

## 右旋糖酐酶对变形链球菌体外形成的 牙菌斑物质的作用

孙晋武 程秀兰 严自正 张树政

(中国科学院微生物研究所, 北京)

为探讨淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 的右旋糖酐酶 (Dextranase, EC 3.2.1.11) 对变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 产生的牙菌斑物质的作用, 进行了体外试验。发现该酶能阻止变形链球菌在蔗糖培养基中形成的牙菌斑物质在不锈钢丝上的附着, 其阻止附着的能力与加入的酶量正相关, 且对不同血清型的变形链球菌形成的牙菌斑都存在这种关系, 只是程度上略有差异。对国内常见的 c 型变形链球菌 (CY-94) 所形成的牙菌斑也相当有效。另外该酶能促使已形成的附着物的脱落。通过显微镜观察, 看到变形链球菌在蔗糖培养基中培养, 能在细胞外形成一层粘性多糖类物质, 若在培养时加入右旋糖酐酶, 经对菌落和菌体形态的观察, 均见这类物质的量大为减少。上述结果都为该酶在龋病防治方面的功效提供了实验室证据。

**关键词** 右旋糖酐酶; 牙菌斑; 淡紫拟青霉; 变形链球菌

龋病是一种常见的多发病。口腔中的变形链球菌是一种最重要的致龋菌, 它能将食物中的蔗糖转化成由  $\alpha$ -1, 6 和  $\alpha$ -1, 3 葡萄糖糖苷键构成的葡聚糖类物质, 附着在牙齿上, 形成牙菌斑。大量细菌在此繁殖生长, 分泌酸性物质, 破坏齿质, 形成龋齿。因此消除牙菌斑是防治龋病的重要手段<sup>[1-6]</sup>。

右旋糖酐酶能专一性地切割  $\alpha$ -1, 6 葡萄糖糖苷键。1968年 Fitzgerald 首次报道了该酶在龋病防治方面可能的功效<sup>[7]</sup>, 引起各国科学家的极大兴趣, 近年来有不少这方面研究、应用和取得专利的报道<sup>[4, 8-14]</sup>。我们从自然界中进行了广泛的有针对性的筛选, 从中选到一株品质优良的右旋糖酐酶产生菌, 其酶在温度稳定性、pH 稳定性等方面均较适于实际应用的需要<sup>[15]</sup>。经鉴定, 确定此菌为淡紫拟青霉, 与国外在牙膏中广泛添加及研究的细丽毛壳霉 (*Chaetomium gracile*) 产生的酶<sup>[4, 8, 9]</sup>

不同。为此我们在实验室进行了一些模拟试验, 较为肯定地表明我们所得的酶在龋病防治方面的功效。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种

产酶菌株淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) 8523 菌由本实验室筛选得到。变形链球菌 (*Streptococcus mutans*) 国际标准菌株 E49 (血清 a 型)、FA-I (b 型)、MT6R (c 型)、B13 (d 型)、OMZ176 (d 型)、MT703R (e 型)、OMZ 175 (f 型) 和 KI (g 型) 皆从卫生部北京药品生物制品检定所购得。国内菌株 CY-94 (血清 c 型) 由四川医学院岳松龄教授等惠赠。

### (二) 变形链球菌的培养

#### 1. 培养基:

(1) 普通培养基 (%): 胰蛋白胨 2, 酵母抽

本文于 1987 年 9 月 7 日收到。

四川医学院岳松龄、刘大维教授为我们提供了变形链球菌 CY-94 菌株, 本所苑兰翠同志为本实验拍摄洗印了大量照片, 特此致谢。

提物 0.5,  $K_2HPO_4$  0.4,  $KH_2PO_4$  0.1, NaCl 0.2, 葡萄糖 2, pH 7.0。

(2) 蔗糖培养基: 用 5% 蔗糖代替上述普通培养基中的葡萄糖, 其它成分相同。

(3) 固体培养基: 在上述培养基中加入 1.25% 琼脂

2. 培养条件: 将冷冻干燥保藏在安瓿管中的变形链球菌接入普通培养基中, 在厌氧条件 ( $80\%N_2$ ,  $10\%H_2$ ,  $10\%CO_2$ ) 下于  $37^\circ C$  培养 24—48 小时后, 转接到所需培养基中, 厌氧培养, 每隔 24 小时转接一次。

### (三) 右旋糖酐酶样品

由淡紫拟青霉 8523 菌发酵得到的培养液经离心、浓缩, 再在无菌条件下经国产 G6 细菌漏斗过滤制得的无菌酶液, 供试验用。酶活力的测定和酶活力单位的定义见文献 [15]。

### (四) 变形链球菌的染色

普通染色法用吕氏美蓝染色后水洗。荚膜染色法先用绘图墨水负染色、甲醇固定、再用番红对染, 然后水洗而成。

## 实 验 结 果

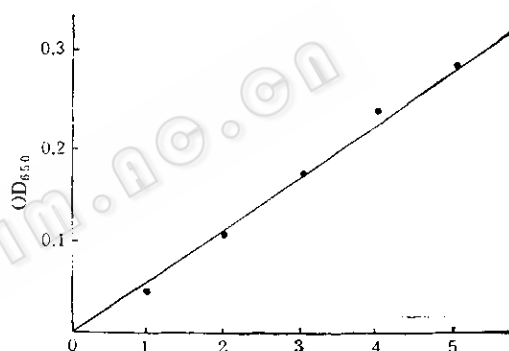
### (一) 右旋糖酐酶的阻附着作用

变形链球菌在蔗糖培养基中所形成的多糖物质能附着在不锈钢丝上, 附着物的多少在一定程度上代表该菌的致龋能力。若在培养变形链球菌的同时加入右旋糖酐酶, 观察附着量的变化, 便能在一定程度上反映出该酶对防止牙菌斑形成的作用。

在 5 支  $16 \times 1.5\text{cm}$  的玻璃管中各加入 12ml 蔗糖培养基, 塞上带有 1mm 粗不锈钢丝的棉塞, 使不锈钢丝直插管底。高压灭菌后, 在接入变形链球菌的同时, 加入不同量的无菌右旋糖酐酶, 以不加和加入热灭活后的酶液作为对照, 厌氧培养 24 小时后, 转接到含相同内容物的新鲜培养液中去。如此重复四次, 便可见在不锈钢丝上附着有一些白色物质。将此不锈钢丝在培养液中轻轻抖动而去除了一些假性附着物

后, 或是将不锈钢丝转移到 10% 甲醛中, 对附着物进行固定后通过照相比较结果; 或是转移到 5ml 0.5mol/L NaOH 溶液中, 制成附着物的悬浊液, 测定其在 650 nm 处的光密度值作为附着物多少的指标。

图 1 为变形链球菌 OMZ 176 在上述条件下所形成的多糖类物质在 0.5 mol/L NaOH 中所呈现的光密度值与转接培养天数之间的线性关系。图 2 是不同的变形链球菌在上述条件下连续转接培养 4 天后, 将不锈钢丝转移到 10% 甲醛中固定后所拍摄的照片。



培养时间 Incubation time (d)

图 1 变形链球菌 OMZ 176 在蔗糖培养基中所形成的多糖类物质在 0.5 mol/L NaOH 中所呈现的光密度值与转接培养天数的关系

Fig. 1 The relationship between OD and incubation days

The OD of polysaccharide, formed by *S. mutans* OMZ 176 grown in sucrose medium, in 0.5 mol/L NaOH was determined at 650nm

由上结果可见, 变形链球菌可在蔗糖培养基中形成多糖类物质, 且可附着在不锈钢丝上, 其附着量与转接培养的天数有关。若在培养的同时, 加入右旋糖酐酶, 便可阻止这类多糖的附着, 其阻止能力与加入的酶量正相关。

表 1 是用不同血清型的变形链球菌标准菌株所做的同样试验。其中 CY-94 菌株是国内分离到的常见的血清 c 型致龋

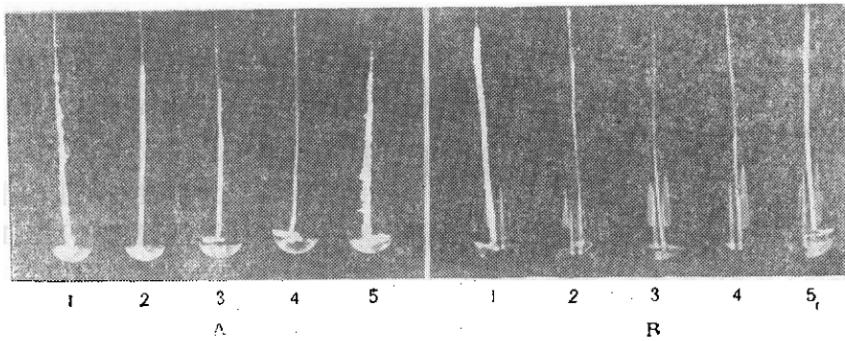


图2 右旋糖酐酶对变形链球菌在蔗糖培养基中所形成的牙菌斑物质在不锈钢丝上附着能力的影响

A. 变形链球菌 OMZ 176 (血清 d 型) B. 变形链球菌 CY-94 (血清 c 型)

右旋糖酐酶加入量 (u/ml 培养液): 1. 0u/ml; 2. 3u/ml; 3. 6u/ml; 4. 12 u/ml;  
5. 12u/ml (死酶)。

Fig. 2 The effect of dextranase on the adhesion of plaque on stainless wire, which was produced by *S. mutans* OMZ 176 (A. serotype d) and CY-94 (B. serotype c) grown in sucrose medium

Dextranase amount added (Units/ml of medium): 1. 0 u/ml; 2. 3 u/ml; 3. 6 u/ml; 4. 12 u/ml; 5. 12 u/ml (dead enzyme)

表1 右旋糖酐酶对不同血清型变形链球菌在蔗糖培养基中所形成的牙菌斑物质在不锈钢丝上的附着力的影响

Table 1 The effect of dextranase on the adhesion of plaque on stainless wire, which were produced by *S. mutans* of different serotypes grown in sucrose medium

No.	变形链球菌菌株 Strains of <i>S. mutans</i>	血清型 Serotype	在不锈钢丝上的沉积物 Adhesion on stainless wire				
			加 酶 量 Enzyme amount added (u/ml medium)				
			0	3	6	12	12 (Dead enzyme)
1	E 49	a	++++	+++	++	±	++++
2	FA-I	b	++++	+	+	±	++++
3	MT6R	c	++++	+	+	±	++++
4	B 13	d	++++	+	+	+	++++
5	OMZ 176	d	++++	+++	+	±	++++
6	MT 703R	e	++++	+++	++	+	++++
7	OMZ 175	f	++++	++	++	+	++++
8	KI	g	++++	+++	++	+	++++
9	CY-94	c	++++	++	+	+	++++

注: 1. “+”表示沉积物的量, “+”号越多, 沉积物越多。“±”为附着物在有无之间。

2. 该实验是在连续转接四天, 将不锈钢丝插入 10% 甲醛中固定后, 目测的结果。

Notes: 1. The amount of plaque is expressed in “+”, the “-” means no plaque adhered.

2. This results observed were achieved according to the plaque amount on stainless wire after 4 days culture and fixed in 10% formalin.

菌。由表可见, 右旋糖酐酶对收集到的所有血清型变形链球菌, 以及国内最主要的

c 型致龋菌所产生的牙菌斑物质的附着力都有明显的阻止能力。

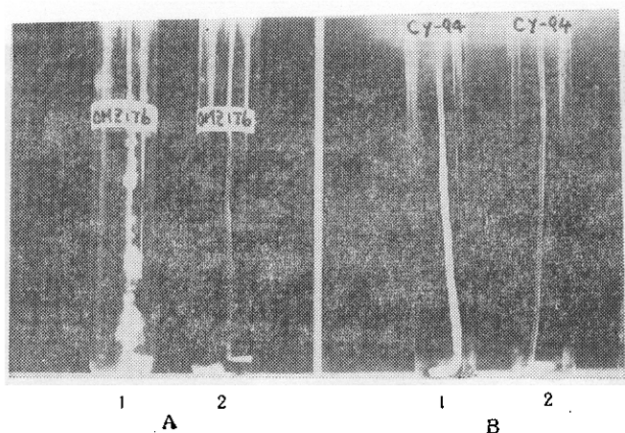


图3 右旋糖酐酶对变形链球菌在不锈钢丝上已形成的附着物的剥离作用

A. 变形链球菌 OMZ176; B. 变形链球菌 CY-94

1. 不加酶; 2. 加酶 20u/ml 培养液

Fig. 3 The dropping effect of dextranase on plaque which has been adhered on stainless wire by *S. mutans* OMZ 176 (A) and CY-94 (B)

1. No enzyme added; 2. Enzyme added at 20u/ml of medium

## (二) 右旋糖酐酶对已附着在不锈钢丝上的牙菌斑物质的影响

按前述方法, 让 OMZ 176 和 CY-94 菌在蔗糖培养基中连续转接四代, 在不锈钢丝上附着了相当数量的牙菌斑物质后, 再按每毫升培养液加入 20u 无菌右旋糖酐酶酶液, 放置数天后, 在不锈钢丝上, 不论加酶与否, 都有附着物, 但对加酶的, 只要轻轻抖动, 附着物全部脱落; 而不加酶的在此情况下并不脱落(图3)。这在一定程度上反映出该酶在龋齿治疗方面的效用。

## (三) 菌落形态及菌体的显微镜观察

变形链球菌在蔗糖培养基中培养后, 在细胞外能形成一些相当于细胞荚膜的粘性多糖类物质。加入右旋糖酐酶, 观察在菌落及菌体外这类物质的多寡变化, 便能从药理上对该酶在龋病防治方面的作用提供些证据。

将在普通培养基上厌氧培养好的 OMZ 176 菌按不同稀释度涂布在平皿中的蔗糖固体培养基上。平皿分两批, 一批不加酶, 另一批涂布 70 u/平皿的无菌酶液。然

后在厌氧条件下于 37℃ 培养 2—3 天, 肉眼观察加酶与否对菌落形态的影响。可见在不加酶的情况下, 菌落外围有一圈透明状物质, 其量随培养时间增长而增加, 而在加酶情况下所形成的菌落周围, 这层透明物很少, 甚至没有(图4)。可见这两种菌落外围物质的量上有明显差别。

由上述不同的菌落采样涂布到载玻片上, 分别按普通染色和荚膜染色法染色, 高倍镜下观察并照像。图版 I-1, 2 为普通染色的结果, 1 和 2 分别是不加和加酶情况下的变形链球菌 OMZ176 菌体, 两者区别不很明显。而用荚膜染色, 对不加酶形成的 OMZ 176 菌体, 可见在黑色背景下有許多红色链状菌体, 菌体外包裹有一团团不着色的透亮物质, 此便是荚膜染色所显示的多糖类组分(图版 I-3)。而在加酶情况下形成的 OMZ 176 菌体, 黑色背景下的暗红色链球菌外看不到上述的透亮物质(图版 I-4)。

这些实验表明: 从微观角度看, 右旋糖酐酶能抑制或减少变形链球菌产生的多

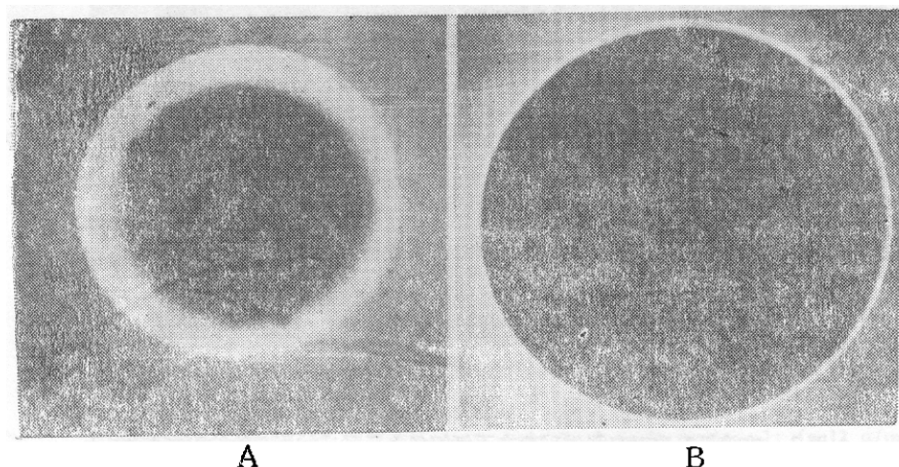


图4 变形链球菌 OMZ 176 在右旋糖酐酶不存在 (A) 和存在 (B) 情况下的单菌落放大观察( $\times 40$ )  
Fig. 4 The observation of single colony of *S. mutans* OMZ 176 grown on solid sucrose medium without (A) and with (B) dextranase ( $\times 40$ )

糖类物质,从而降低了牙菌斑形成的可能性。

## 讨 论

1. 构成牙菌斑的基本物质是由变形链球菌转变蔗糖而成的水溶性葡聚糖(以  $\alpha$ -1,6 葡萄糖糖苷键为主)和水不溶性葡聚糖(即变聚糖 mutan, 以  $\alpha$ -1,3 葡萄糖糖苷键为主,另含  $\alpha$ -1,6 等糖苷键)<sup>[6,16]</sup>,一般认为,变聚糖更为关键,而对单独使用右旋糖酐酶作为防龋药物的作用有人持怀疑态度<sup>[5,16]</sup>。本文的一系列实验从不同角度表明,我们从淡紫拟青霉得到的对  $\alpha$ -1,6 糖苷键专一的右旋糖酐酶<sup>[15]</sup>本身对牙菌斑物质的生成、对其的阻附着作用和剥离作用都是很明显的。岡田祐三等认为<sup>[8]</sup>,变聚糖中的  $\alpha$ -1,6 糖苷键与多糖的附着作用有关,而  $\alpha$ -1,3 糖苷键则与多糖的水不溶性有关。看来右旋糖酐酶对变聚糖形成过程中的  $\alpha$ -1,6 糖苷键的切割,阻止了所形成的多糖物质的附着,该酶的切割又破坏了这种附着力,而造成剥离。这些结果在一

定程度上表明该酶对龋病能起到防和治的双重作用。

2. 变形链球菌有许多血清型,它们所制备的水溶性和水不溶性多糖的比例,以及在变聚糖中  $\alpha$ -1,3 与  $\alpha$ -1,6 葡萄糖糖苷键之间的比例和分枝情况都不相同<sup>[5,16,17]</sup>,因而它们的致龋能力也有差异。本实验用右旋糖酐酶对一系列国外标准菌株和国内常见的 c 型致龋菌作用,都取得正的结果,只是在程度上略有差异,说明了该酶的实用性。

3. W. Graves<sup>[18]</sup> 等曾报导在电子显微镜下观察加酶与否对变形链球菌合成多糖类物质的影响,但由于没有进行专一性染色,所得结果并不明显。由于细菌荚膜主要由多糖物质构成,我们首次采用荚膜染色这一专一性较强的方法进行染色和观察,所得结果清晰地表明了加酶与否的差别。从而在微观上为右旋糖酐酶在龋病防治的药理基础提供了一个有力的证据。

## 参 考 文 献

- [1] 岳松龄主编: 龋病学, 四川人民出版社, 成都, p. 190—200, 1982。
- [2] 孙晋武: 生物工程进展, 第4期, p. 26—32, 1986。
- [3] 梁天锡: 酶制剂工业 (张树政主编), 科学出版社, 北京, p. 795—803, 1984。
- [4] 湊贞正: 日本農芸化学会誌, **57**(2): 155—166, 1983。
- [5] Walker, G. J. et al.: *Carbohydr. Res.*, **58**: 415—432, 1977。
- [6] Ebisu, S. et al.: *Carbohydr. Res.*, **38**: 374—381, 1974。
- [7] Fitzgerald, R. J. et al.: *Arch. Oral Biol.*, **13**: 125—128, 1968。
- [8] 岡田禎三: 齿科医学, **45**(2): 190—205, 1982。
- [9] 岡田启之介: 齿科医学, **46**(4): 365—388, 1983。
- [10] Koga, T. et al.: *Arch. Oral Biol.*, **24**: 191—198, 1979。
- [11] Niwa, T. et al.: 口腔卫生会誌, **25**: 172, 1975。
- [12] Kazuo, S. et al.: *Fr. Demande, FR*, 2,502,958, 1982。
- [13] Hiromichi, I. et al.: *Ger. Offen, DE*, 3,248,541, 1983。
- [14] Lion Corp: 日本公开特许公报, JP, 61,176,518, 1986。
- [15] 孙晋武等: 微生物学报, **28**(1): 45—55, 1988。
- [16] Ceska, A. et al.: *Acta Chem. Scand.*, **26**(6): 2223—2230, 1972。
- [17] Walker, G. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **127**: 201—208, 1981。
- [18] Graves, W. et al.: *Microbios*, **40**: 145—152, 1984。

## THE *IN VITRO* EFFECTS OF DEXTRANASE ON DENTAL PLAQUE PRODUCED BY *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Sun Jinwu   Cheng Xiulan   Yan Zizheng   Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Some *in vitro* studies on the effects of *Paecilomyces lilacinus* dextranase (EC 3.2.1.11) on dental plaque produced by *Streptococcus mutans* were made. The enzyme can inhibit the adhesion of plaque produced by *S. mutans* in sucrose medium on stainless wire. The inhibition degree was correlated to enzyme concentration. It was effective to plaque produced by *S. mutans* of different serotypes but with different degree, especially it was active to the plaque produced by the c-type *S. mutans* (CY-94), which is commonly encountered in China. For the adhered plaque,

the enzyme can enhance its dropping. Under the microscope, a coat of sticky polysaccharide around the cells of *S. mutans* (OMZ 176) after culture in sucrose medium can be found. Either for colonies or for cells, it would be reduced in a great degree after adding this enzyme. All of these results furnished evidences for the efficacy of this enzyme in the prevention and cure of dental caries.

### Key words

Dextranase; Dental plaque; *Paecilomyces lilacinus*; *Streptococcus mutans*

### 图 版 说 明

#### Explanation of plate

用普通染色法(1,2)和美膜染色法(3,4)对生长在蔗糖培养基上的变形链球菌 OMZ 176 菌体染色后的显微镜观察( $\times 1200$ )

1,3. 不加酶所形成的菌体

2,4. 加酶后形成的菌体

The microscopic observation of *S. mutans* OMZ 176 grown on solid sucrose medium. The general bacterial dyeing method (1, 2) and the capsule dyeing method (3, 4) were adopted ( $\times 1200$ )

1,3. The bacteria formed without dextranase

2,4. The bacteria formed with dextranase