力下降,耐高渗透压能力增加。通过对相关基因的表达水平进行测定,证实 *rnc* 基因参与了变异链球菌应对多种环境压力的应激反应;探讨了 *rnc* 对变异链球菌环境压力耐受的可能调节机制;证明 *rnc* 基因可作为潜在的防龋靶点,为临床生态防龋的可行性提供一定依据。但是 *rnc* 对变异链球菌环境耐受能力的具体调控通路还有待于更进一步的研究。

参考文献

- [1] Chakraborty B, Burne RA. Effects of arginine on growth, virulence gene expression, and stress tolerance by *Streptococcus mutans* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(15): e417-e496.
- [2] Binopal G, Wenderska IB, Crowley P, et al. K+modulates genetic competence and stress tolerance regulon of *Streptococcus mutans* [J]. *Microbiology*, 2017, 163(5): 719-730.
- [3] Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 26(5): 493-510.
- [4] Gao XJ, Fan Y, Kent RJ, et al. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid [J]. *J Dent Res*, 2001, 80(9): 1834-1839.
- [5] Mao MY, Yang YM, Li KZ, et al. The *rnc* gene promotes exopolysaccharide synthesis and represses the *vicRKX* gene expressions via microRNA-size small RNAs in *Streptococcus mutans* [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 687.
- [6] Lee JH, Gatewood ML, Jones GH. RNase III is required for actinomycin production in *streptomyces antibioticus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(20): 6447-6451.
- [7] Wen ZT, Burne RA. LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(9): 2682-2691.
- [8] Wen ZT, Suntharaligham P, Cvitkovitch DG, et al. Trigger factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(1): 219-225.
- [9] Guo L, Mclean JS, Lux R, et al. The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18015.
- [10] Liu YL, Burne RA. Multiple two-component systems of *streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(23): 7363-7366.
- [11] Kang KH, Lee JS, Yoo M, et al. The influence of *HtrA* expression on the growth of *Streptococcus mutans* during acid stress, molecules and cells [J]. *Mol Cells*, 2010, 29(3): 297-304.
- [12] Perry JA, Levesque CM, Suntharaligham P, et al. Involvement of *streptococcus mutans* regulator RR11 in oxidative stress response during biofilm growth and in the development of genetic competence [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 47(5): 439-444.

(编辑 罗燕鸿,曾曙光)