ALPHA-MANGOSTIN ỨC CHẾ SỰ HÌNH THÀNH BIOFILM CỦA VI KHUẨN GÂY SÂU RĂNG *STREPTOCOCCUS MUTANS* UA159

Nguyễn Thị Mai Phương^{1*}, Võ Hoài Bắc¹, Phạm Thị Lương Hằng²,
Hoàng Phương Hà¹, Trần Thị Nhung¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *phuong_nguyen_99@yahoo.com

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

TÓM TẮT: *Streptococcus mutans* là tác nhân gây sâu răng chính ở người và cũng là đối tượng điển hình cho các nghiên cứu về sâu răng. Vi khuẩn này mang hai đặc tính gây bệnh chủ yếu là khả năng sinh axit cao và sinh polysaccharide (PS) ngoại bào (biofilm) mạnh. Trong nghiên cứu này, biofilm của *S. mutans* đã được xử lý với α -mangostin ở nồng độ 150 μ M. Kết quả cho thấy sinh khối và các thành phần biofilm gồm protein, PS nội bào (IPS), PS tan trong kiềm (APS), PS tan trong nước (WSP) đã giảm tới gần 40% so với đối chứng trong dung môi dẫn ethanol. Cấu trúc của biofilm cũng bị thay đổi đáng kể trong điều kiện xử lý này. Các enzyme glycosyltransferase (GTF) B và C liên quan đến sự hình thành biofilm của *S. mutans* cũng đã được khẳng định là đích tác dụng của α -mangostin. Ảnh hưởng của α -mangostin lên biểu hiện của các gene liên quan đến các đặc tính gây bệnh cũng như các cấu trúc chi tiết biofilm của *S. mutans* UA159 đang được tiến hành. Kết quả nghiên cứu cho thấy, α -mangostin là chất ức chế mới và tiềm năng sự hình thành biofilm của *S. mutans* UA159.

Từ khóa: *Streptococcus mutans* UA159, α -mangostin, biofilm, sâu răng.

MỞ ĐẦU

Sâu răng (dental caries) là một bệnh truyền nhiễm phổ biến nhất hiện nay ở người. Vi khuẩn là nguyên nhân chính gây nên sâu răng và kiểm soát vi khuẩn là biện pháp hữu hiệu nhất để phòng chống bệnh xoang miệng này. *Streptococcus mutans* được xác định là tác nhân gây sâu răng chính ở người và cũng là *Streptococcus* xoang miệng đầu tiên mà toàn bộ genome của nó (khoảng 2,1 Mb) đã được công bố. Vi khuẩn này mang hai đặc tính gây bệnh đặc biệt, đó là khả năng sinh axit cao và sinh polysaccharide ngoại bào (EPS) mạnh. EPS là bộ khung để tạo thành mảng bám răng, có tính chất như là biofilm sinh học. Sâu răng và các bệnh liên quan như viêm lợi (gingivitis), viêm quanh răng (periodontitis) thuộc trong số các bệnh gây ra bởi biofilm [10]. Như vậy, sử dụng các chất kháng khuẩn có khả năng ức chế được hai đặc tính gây bệnh của *S. mutans* sẽ là những biện pháp hữu hiệu và ưu việt để kiểm soát hoàn toàn bệnh này. Nghiên cứu gần đây của Nguyễn Thị Mai Phương và nnk. (2011) [11] đã tinh sạch và phát hiện được α -mangostin từ vỏ quả măng cụt *Garcinia mangostana* L. có tác dụng kháng vi khuẩn *S. mutans* ở dạng tự do (planktonic cells) rất mạnh, thông qua việc ức

chế sự sinh axit, hô hấp, sự sinh các chất kiềm và tác động lên màng tế bào vi khuẩn. Những kết quả thu được bước đầu cũng gợi ý rằng chất này có ảnh hưởng đến tế bào trên biofilm, là dạng tồn tại thực tế của các vi khuẩn trong xoang miệng. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá tác dụng của α -mangostin lên sự hình thành biofilm của vi khuẩn *S. mutans*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* UA159 chuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch BHI (brain heart infusion agar) Difco, Hoa Kỳ, ở 37°C trong điều kiện áp suất CO₂ 5%.

Phương pháp

Tạo biofilm: Biofilm (mô hình bắt trước mảng bám răng) được hình thành trên các đĩa hydroxyapatite có đường kính 0,5 cm (Clarkson Chromatography Products Inc. Hoa Kỳ) (hình 1). Môi trường cho nuôi cấy tế bào biofilm có chứa tryptone 3%, dịch chiết nấm men 0,5% và sucrose 1%. Biofilm được thu hoạch sau 68 giờ nuôi cấy. Để tách rời các tế bào khỏi mảng biofilm, các mảng này được tách khỏi giá thể vào trong dung dịch NaCl 0,89% và sau đó

được làm đồng nhất bằng máy nghiền đồng thể và máy siêu âm (Branson sonifier 150, Hoa Kỳ) [7, 8]. Biofilm được xử lý với chất nghiền cứu 2 lần/ngày, cách nhau 8 tiếng trong thời gian 1 phút.

Tạo tế bào thấm (permabilized cells): tế bào biofilm trong đệm Tris-HCl 75 mM, pH = 7,0 chứa MgSO₄ 10 mM được xử lý với toluene (tỉ lệ 1:10 về thể tích) để tạo tế bào thấm. Quá trình này được thực hiện thông qua hai chu kỳ xử lý gồm: i) làm đông lạnh trong hỗn hợp đá khô với ethanol trong 1 phút và ii) làm tan ở 37°C trong 5 phút. Toluene sau đó được loại bỏ bằng ly tâm ở 6000 g trong 10 phút ở 4°C. Tế bào thấm được hoà trở lại trong đệm Tris-HCl, pH = 7,0 và được cất giữ ở -70°C cho đến khi dùng [11].

Đánh giá sự tích lũy polysaccharide ngoại bào: Biofilm của *S. mutans* sau 68 giờ nuôi cấy được thu hoạch, siêu âm và dùng để đánh giá: i) **sinh khối biofilm:** được thu lại sau khi ly tâm

6000 g trong 10 phút ở 4°C. Phần tủa được rửa 2 lần với nước cất loại ion và xác định trọng lượng khô; ii) **Protein:** được xác định sử dụng phương pháp thủy phân chân không với HCl và phenol tinh thể sau đó định lượng bằng ninhydrin; iii) **Thành phần EPS ngoại bào:** EPS tan trong nước và glucan tan trong kiềm định lượng bằng hỗn hợp phenol 5% và axit sulfuric sử dụng glucose làm chất chuẩn. Thành phần polysaccharide không tan (IPS) được chiết với KOH 5M và định lượng sử dụng iot 0,2% trong KI 2% [9].

Xác định hoạt tính GTF: hoạt tính GTF được xác định theo phương pháp của Koo et al. (2003) [9]. GTFB và GTFC thu được từ những chủng tế bào tái tổ hợp mang gene sinh tổng hợp chỉ một loại enzyme này. Các enzyme GTFC và GTFB được trộn đều với chất nghiền cứu và được ủ với cơ chất [¹⁴C-glucose]-sucrose. Các glucan mang glucose đánh dấu được xác định bằng máy đếm nhấp nháy lỏng.

Đĩa hydroxyapatite

Giá đỡ biofilm

Đĩa nuôi cấy biofilm

Hình 1. Mô hình tạo biofilm *S. mutans* trên bề mặt đĩa hydroxyapatite

Cấu trúc của biofilm: trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ đánh giá sự phân bố các thành phần polysaccharide ngoại bào và vi khuẩn trong các biofilm sử dụng phương pháp nhuộm huỳnh quang đánh dấu *in situ* đặc hiệu kết hợp với phân tích hình ảnh trên kính hiển vi huỳnh quang đồng tụ quét laser (LSCFM) với sự hỗ trợ của phần mềm Amira™ 4.1.1 (Chelmsford, MS, USA) [5, 6]. EPS được nhuộm với dextran đánh dấu Alexa Fluor® 647-(10,000 MW; Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Vi khuẩn trong biofilm được đánh dấu với chất nhuộm axit nucleic SYTO® 9 green-(480/500 nm; Molecular Probes Inc., Eugene, OR).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

α-mangostin ức chế sự hình thành biofilm của vi khuẩn *S. mutans*

Các nghiên cứu đã cho thấy, các vi sinh vật sống trên biofilm (biofilm cells) thường có khả năng chống chịu cao hơn (từ hàng 10 tới hàng 1000 lần) với các chất kháng khuẩn so với các tế bào sống tự do (planktonic cells) [12]. Việc loại bỏ các biofilm bằng con đường truyền thống sử dụng kháng sinh là không hiệu quả vì tính chống chịu cao của các tế bào trên biofilm, sự thích nghi về trao đổi chất của các tế bào này với kiểu sống trên biofilm và hơn thế nữa, là có thể làm xuất hiện những chủng vi khuẩn kháng kháng sinh. Như vậy, các chiến lược hữu hiệu nhằm kiểm soát các bệnh gây ra do biofilm, trong đó có bệnh sâu răng, hiện nay đang tập

trung vào việc tìm kiếm những chất kháng khuẩn có khả năng làm tổn thương hay can thiệp vào sự hình thành biofilm của vi khuẩn gây bệnh.

Dựa trên các số liệu đã công bố trước đây của chúng tôi về tác dụng của α -mangostin với các tế bào tự do [11], chúng tôi đã sử dụng các nồng độ 100, 150 và 200 μ M để đánh giá ảnh hưởng của chất này lên sự phát triển biofilm của

S. mutans. Kết quả thu được cho thấy, sau 68 giờ nuôi cấy với 5 lần xử lý, sinh khối biofilm và hàm lượng protein đã giảm đi đáng kể so với đối chứng (Hình 2). Ở nồng độ 100 μ M, tác dụng này đạt 24%. Ở nồng độ 150 μ M, tác dụng này đạt tới 35%, thấp hơn không nhiều so với nồng độ 200 μ M. Như vậy có thể thấy sử dụng nồng độ α -mangostin 150 μ M là thích hợp để xử lý biofilm của vi khuẩn *S. mutans*.

Hình 2. Ảnh hưởng của α -mangostin ở các nồng độ khác nhau lên sinh khối và hàm lượng protein trong biofilm của vi khuẩn *S. mutans*. a. Sinh khối biofilm; b. Protein.

Để đánh giá ảnh hưởng của α -mangostin lên các thành phần cấu tạo, biofilm của vi khuẩn *S. mutans* được xử lý với α -mangostin 150 μ M ở điều kiện xử lý đã được thiết lập tối ưu. Các số liệu thu được trong bảng 1 cho thấy bên cạnh việc giảm sinh khối biofilm và hàm lượng protein (36% và 40% theo thứ tự) so với đối chứng thì hàm lượng ASP (EPS tan trong kiềm) và IPS (EPS nội bào) cũng giảm đáng kể. Hàm lượng EPS tan trong nước (WSP) cũng có sự thay đổi nhưng không nhiều so với các thành phần EPS khác. Việc giảm hàm lượng ASP và sinh khối tổng số biofilm gợi ý chất này có ảnh

hưởng lên các enzyme liên quan đến sự sinh biofilm là GTFB và GTFC. Điểm đáng chú ý là IPS nội bào được xem là có vai trò quan trọng trong tính chống chịu axit của vi khuẩn vì nó là thành phần dự trữ năng lượng của tế bào. Việc làm giảm hàm lượng IPS gợi ý α -mangostin có thể làm giảm tính chống chịu axit của vi khuẩn. Điều này là phù hợp với phát hiện của chúng tôi trước đây với tế bào *S. mutans* ở dạng tự do. Như vậy, α -mangostin đã ức chế sự hình thành biofilm của vi khuẩn này thông qua việc làm giảm sự tích lũy của các thành phần của biofilm, đặc biệt là ASP, IPS và protein.

Bảng 1. Ảnh hưởng của α -mangostin lên thành phần biofilm của vi khuẩn *S. mutans*

Thành phần biofilm	Đối chứng (mg)	Xử lý α -mangostin 150 μ M (mg)	P (t-test với n = 12)
Sinh khối biofilm	4,73 $\pm$ 0,413	3,010 $\pm$ 0,45	< 0,05
Protein	2,85 $\pm$ 0,380	1,67 $\pm$ 0,19	< 0,05
WSP	326,62 $\pm$ 37,167	229,67 $\pm$ 91,00	> 0,05
ASP	1112,13 $\pm$ 151,69	356,99 $\pm$ 49,04	< 0,05
IPS	188,34 $\pm$ 151,69	79,88 $\pm$ 49,04	< 0,05

α -mangostin ức chế hoạt tính của các enzyme GTFB và GTFC liên quan đến sự hình thành biofilm

Enzyme glucosyltransferase (GTF) sử dụng cơ chất sucrose để tổng hợp các glucan ngoại bào. Những glucan này làm tăng khả năng gây bệnh của vi khuẩn nhờ việc tăng cường sự dính kết và tích lũy các vi khuẩn trên bề mặt biofilm. Các phân tích hoá học cho thấy 40% mảng bám răng được tạo thành từ chính các glucan này [2,4]. Vì vậy, enzyme này được xem như là một nhân tố quan trọng trong quá trình gây bệnh của vi khuẩn. *S. mutans* sản xuất 3 loại GTF chủ yếu là GTFB, xúc tác cho sự sinh tổng hợp một polymer không tan từ sucrose có chứa liên kết α -1,3 glucan, GTFC sinh tổng hợp một hỗn hợp polymer tan và không tan có chứa liên kết α -1,3 và 1,6 glucan, và GTFD sinh tổng hợp một polymer tan có chứa liên kết α -1,3 glucan. Kết quả nghiên cứu trình bày ở trên gợi ý rằng các GTFB và C có thể là đích tác dụng của chất kháng khuẩn này. Số liệu thu được ở hình 3 đã chỉ ra rằng cả GTFB và GTFC ở đây đều nhạy cảm với α -mangostin với 80% hoạt tính bị ức chế ở nồng độ 150 μ M. Hoạt tính ức chế của chất này cao hơn đáng kể so với tác dụng của một số chất kháng khuẩn tự nhiên khác được

công bố trước đây [1, 3, 4].

Hình 3. Ảnh hưởng của α -mangostin lên hoạt độ GTFB và GTFC của *S. mutans*

α -mangostin làm thay đổi cấu trúc biofilm

Biofilm sau 68 giờ phát triển ở điều kiện có xử lý và không xử lý với α -mangostin 150 μ M đã được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang đồng tụ quét laser. Hình ảnh biofilm thu được (hình 4) cho thấy cấu trúc của biofilm đã thay đổi đáng kể ở mẫu được xử lý với α -mangostin so với đối chứng. Cấu trúc biofilm xuất hiện nhiều khoảng trống và các vi khuẩn lạc (microcolony) có vẻ to hơn so với đối chứng. Kết quả thu được cũng phù hợp với những số liệu thu được về sự thay các đổi thành phần biofilm được trình bày ở trên.

Đối chứng

Xử lý với α -mangostin 150 μ M

→Microcolony

Hình 4. α -mangostin làm thay đổi cấu trúc biofilm của *S. mutans*.

Ảnh nhuộm huỳnh quang biofilm trong đó EPS có màu đỏ và vi khuẩn có màu xanh.

Các nghiên cứu hiện nay tập trung nhiều vào việc làm giảm khả năng biểu hiện của các yếu tố gây bệnh của *S. mutans* mà không nhất thiết phải diệt vi khuẩn đích này. Chiến lược này nhằm vào việc làm mất khả năng gây bệnh

của vi khuẩn nhưng không đe dọa sự tồn tại của chúng có thể sẽ giúp làm giảm khả năng kháng thuốc và tránh được sự xáo trộn lớn trong quần thể vi khuẩn cư ngụ. Chiến lược kiểm soát sự tạo biofilm thông qua việc ức chế sự hình thành

EPS vì thế có thể là biện pháp thay thế (hay kết hợp) hữu hiệu [9]. Lý do là vì các EPS có thể đóng vai trò như là một chất hấp thụ phản ứng, vì vậy sẽ làm giảm sự xâm nhập của chất kháng khuẩn với các tế bào trên biofilm. Như vậy, các chất có khả năng làm giảm EPS có thể làm tăng tính hiệu quả của chất kháng khuẩn với các tế bào biofilm. Koo et al. (2009) [6] đã chỉ ra rằng chất kháng khuẩn mới nên có một hay nhiều đặc tính sau: (1) ức chế sự gắn kết của các glucosyltransferase (GTFs) vào bề mặt film; (2) ức chế sự sinh tổng hợp các EPS trên bề mặt; (3) ảnh hưởng đến cấu trúc của lưới EPS; (4) ức chế sự dính kết và xâm chiếm của vi khuẩn; (5) làm mất khả năng sinh axit và các cơ chế thích nghi axit; (6) làm giảm khả năng sinh trưởng của các vi khuẩn gây bệnh xoang miệng; (7) làm thay đổi hệ sinh thái và hóa sinh của biofilm [4, 6]. Như vậy, rõ ràng α -mangostin có thể xem là chất kháng biofilm (anti-biofilm agent) tiềm năng và cần phải được tiếp tục nghiên cứu sâu về cơ chế tác dụng của nó nhằm hướng tới ứng dụng thực tế.

KẾT LUẬN

α -mangostin là chất kháng biofilm tiềm năng thông qua việc làm giảm khả năng sinh biofilm, ức chế các enzyme glycosyltransferase B và C tham gia vào quá trình tạo biofilm cũng như làm thay đổi cấu trúc biofilm của vi khuẩn *S. mutans*.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ về kinh phí của của quỹ quốc tế dành cho khoa học IFS của Thụy Điển (F4087/2) và của đề tài nghiên cứu cơ bản (106.05-2011.440 thuộc Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Almeida L. S., Murata R. M., Franco E. M., dos Santos M. H., de Alencar S. M., Koo H., Rosalen P. L., 2011. Effects of 7-epiclusianone on *Streptococcus mutans* and caries development in rats. *Planta Med.*, 77(1): 40-45.
- Bowen W. H., Koo H., 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.*, 45(1): 69-86.
- Duarte S., Gregoire S., Singh A. P., Vorsa N., Schaich K., Bowen W. H., Koo H., 2006. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 257(1): 50-56.
- Gregoire S., Singh A. P., Vorsa N., Koo H., 2007. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *J. Appl. Microbiol.*, 103(5): 1960-1968.
- Koo H., Xiao J., Klein M. I., 2009. Extracellular polysaccharides matrix-an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *Int. J. Oral. Sci.*, 1(4): 229-234.
- Jeon J. G., Klein M. I., Xiao J., Gregoire S., Rosalen P. L., Koo H., 2009. Influences of naturally occurring agents in combination with fluoride on gene expression and structural organization of *Streptococcus mutans* in biofilms. *BMC Microbiol.*, 9: 228-232.
- Koo H., Duarte S., Murata R. M., Scott-Anne K., Gregoire S., Watson G. E., Singh A. P., Vorsa N., 2010. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development *in vivo*. *Caries Res.*, 44(2): 116-126.
- Koo H., Xiao J., Klein M. I., Jeon J. G., 2010. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J. Bacteriol.*, 192(12): 3024-3032.
- Koo H., Hayacibara M. F., Schobel B. D., Cury J. A., Rosalen P. L., Park Y. K., Vacca-Smith A. M., Bowen W. H., 2003. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52(5): 782-789.

10. Loesche W. J., 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev., 50(4): 353-380.
11. Nguyen P. T. M., and Marquis R. E., 2011. Antimicrobial actions of alpha-mangostin against oral Streptococci. Can. J. Microbiol., 57(3): 217-225.
12. Wilson M., 1996. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J. Med. Microbiol., 44: 79-87.

ALPHA-MANGOSTIN INHIBITS BIOFILM FORMATION BY *STREPTOCOCCUS MUTANS* UA159

Nguyen Thi Mai Phuong¹, Vo Hoai Bac¹, Pham Thi Luong Hang²,
Hoang Phuong Ha¹, Tran Thi Nhung¹

¹Institute of Biotechnology, VAST

²VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi

SUMMARY

Streptococcus mutans is the primary etiological agent of human dental caries. The well-known extraordinary ability of *S. mutans* to adapt and survive the environment of human mouth is highly acidogenicity and strong exopolysaccharide (EPS) production, a skeleton of dental plaque (biofilm). In this research, the total biofilm biomass, as well as the contents of protein, intracellular polysaccharide (IPS), alkaline soluble polysaccharide (ASP), water soluble polysaccharide (WSP) in the biofilm treated with 150 μ M α -mangostin was reduced ca. 40% compared to those of the control in ethanol as the vehicle. Two important glycosyltransferases B and C, responsible for biofilm formation by *S. mutans*, showed to be very sensitive to α -mangostin. Under the treatment condition, biofilm structure was clearly changed. Non-uniform and bigger microcolonies were found in the treated biofilms. Effects of α -mangostin on expression of the virulent genes and the detailed changes in biofilm structure are now under examination. The results showed that the α -mangostin is a new and potential anti-biofilm agent of *S. mutans* UA159.

Key words: *Streptococcus mutans* UA159, α -mangostin, biofilm, dental caries.

Ngày nhận bài: 30-6-2013