

TÁC ĐỘNG CỦA KẼM (Zn) LÊN CÁC EMZIM CỦA VI KHUẨN XOANG MIỆNG

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG

Viện Công nghệ sinh học

PHAN TUẤN NGHĨA

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN

Các muối của kẽm (Zn), đặc biệt là kẽm xi-trát và kẽm sun-phát, đã được sử dụng rộng rãi như là những chất kháng khuẩn trong các sản phẩm vệ sinh răng miệng. Tác động của Zn lên các vi khuẩn xoang miệng, trong đó có *Streptococcus*, đã được đề cập trong một số nghiên cứu trước đây. Kẽm sun-phát được phát hiện là có khả năng ức chế sự sinh axit của vi khuẩn *Streptococcus* ở mảng bám răng người, cả trạng thái invitro và invivo. He và cs. [6] phát hiện thấy Zn ức chế sự sinh axit không chỉ của *Streptococcus* mà còn của nhiều loài vi khuẩn xoang miệng khác. Gần đây, Phan và cs. [11] đã cho thấy Zn còn ức chế mạnh sự sinh kiềm của các vi khuẩn trong mảng bám răng, trong đó có *S. salivarius* và *S. rattus*. Mặc dù các nghiên cứu đã tìm hiểu khá kỹ về tác dụng kháng khuẩn của Zn lên vi khuẩn nhưng vẫn còn nhiều câu hỏi chưa được giải đáp. Ví dụ như Zn có vai trò gì đối với quá trình tổn thương oxy hóa ở vi khuẩn nhóm *Streptococcus* hoặc là Zn có tác động như thế nào lên các enzym liên quan đến các quá trình sinh lý đã khảo sát. Mục đích nghiên cứu của chúng tôi là nhằm tìm hiểu sâu hơn tác động của Zn lên các enzym và hệ thống enzym liên quan trực tiếp đến hoạt tính gây sâu răng của vi khuẩn xoang miệng, từ đó làm sáng tỏ thêm cơ chế kháng khuẩn của Zn.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Các chủng vi sinh vật *Streptococcus mutans* GS-5, *S. rattus* FA-1, *S. salivarius* ATCC 13419 và *S. sanguis* NCTC 10904, *Lactobacillus plantarum*, *Actenomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum* □ quà tặng của GS. Robert E. Marquis, Khoa Vi sinh và Miễn dịch học, Đại học Rochester,

Niu Yoóc, Hoa Kỳ. Các chủng vi sinh vật dùng cho nghiên cứu được giữ và cấy chuyển hàng tuần trên môi trường tryptic soy agar (TSA) của hãng Difco. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường chứa 3% tripton, 0,5% dịch chiết nấm men và 1% glucoza.

2. Phương pháp

a. Chuẩn bị dịch chiết tế bào

Tế bào của *S. mutans* được thu hoạch ở pha ổn định và được rửa với dung dịch muối có chứa KCl 50 mM và MgCl₂ 1 mM. Cặn tế bào được hòa với một thể tích tối thiểu đệm Tris-HCl 20 mM, pH = 7,0 có chứa KCl 50 mM và MgCl₂ 1 mM. Việc phá tế bào để giải phóng protein trong màng được thực hiện bằng siêu âm cùng với cát thủy tinh. Dịch siêu âm được ly tâm với tốc độ 14.000 g trong 15 phút ở 4°C để thu dịch trên tủa. Dịch này được sử dụng cho các thí nghiệm với dịch chiết tế bào.

b. Chuẩn bị tế bào thấm (permeabilized cells)

Tế bào, sau khi được rửa hai lần với dung dịch muối KCl 50 mM có chứa MgCl₂ 1 mM, được hòa vào trong đệm Tris-HCl 75 mM (pH = 7,0) có chứa MgSO₄ 10 mM. Sau khi thêm toluen (tỷ lệ 1: 10), dịch chiết tế bào được trộn đều và ủ ở 37°C trong 5 phút. Tế bào được nhanh chóng làm đông lạnh và ngay sau đó, được làm tan ở 37°C. Chu kỳ này được lặp lại hai lần. Toluene được loại bỏ bằng cách ly tâm. Tế bào được hòa trở lại trong đệm cùng đệm trên và được cất giữ ở 37°C đến khi dùng hoặc có thể được dùng trực tiếp cho các phân tích.

c. Các phương pháp nghiên cứu enzym

Hoạt độ của các enzym được xác định sử dụng tế bào thấm hoặc dịch chiết tế bào tùy theo từng enzym. Hoạt độ của các enzym được xác

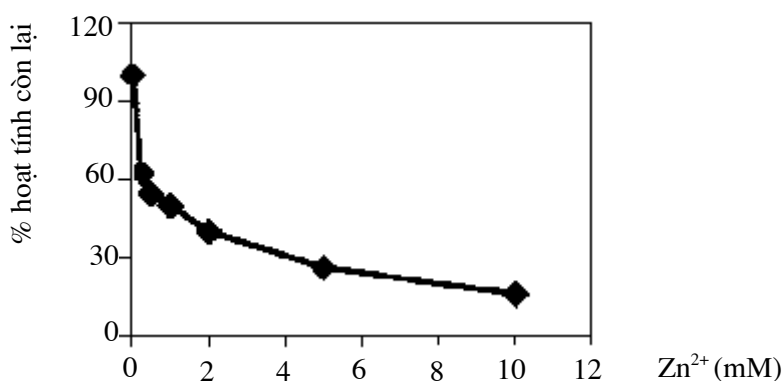
định theo các phương pháp sau: F-ATPase [14]; phospho transferase system-PTS [2]; glyceraldehydephosphate dehydrogenase-GADPH [13]; lactate dehydrogenase-LDH [7]; pyruvate kinase-PK [10]; urease [5]; arginine deiminase-ADS [4]; NADH oxidase-NOX [12]; superoxide dismutase-SOD [8]; glutathione reductase-GR [1]; thiol peroxidase-TSA [9]; NADH hypothiocyanite reductase-NHOR [3]; catalase-CAT; pseudocatalase-PCAT [15].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tác dụng của Zn lên enzym F-ATPaza

Enzim ATPaza được tìm thấy ở tất cả các sinh vật nhân chuẩn, có vai trò phân giải ATP và bơm từ tế bào chất ra bên ngoài nhằm ổn định pH nội sinh (pH_i), nhờ vậy duy trì được hoạt động của các enzym và bào quan trong nguyên sinh chất. Ở nhiều loài vi khuẩn, trong đó có *S.*

mutans, enzym này đóng vai trò chìa khóa trong việc đảm bảo sự thích nghi của tế bào với điều kiện axit. Có hai loại ATPaza là F-ATPaza mang phức hệ protein F_1-F_0 nằm trên màng tế bào, có vai trò tạo hoạt tính của enzym và các ATPaza vận chuyển các cation như K^+ -ATPaza và Na^+ -ATPaza. Phần lớn hoạt tính phân giải ATP (ATPaza) của *S. mutans* thuộc về F-ATPaza trên màng. Khi vi khuẩn tiêu thụ đường, các axit hữu cơ sinh ra trong quá trình đường phân làm pH ở mảng bám răng giảm xuống rất thấp. Vai trò của F-ATPaza lúc này có ý nghĩa quan trọng đối với chúng. Trong số các vi khuẩn đường miệng, *S. mutans* là một trong số rất ít loài có khả năng chống chịu axit cao. Vi khuẩn này vẫn có thể tiến hành quá trình đường phân ở pH thậm chí dưới 3,0. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng ATPaza đóng vai trò chính giúp vi khuẩn *S. mutans* thích nghi với điều kiện khắc nghiệt này.



Hình 1. Ảnh hưởng của Zn^{2+} lên hoạt độ của enzym F-ATPaza của *S. mutans*. Hoạt độ của enzym được xác định sử dụng tế bào thẩm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của Zn^{2+} lên hoạt độ của F-ATPaza được trình bày ở hình 1, đã cho thấy hoạt độ của F-ATPaza chỉ còn 30% ở nồng độ Zn^{2+} 0,1 mM và phải cần đến Zn^{2+} 1,5 mM để đạt được mức độ ức chế 50% hoạt độ của enzym. Enzim chỉ còn 10% hoạt độ ở nồng độ Zn^{2+} 10 mM. Có thể kết luận rằng enzym F-ATPaza bị ức chế bởi Zn^{2+} nhưng mức độ nhạy cảm của enzym không cao.

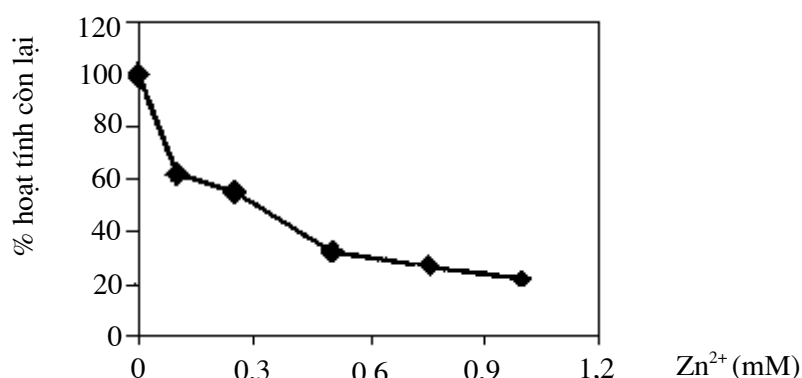
2. Tác động của Zn lên enzym PTS

Đường là nguồn hydrat cacbon chủ yếu của các vi khuẩn nhóm *Streptococcus*. Tế bào vi khuẩn này có thể đồng hóa được nhiều loại

đường khác nhau như glucoza, fructoza, sucroza. Trước khi đi vào còn đường glycolysis, đường được hoạt hóa thành dạng glucoza-6-phốtphat nhờ hệ thống enzym chuyển gốc phốtphat (sugar-phosphotransferase system) viết tắt là PTS và hexokinaza, trong đó hệ thống PTS đóng vai trò chính [2]. Sự ức chế quá trình sinh axit của *S. mutans* bởi Zn^{2+} đã được phát hiện trong các nghiên cứu trước đây [6, 10], gợi ý mối liên quan của enzym PTS với quá trình này. Kết quả thu được ở hình 2 cho thấy Zn^{2+} ở nồng độ khá thấp (0,02 mM) đã ức chế 50% hoạt độ của PTS. Hoạt độ của PTS bị ức chế tới gần 90% ở nồng độ Zn^{2+} 1 mM. Thí nghiệm này

chúng tỏ phức hệ enzym PTS nhạy cảm với tác dụng của Zn^{2+} . Chính điều này đã lý giải tại sao

Zn^{2+} lại ức chế mạnh quá trình sinh axit của vi khuẩn *S. mutans*.



Hình 2. Ảnh hưởng của Zn^{2+} lên hoạt độ của enzym PTS của *S. mutans*. Hoạt độ của enzym được xác định sử dụng tế bào thấm

3. Tác động của Zn lên các enzym của quá trình đường phân

Quá trình đồng hóa đường của vi khuẩn sâu răng được thực hiện thông qua con đường đường phân (glycolysis). Glycolysis có vai trò chuyển hóa đường trong điều kiện kỵ khí thành axit hữu cơ và giải phóng ATP cho các hoạt động sống

của tế bào. Sự hình thành các axit hữu cơ, đặc biệt là lactic, là nguyên nhân chính gây ra sâu răng. Tham gia vào con đường glycolysis có hàng loạt các enzym khác nhau. Công trình nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào một số enzym chính là glyxêraldêhít-3-phosphat dehydrogenaza (GAPDH), enolaza, pyruvat kinaza (PK), lactat dehydrogenaza (LDH) và aldolaza.

Bảng 1

Tác động của Zn^{2+} lên các enzym của quá trình đường phân (hoạt độ của enzym được xác định sử dụng tế bào thấm. IC₅₀-nồng độ gây ức chế 50% hoạt độ của enzym)

Enzim	Vi khuẩn	Hoạt tính ức chế	IC ₅₀ (mM)
GAPDH	<i>S. mutans</i>	+	0,25
LDH	<i>S. mutans</i>	-	
PK	<i>S. mutans</i>	+	1,2
Aldolaza	<i>S. mutans</i>	+	1,4
Enolaza	<i>S. mutans</i>	-	

Các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của Zn^{2+} lên hoạt độ của các enzym đường phân được trình bày ở bảng 1. Kết quả cho thấy các enzym PK, GAPDH và aldolaza khá nhạy cảm với tác dụng của Zn^{2+} . Đối với các enzym này của tế bào thấm, mức độ ức chế 50% hoạt độ tương ứng với nồng độ Zn^{2+} theo thứ tự là 1,2; 0,25 và 1,4 mM. Zn^{2+} được xem là có khả năng tương tác cạnh tranh với nhóm thiol trong phân tử enzym, vì thế dễ làm bất hoạt các enzym có chứa nhóm chức này. Trong số các enzym được nghiên cứu, GAPDH là enzym nhạy cảm với Zn^{2+} hơn cả. Lý do của sự nhạy cảm này có thể là do enzym có chứa nhóm SH bên trong phân

tử. PTS cũng thuộc nhóm thiol-enzim vì thế có lẽ cũng là đích tác dụng của Zn^{2+} .

4. Tác dụng của Zn lên enzym sinh NH_3

Một trong các cơ chế giúp vi khuẩn xoang miệng có thể sống sót trong điều kiện stress axit là khả năng sinh amôniac (NH_3) để trung hòa axit trong tế bào chất và môi trường bên ngoài [4]. Ba con đường chính mà các vi khuẩn sử dụng để tạo amôniac là thông qua hai hệ thống enzym là ureaza và acginin deiminaza (ADS). NH_3 được tạo ra thông qua các con đường này, ngay lập tức kết hợp với các proton có trong tế bào chất hay được vận chuyển qua màng tế bào

và kết hợp với các proton ở môi trường bên ngoài để hình thành NH_4 , nhờ đó làm tăng pH nội bào hay pH của môi trường bên ngoài, vì vậy làm tăng tính chống chịu axit của vi khuẩn. Công trình nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện với hai chủng vi khuẩn sinh NH_3 chủ yếu có trong mảng bám răng là *S. salivarius*

ATCC13419 và *S. rattus* FA-1. Kết quả (bảng 2) cho thấy cả hai enzym đều nhạy cảm với Zn^{2+} , đặc biệt là ureaza ($\text{IC}_{50} = 0,03 \text{ mM}$). Việc ức chế các enzym sinh kiềm đã chứng tỏ Zn^{2+} có tác động lên nhiều quá trình sinh lý quan trọng của vi khuẩn và cũng chứng tỏ Zn^{2+} có nhiều đích tác dụng khác nhau.

Bảng 2

Ảnh hưởng của Zn^{2+} lên các enzym sinh NH_3 (hoạt độ của enzym được xác định sử dụng tế bào thắm. IC_{50} -nồng độ gây ức chế 50% hoạt độ của enzym)

Enzim	Vi khuẩn	Hoạt tính ức chế	IC_{50} (mM)
Ureaza	<i>S. salivarius</i> ATCC13419	+	0,03
ADS	<i>S. rattus</i> FA-1	+	0,10

5. Tác dụng của Zn lên các enzym chống tổn thương oxy hóa

Các vi khuẩn trong mảng bám răng thường xuyên tiếp xúc với các gốc oxy phản ứng (reactive oxygen species, gọi tắt là ROS) sinh ra trong quá trình trao đổi chất hay có mặt trong các sản phẩm vệ sinh răng miệng. ROS gây ra những tổn thương oxy hóa cho tế bào, là quá trình có tính chất chìa khóa gây ảnh hưởng đến các hoạt động của vi khuẩn trong mảng bám răng [8, 12]. Việc tìm hiểu bức tranh về quá trình tổn thương oxy hóa ở vi khuẩn trong mảng bám răng mà trước hết ở *Streptococcus* và qua đó xác định các cơ chế bảo vệ chủ yếu là cần thiết và cũng là hướng nghiên cứu có tính thực tiễn lớn, giúp tìm ra những biện pháp hiệu quả

hơn để kiểm soát các bệnh truyền nhiễm trong xoang miệng, đặc biệt là sâu răng.

Nhằm duy trì sự cân bằng thể oxy hóa và bảo vệ các cấu trúc của tế bào, cơ thể sinh vật đã phát triển một hệ thống những enzym có chức năng phân hủy hay loại bỏ ROS. Các enzym chống tổn thương oxy hóa được khảo sát chủ yếu trong thí nghiệm của chúng tôi gồm SOD (loại bỏ O_2), NHOR, GR, TSA, CAT, PCAT (loại bỏ H_2O_2) và NOX (hạn chế quá trình khử đơn vị O_2 , vì thế hạn chế sự tạo thành ROS). PCAT (pseudocatalaza) là enzym giả CAT có mặt ở một số chủng vi khuẩn xoang miệng như *Lactobacillus plantarum*. Enzim này cũng có tác dụng phân hủy H_2O_2 nhưng không chứa hem như CAT mà chứa Mn^{2+} trong trung tâm hoạt động.

Bảng 3

Ảnh hưởng của Zn lên các enzym chống tổn thương oxy hóa (hoạt độ của enzym được xác định sử dụng tế bào thắm. IC_{50} -nồng độ gây ức chế 50% hoạt độ của enzym)

Enzim	Vi khuẩn	Hoạt tính ức chế	IC_{50} (mM)
NADH oxidaza (NOX)	Nhóm <i>Streptococcus</i>	+	2,1-3,0
NADH hypothioxyanit reductaza (NHOR)	<i>F. nucleatum</i>	+	1,4
Glutathion reductaza (GR)	<i>S. sanguis</i>	+	0,1
Thiolperoxidaza (TSA)	<i>S. mutans</i>	+	0,4
Catalaza (CAT)	<i>S. mutans</i>	+	0,1
Pseudocatalaza (PCAT)	<i>A. viscosus</i>	-	
Superoxite dismutaza (SOD)	<i>L. plantarum</i>	-	
	<i>Streptococcus</i>	-	

Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 3 đã cho thấy Zn^{2+} có tác dụng ức chế một số enzym có vai trò chống tổn thương oxy hóa là NOX, NHOR, GR và TSA. Tuy nhiên, hai

enzim có vai trò quan trọng trong việc loại bỏ ROS là CAT và SOD lại không phải là đích tác dụng của Zn^{2+} . Lý do tại sao các enzym này không bị ức chế bởi Zn^{2+} là vấn đề cần phải

được tiếp tục nghiên cứu. Phát hiện này đã chứng tỏ Zn không chỉ là tác nhân chống oxy hóa (antioxidant) như một vài tác giả trước đây đã công bố mà còn có vai trò như một tác nhân gây tổn thương oxy hóa (prooxidant). Công trình nghiên cứu của chúng tôi đã chứng tỏ rằng cơ chế tác động của Zn lên các vi khuẩn xoang miệng là phức tạp và còn nhiều vấn đề cần phải được làm sáng tỏ.

III. KẾT LUẬN

Zn ức chế hàng loạt các enzym như pyruvat kinaza (PK), aldolaza, photphotransferaza (PTS) và F-ATPaza của *S. mutans*. Zn còn là chất ức chế của các enzym sinh kiềm acginin deimiaza (ADS) của *S. rattus* FA-1 và ureaza của *S. salivarius* cũng như các enzym chống tổn thương oxy hóa là NADH oxidaza (NOX), glutathion reductaza (GR), thiolperoxidaza (TSA) và NADH hypothioxyanit reductaza (NHOR). Các kết quả thu được chứng tỏ Zn là chất kháng vi khuẩn có hiệu quả và có tiềm năng ứng dụng không chỉ trong các sản phẩm vệ sinh răng miệng, mà còn có thể sử dụng trong những lĩnh vực khác của y học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bazzichi C. M. Clinic.**, 2002: Experiment. Rheumatol., 20: 761-766.
2. **Belli W. A., Marquis R. E.**, 1991: Appl. Environ. Microbiol., 57: 1131-1138.
3. **Courtois F. H., and Pourtois E. R.**, 1996: Biol. Mol. Med., 57: 134-148.
4. **Curran T. M. et al.**, 1998: J. Clin. Periodontol., 44: 1078-1085.
5. **Curran T. M., Buckley D. H. and Marquis R. E.**, 1994: FEMS Microbiol. Lett., 119: 283-288.
6. **He G., Pearce E. I. F. and Sissons C. H.**, 2002: Arch. Oral. Biol., 47: 117-129.
7. **Iwairni Y. et al.**, 1992: Oral. Microbiol. Immunol., 7: 304-308.
8. **McCord J. M., Fridovich I.**, 1969: J. Biol. Chem., 244: 6049-6055.
9. **Park K. J.**, 2000: J. Biol. Chem., 275: 5723-5732.
10. **Phan T. N. et al.**, 2004: Oral. Microbiol. Immunol., 19:31-38.
11. **Phan T. N., Reidrniler J. S., Marquis R. E.**, 2001: Arch. Microbiol., 174: 248-255.
12. **Poole L. B. et al.**, 1986: J. Biol. Chem., 261: 14525-14533.
13. **Scheek R. M. and Slater E. C.**, 1982: In: Methods in Enzymeology: 305-306 (Colowick S. P and Kaplan N.O., Eds.) Academic Press, San Diego.
14. **Sturr M. G. and Marquis R. E.**, 1992: Appl. Environ. Microbiol., 58: 2287-2291.
15. **Thibodeau H. K. and Keef B. A.**, 1999: Oral. Microbiol. Immunol., 5: 328-331.

ZINC EFFECTS ON ENZYMES OF ORAL BACTERIA

NGUYEN THI MAI PHUONG, PHAN TUAN NGHIA

SUMMARY

Zinc (Zn) is a known inhibitor of acid production by mutans streptococci. Our primary objective was to extend current knowledge of the physiologic bases for this inhibition of Zn on enzymes of oral bacteria. Zn inhibited the F-ATPase of permeabilized cells of *S. mutans* with a 50% inhibitory concentration of about 1 mM for cells in suspensions. Zn inhibited the phosphoenolpyruvat: sugar phosphotransferase system with 50% inhibition at about 0.3 mM ZnSO₄. Zn inhibited the alkali production from arginine or urea and was a potent enzyme inhibitor for arginine deiminase of *S. rattus* FA-1 and urease of *S. salivarius*. Moreover, Zn acted mainly as a pro-oxidant for oral bacteria by inhibiting NADH oxidase, considered to be protective against oxidative stress and also other protective enzymes, which catalyzed the degradation of H₂O₂, including thiolperoxidase (IC₅₀ = 0.1 mM), hypothiocyanite reductase (IC₅₀ = 0.1 mM) and glutathione reductase (IC₅₀ = 0.4 mM). The results have suggested that Zn had a potential use not only in oral care products, but also in different fields of medicine.

Ngày nhận bài: 8-12-2005