

人工合成肽 GH12 在龋病防治中的研究进展

王丹妮 综述 赵月萍 审校

暨南大学口腔医学院,广东 广州 510000

【摘要】 牙体硬组织或软组织上形成的生物膜是龋病主要病因。因此,有效的抑制游离致病菌的增值和减少牙面菌斑生物膜的形成是预防和治疗口腔感染性疾病的关键。但是传统的抑菌药物长期使用可能会造成很多副作用如牙齿染色、胃肠道反应及耐药性等。GH12作为一种人工合成的新型抗菌肽,有广谱、低毒、作用迅速等特点,未来可能成为龋病的防治手段。本文就人工合成肽 GH12 在龋病防治进展做一综述。

【关键词】 抗菌肽;人工合成肽;龋病;口腔链球菌;变异链球菌;生物膜

【中图分类号】 R781.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2021)06—0782—03

Research progress of synthetic peptide GH12 for caries prevention and treatment. WANG Dan-ni, ZHAO Yue-ping.

School of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510000, Guangdong, CHINA

[Abstract] The main cause of caries is the biofilm formed on the tooth hard tissue or soft tissue. Therefore, effectively inhibiting the proliferation of free pathogenic bacteria and reducing the formation of dental plaque biofilm is the key to preventing and treating oral infectious diseases. However, the long-term use of traditional bacteriostatic drugs may cause many side effects, such as tooth staining, gastrointestinal reactions, and drug resistance. GH12, as a new synthetic antimicrobial peptide, has the characteristics of broad spectrum, low toxicity, and rapid action, and may become an auxiliary treatment for caries in the future. This article reviews the progress of synthetic peptide GH12 in oral cavity.

[Key words] Antibacterial peptide; Synthetic peptide; Caries; Oral Streptococcus; *Streptococcus mutans*; Biological film

瑞典科学家 BOMAN 等在 1972 年发现的一种抑制细菌增殖的肽,这种肽在 1981 年被正式命名为抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs)。抗菌肽是一类短的带正电荷的生物活性分子,广泛分布于人类的唾液、上皮和中性粒细胞中,具有广泛的抗菌活性。迄今为止,有许多学者已经研究了许多天然抗菌肽对龋病的致龋细菌的作用,包括 α -防御素、 β -防御素、凯萨林菌素和人乳铁蛋白等^[1-2]。但由于天然抗菌肽存在毒性、溶血性、成本高、不易获得等缺点,近年来研究者们开始设计合成肽,它们比现有的 AMPs 更短,细胞毒性更小,对致龋细菌更有效。

1 龋病病因及防治现状

龋病是一种牙体硬组织发生慢性进行性破坏的口腔疾病,而细菌是公认的龋病病因之一,其所形成的牙菌斑生物膜是龋病发生的始动因子。尽管取得了显著的进步技术和口腔保健意识的提高,龋齿患病率仍在快速地增长^[3]。口腔菌群复杂,但研究表明^[4-5],在早期生物膜群落中超过 60% 是链球菌,且链球菌中的变形链球菌是目前公认的主要的致龋菌和病原体。对于早期釉质龋损,治疗方案通常是药物治疗和充填治疗,氟化物通常被添加到水和牙膏中来防龋和阻止早期龋损的进一步发展。氟化物通过抑制脱矿和增强晶体表面的再矿化来防龋,对于合适使用浓度方面仍然有争议,使用较高氟化物的浓度可导致一定的毒副作用,比如氟斑牙、氟骨症^[6-8]。氯己定

是一种阳离子广谱抑菌剂,能有效抑制变形链球菌的数量及活性^[9-10],通常被制成漱口水使用来防治龋病,但是有使牙齿、黏膜着色、龈上结石形成增加、味觉暂时丧失等副作用。而对于形成龋洞的主要是通过充填治疗,去除腐质后进行完善的充填可以很好的缓解龋病,如若腐质未去尽造成的细菌残留可引起继发龋坏,造成治疗的失败。目前,抑制致龋性口腔链球菌的生长仍有希望在有限的时间内用作龋齿控制的辅助疗法,特别是对高龋齿风险或龋齿活跃的个体。

2 抗菌肽的分类及与合成抗菌肽 GH12

天然抗菌肽具有多效功能,它们不仅杀微生物,还参与调控宿主的生理功能,比如参与炎症反应、伤口愈合等。它们的活性包括有趋化功能、细胞因子产生、组胺释放、脂多糖结合和其他免疫调节活性,这些活性共同导致适应性免疫反应的激活^[11]。抗菌肽按照来源分类可分为昆虫来源肽、两栖动物来源肽、哺乳动物来源肽、植物来源肽、细菌来源肽。按照结构分类主要分包括 α -螺旋、 β -折叠、环形和伸展性结构四类^[12]。与口腔疾病关系密切的几种抗菌肽主要有防御素、凯瑟林菌素及富组蛋白。

2.1 防御素 最早在人类中性粒细胞中发现,是从参与宿主防御的肥大细胞和组织中分离出来的 1 845 个氨基酸长的阳离子分子。人防御素被分类为 α -防御素 (HNP)、 β -防御素 (HBD)。 α -防御素被进一步细分为六种类型,其中 HNP-1 抗菌活性最强,对变

基金项目:广东省普通高校特色创新项目(编号:2019KTSCX011)

通讯作者:赵月萍,主任医师,硕士,硕士生导师,E-mail:ypzhao6026@gmail.com

异链球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等多种致病菌有抗菌活性,尤其是变异链球菌对HNP-1最为敏感。 β -防御素主要在各种组织和器官,比如牙龈、皮肤、胃肠道、呼吸道及肾脏的上皮细胞中表达。HBD-2与HBD-3均能杀灭包括变异链球菌在内的多种口腔链球菌,且HBD-3对致龋菌的抗菌效果最强^[13]。

2.2 凯瑟林菌素(Cathelicidins) 最初是从猪白细胞中分离出来的,它们是具有高度保守的N-末端结构域和C-末端抗菌结构域的前体蛋白,广泛存在于哺乳动物体内,表现出广泛的抗菌活性^[14-15]。

2.3 富组蛋白(Histatins) 由健康成人的腮腺和下颌下腺唾液管细胞合成,三个主要成员是His-1, His-3 和 His-5。它能够抑制口腔念珠菌的生长,参与唾液中金属离子的键合,口腔止血的调节、参与牙釉质膜的形成^[13]。

2.4 合成抗菌肽GH12 使用天然产生的抗菌肽作为治疗剂有一些需要克服的局限性^[16],它们可能存在毒性、免疫原性、耐药性、溶血活性和其他副作用^[17-18]。为了获得更强的生物效应并克服天然肽的缺点,人工合成肽是通过将两种或更多种具有不同生物功能的不同肽的序列进行组合而设计,通过人为的控制其特性可以更广泛的在口腔疾病方面应用^[19]。有学者设计合成了只含有12个氨基酸的具有两亲性的 α -螺旋抗菌肽GH12 (GLLWLHLHLLH-NH2)^[20],在GH12序列的疏水侧起点和亲水侧终点之间的界面处放置了一个色氨酸残基,这种设计能够稳定螺旋结构并提高抗微生物活性^[21],由于其稳定性更好、生产成本更低,未来可能广泛用于龋病治疗。

3 人工合成肽GH12对主要致龋菌的杀灭效果

3.1 体外研究效果 TU等^[20]首次对GH12对口腔链球菌的抗菌和作用机制进行了研究,发现GH12能有效抑制口腔链球菌,尤其对变形链球菌、远缘链球菌和唾液链球菌的抑制效果更为明显。GH12对口腔链球菌的MIC值为6.7~32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,MBC值为8.0~64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。GH12同其他 α -螺旋抗菌肽一样,在到达细胞膜后,分子的亲水面被带负电荷的磷脂头基团吸引,而疏水面插入双层^[22],在膜表面产生孔和破裂。尽管GH12具有上述防龋潜力,但它们对牙菌斑和龋齿的作用机制仍有待阐明。由于其大多数抗微生物研究数据是在口腔链球菌的浮游培养物中进行的,而关于它们的生物膜对应物的可用数据有限^[23]。研究表明,与浮游状态的细菌相比,生物膜与龋病的关联性更强^[24]。绝大多数研究表明,以浮游菌为基础的药物研究结果并不适用于生物膜内的细菌^[25-26]。WANG等^[27]从3种短抗菌肽中筛选出了二级结构最稳定、抗菌活性最强的肽GH12,研究了其对八种主要浮游致龋细菌的抗菌活性,并研究了其对单一变异链球菌生物膜的影响,发现GH12在低浓度下通过抑制变异链球菌的生长来抑制变异链球菌生物膜的形成。随后JIANG等^[28]研究了GH12对致龋多菌种(变异链

球菌、血链球菌和戈登链球菌)生物膜的影响,发现不同浓度的GH12对生物膜中三种菌种的比例随时间变化也有一定的影响,4 mg/L和8 mg/L的GH12对变形链球菌有明显的抑制作用,但对血链球菌和戈登链球菌却基本没有影响。有学者指出,一种生物的代谢产物很可能对同一生物膜中种群间产生影响,而GH12通过降低生物膜中变形链球菌的胞外多糖的合成和乳酸生产及促进血链球菌和戈登氏球菌中过氧化氢的产生两部分机制来改变多菌种生物膜的组成^[29]。GH12显著上调过氧化氢产生相关的表达基因spxB,促进血链球菌和戈登氏球菌中过氧化氢的产生,提高它们的生态优势。但该研究并未对变异链球菌产酸相关的毒力因子进行探究,而变异链球菌产酸、耐酸、合成外多糖和形成生物膜的能力主要跟变异链球菌的毒力因子有关^[30-31],并且变异链球菌的致龋潜能不是由几个毒力基因独立表达的结果,而是一系列协同调节事件的结果^[32]。随后WANG等^[33]第一次系统地研究AMPs对变异链球菌毒力和调节系统的影响,以亚MIC水平测定了GH12处理的变异链球菌的各种毒力基因(ldh, atpD, gtfB, gtfC, gtfD)和TCSTS基因(vicR, DAiR, comD, comE)的表达谱,发现被亚MIC水平GH12处理的变异链球菌的各种毒力基因几乎均显著下调,灭活特定调节系统,乳酸生成和乳酸脱氢酶(LDH)活性降低,导致产酸性、耐酸能力降低,胞外多糖合成减少和生物膜形成能力降低^[33]。尽管如此,这些研究都是基于体外的研究。

3.2 体内研究效果 为了进一步了解体内的防龋效果,WANG等^[34]采用了大鼠模型来测试局部应用GH12是否能抑制体内龋齿的发生率和严重程度,其结果表明GH12可降低大鼠不同严重程度的龋病发生率和相应的变形链球菌种群,且局部使用8 mg/L GH12的效果明显优于250 ppm氟化物。由于GH12对变异链球菌生物膜的生物量和致龋特性的联合抑制作用,使体内变异链球菌的种群数量减少,残留的变异链球菌生物膜酸性较弱且致密,从而抑制了龋的发生和发展。AMPs在体外和体内对复杂多种生物膜的功效仍有待进一步研究,尽管研究者用了牙菌斑衍生的多种生物膜和大鼠龋齿模型来模拟牙菌斑和实际治疗应用,但它不能完全代表的影响人类口腔中的实际环境,因此应该进行进一步的研究。为了模拟更为复杂、真实的口腔生物膜环境,JIANG等^[35]选取了健康人体牙菌斑生物膜来研究,与之前实验研究结果有所不同,之前的研究表明8 mg/L的GH12能够抑制预制的变异链球菌生物膜。然而在这项研究中,8 mg/L的GH12对牙菌斑来源的多种生物不足以显示出抑制作用,而需要64 mg/L才显示出最有效的抑制作用。这可能由于牙菌斑对抗菌剂具有更强的耐药性,这也说明了单独使用变异链球菌生物膜模型可能还不足以说明GH12的体外防龋效果。

4 展望

GH12作为一种人工合成的短肽具有良好的抗菌

活性,未来可能成为抗生素及氟化物的替代产品,被制成漱口水或者牙膏制剂用于龋病的防治。目前的研究大多还处于体外阶段,为了更深入的了解可能还需要模拟更真实的口腔微生物环境和更多的体内实验。在口腔内复杂环境下对菌斑生物膜的杀灭效果未来仍需要大量的临床实验来探讨。而且作为漱口水及牙膏添加剂,使用频率高、在口腔内停留时间短,要在这么短的停留时间达到预期效果还需寻找出更为精确的合适使用浓度,既要有能发挥最好的疗效,长期使用又不至于造成口腔内微生物菌群的失调和微生态的失衡。

参考文献

- [1] AHMED A, SIMAN-TOV G, HALL G, et al. Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections [J]. *Viruses*, 2019, 11(8): 704.
- [2] DA SILVA BR, DE FREITAS VAA, NASCIMENTO-NETO LG, et al. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature [J]. *Peptides*, 2012, 36(2): 315-321.
- [3] PERES M, MACPHERSON L, WEYANT R, et al. Oral diseases: A global public health challenge [J]. 2019, 394(10194): 249-260.
- [4] RENNER LD, WEIBEL DB. Physicochemical regulation of biofilm formation [J]. *MRS Bull*, 2011, 36(5): 347-355.
- [5] BEIGHTON D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process [J]. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2005, 33(4): 248-255.
- [6] OREKHOVA LY, KUZMINA EM, KUZMINA IN, et al. Consensus resolution on a modern view on the therapeutic and prophylactic effect of individual oral care products containing fluoride [J]. *Stomatologija (Mosk)*, 2019, 98(4): 29-33.
- [7] LENZI TL, MONTAGNER AF, SOARES FZM, et al. Are topical fluorides effective for treating incipient carious lesions?: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Am Dent Assoc*, 2016, 147(2): 84-91.e81.
- [8] FEATHERSTONE JJCD, EPIDEMIOLOGY O. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride [J]. *Community Dent Oral Epidemiol*, 1999, 27(1): 31-40.
- [9] KARPIŃSKI TM, SZKARADKIEWICZ AK. Chlorhexidine-pharmaco-biological activity and application [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(7): 1321-1326.
- [10] BHARDWAJ P, HANS A, RUIKAR K, et al. Reduced chlorhexidine and daptomycin susceptibility in vancomycin-resistant enterococcus faecium after serial chlorhexidine exposure [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 62(1): e01235-17.
- [11] SCOCCHI M, MARDIROSSIAN M, RUNTI G, et al. Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria [J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(1): 76-88.
- [12] AHMED A, SIMAN-TOV G, HALL G, et al. Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections [J]. *Viruses*, 2019, 11(8): 704.
- [13] GUPTA S, BHATIA G, SHARMA A, et al. Host defense peptides: An insight into the antimicrobial world [J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2018, 22(2): 239-244.
- [14] RITONJA A, KOPITAR M, JERALA R, et al. Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes [J]. *FEBS Lett*, 1989, 255(2): 211-214.
- [15] XIA X, CHENG L, ZHANG S, et al. The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, 111(1): 5-26.
- [16] DE LA FUENTE-NÚÑEZ C, SILVA ON, LU TK, et al. Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 178: 132-140.
- [17] MORAVEJ H, MORAVEJ Z, YAZDANPARAST M, et al. Antimicrobial peptides: Features, action, and their resistance mechanisms in bacteria [J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(6): 747-767.
- [18] STARR CG, MADERDRUT JL, HE J, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent broad-spectrum antimicrobial peptide: Structure-activity relationships [J]. *Peptides*, 2018, 104: 35-40.
- [19] WANG C, YANG C, CHEN YC, et al. Rational design of hybrid peptides: a novel drug design approach [J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(3): 349-355.
- [20] TU HX, FAN YY, LV XP, et al. Activity of synthetic antimicrobial peptide gh12 against oral streptococci [J]. *Caries Res*, 2016, 50(1): 48-61.
- [21] LEE S, KIM S, LEE Y, et al. De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition [J]. *Regul Pept*, 2011, 166: 36-41.
- [22] KWIECIŃSKI J, EICK S, WÓJCIK K. Effects of tea tree (melaleuca alternifolia) oil on *Streptococcus mutans* in biofilms and stationary growth phase [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33(4): 343-347.
- [23] XU X, ZHOU X, WU C. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(3): 1229-1236.
- [24] KIM Y, LEE S. Lactococcus lactis inhibitory effect of hy 449 on cariogenic biofilm [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(11): 1829-1835.
- [25] 蒋娟娜,解保生,周甜.基于口腔生物膜的抗菌研究方法 [J].海南医学,2018,29(3): 401-404.
- [26] MILLER EK, LEE JY, TAWIL PZ, et al. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors [J]. *Pediatr Dent*, 2012, 34(1): 66-69.
- [27] WANG YF, FAN YY, ZHOU ZL, et al. De novo synthetic short antimicrobial peptides against cariogenic bacteria [J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 80: 41-50.
- [28] JIANG W, WANG Y, LUO J, et al. Effects of antimicrobial peptide gh12 on the cariogenic properties and composition of a cariogenic multispecies biofilm [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(24): e01423-18.
- [29] ROMBOUTS C, GIRAUD T, JEANNEAU C, et al. Pulp vascularization during tooth development, regeneration, and therapy [J]. *J Dent Res*, 2017, 96(2): 137-144.
- [30] BANAS JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans* [J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 1267-1277.
- [31] MARSH PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries [J]. *Dent Clin North Am*, 2010, 54(3): 441-454.
- [32] GUAN C, CHE F, ZHOU H, et al. In vitro effect of rubusoside, a natural sucrose substitute, on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic potential and virulence gene expression [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(16): e01012-20.
- [33] WANG YF, WANG XQ, JIANG WT, et al. Antimicrobial peptide GH12 suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans* [J]. *J Oral Microbiol*, 2018, 10(1): 1442089.
- [34] WANG Y, ZENG Y, WANG Y, et al. Antimicrobial peptide gh12 targets *Streptococcus mutans* to arrest caries development in rats [J]. *Journal of Oral Microbiology*, 2018, 11(1).
- [35] JIANG W, WANG Y, LUO J, et al. Antimicrobial peptide gh12 prevents dental caries by regulating dental plaque microbiota [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(14): e00527-00520.

(收稿日期:2020-09-19)