

文章编号 1006-8147(2020)05-0462-04

论著

# 可口可乐和汇源橙汁及其所含饮料酸对组织蛋白酶 K 活性的影响

聂海丹<sup>1</sup>, 王瑛慧<sup>1</sup>, 刘娟<sup>2</sup>, 刘颖<sup>1</sup>, 乔峰<sup>3</sup>, 吴丽更<sup>1</sup>

(1.天津医科大学口腔医院牙体牙髓科, 天津 300070; 2.首都医科大学附属北京友谊医院口腔科, 北京 100050; 3.天津医科大学口腔医院口腔颌面外科, 天津 300070)

**摘要** 目的: 体外探索性研究可口可乐和汇源橙汁及其所含饮料酸对组织蛋白酶 K 活性的影响, 探讨饮料酸在组织蛋白酶 K 介导的牙本质及牙周胶原纤维降解中的可能作用。方法: 本研究分为可口可乐组、汇源橙汁组、不同浓度的磷酸组(pH 2.5、pH 3.0、pH 3.5)、不同浓度的柠檬酸组(pH 2.5、pH 3.0、pH 3.5)以及阴性对照组和阳性对照组。应用明胶酶谱法, 检测 10 种处理因素作用下组织蛋白酶 K 降解胶原的能力。结果: 与阴性对照组相比, 可口可乐处理组、汇源橙汁处理组胶原降解量升高( $t=7.49$ 、 $18.98$ , 均  $P<0.05$ )。可口可乐处理组组织蛋白酶 K 的相对酶活性为 45%; 汇源橙汁处理组的相对酶活性为 83%。在不同 pH(2.5~3.5)的磷酸作用下, 组织蛋白酶 K 的相对酶活性为 38%~56%( $t=5.69$ 、 $5.21$ , 均  $P<0.05$ )。在不同 pH(2.5~3.5)的柠檬酸作用下, 组织蛋白酶 K 的相对酶活性为 41%~125%( $t=4.98$ 、 $20.47$ , 均  $P<0.05$ )。结论: 可口可乐和汇源橙汁能使组织蛋白酶 K 的活性增强, 可能通过所含的磷酸或柠檬酸, 促进组织蛋白酶 K 介导的牙本质及牙周胶原纤维降解。

**关键词** 组织蛋白酶 K; 酸性饮料; 磷酸; 柠檬酸

中图分类号 R781

文献标志码 A

## The effects of Coca-Cola, Huiyuan orange juice and the acid contents of the two beverages on the activity of cathepsin K

NIE Hai-dan<sup>1</sup>, WANG Ying-hui<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>2</sup>, LIU Ying<sup>1</sup>, QIAO Feng<sup>3</sup>, WU Li-geng<sup>1</sup>

(1.Department of Endodontics, College of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Stomatology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3.Department of Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of Coca-Cola, Huiyuan orange juice and their beverage acid on the activity of cathepsin K *in vitro*. To explore the possible role of acid beverage in the degradation of dentin collagen and periodontal collagen mediated by cathepsin K. **Methods:** This experiment was divided into Coca-Cola group, Huiyuan orange juice group, phosphate groups of different concentrations (pH 2.5, pH 3.0, pH 3.5), citric acid groups of different concentrations (pH 2.5, pH 3.0, pH 3.5), negative control and positive control. Gelatin Zymography was used to study the ability of cathepsin K to degrade collagen under the action of 10 treatment factors. **Results:** Compared with the control group, the collagen degradation in the Coca Cola group and Huiyuan orange juice group increased( $t=7.49$ ,  $18.98$ , all  $P<0.05$ ). The relative enzyme activity of cathepsin K was 45% in Coca-Cola group and 83% in Huiyuan orange juice group. When phosphoric acid was in different pH (2.5-3.5), the relative enzyme activity of cathepsin K was 38% to 56% ( $t=5.69$ ,  $5.21$ , all  $P<0.05$ ). Under different pH (2.5-3.5) citric acid, the relative enzyme activity of cathepsin K was 41% to 125%( $t=4.98$ ,  $20.47$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion:** Both Coca-Cola and Huiyuan orange juice can increase the activity of cathepsin K, which could accelerate cathepsin K mediated dentine and periodontal collagen degradation through the phosphoric acid or citric acid.

**Key words** cathepsin K; acid beverage; phosphate; citric acid

组织蛋白酶 K(cathepsin K)是木瓜类半胱氨酸蛋白酶家族的一员,因可以在多个位点裂解胶原蛋白的三股螺旋结构,而成为哺乳动物最有效的胶原酶<sup>[1-2]</sup>。近年来,组织蛋白酶 K 在口腔颌面部疾病中的作用受到越来越多的关注。研究发现,组织蛋白酶 K 在牙本质、牙髓、牙本质牙髓复合体、龈沟液中

均有表达,参与生理和病理条件下的基质降解破坏与组织重建改造等重要生物活动<sup>[3]</sup>。研究证实,组织蛋白酶 K 与牙本质龋病<sup>[4]</sup>、酸蚀症、牙周炎<sup>[5]</sup>、种植体周围炎、牙本质粘接老化的发生、发展关系密切<sup>[6]</sup>。

组织蛋白酶 K 在合成之初以没有活性的酶原形式存在,其蛋白质水解活性受到一系列内、外源性环境因素的调节<sup>[7]</sup>。如 Zhang 等<sup>[8]</sup>发现不同黏接过程可对半胱氨酸组织蛋白酶的活性产生影响,酸蚀

作者简介 聂海丹(1993-),女,硕士在读,研究方向:口腔临床医学;  
通信作者:吴丽更, E-mail:lwu06@tmu.edu.cn。

及酸蚀-冲洗黏接法能降低组织蛋白酶K活性,而自酸蚀粘接法则增加其活性。可见组织蛋白酶K是一类在弱酸性环境中不稳定的糖蛋白<sup>[9]</sup>。

食物是影响口腔环境的重要因素。研究表明,酸性饮料可以影响唾液、菌斑、牙齿表面、龈沟液的pH值<sup>[10]</sup>。目前,不同酸性饮料及不同饮料酸对组织蛋白酶K的作用情况,尚未见研究报道。因此,本研究拟比较组织蛋白酶K在可口可乐(含有磷酸)、汇源橙汁(含有柠檬酸)和两种饮料酸的作用下降解胶原的能力,该研究将有助于进一步了解口腔环境中酸的种类和pH值对组织蛋白酶K降解胶原作用的影响,为下一步以组织蛋白酶K为靶点来预防和治疗口腔疾病提供理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 组织蛋白酶K酶原(ALX-201-239-C010, Enzo Life Sciences);可口可乐(可口可乐有限公司,北京,中国)、汇源橙汁(汇源果汁集团,北京,中国);蛋白 marker(Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Illinois state, USA);磷酸、柠檬酸、明胶和亮抑酶肽(生工生物工程公司,上海,中国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 磷酸溶液的制备** 配制10 mol/L的磷酸溶液,取3份,用0.1 mol/L氢氧化钠分别调节至pH 2.5、pH 3.0、pH 3.5,备用。

**1.2.2 柠檬酸溶液的制备** 用无水柠檬酸配制2%的柠檬酸溶液,取3份,用0.1 mol/L氢氧化钠分别调节至pH 2.5、pH 3.0、pH 3.5,备用。

**1.2.3 酶原溶液的制备** 将浓度为150 ng/ $\mu$ L的组织蛋白酶K酶原用稀释液(20 mmol/L Tris, pH 7.5, 5 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L  $\beta$  磷酸甘油, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L 原钒酸钠, 1% Triton $\times$ 100, 0.1% Tween 20)稀释至2  $\mu$ g/L,备用。

**1.2.4 实验步骤** 实验根据处理因素不同分为10组:(1)可口可乐组。(2)汇源橙汁组。(3)磷酸(pH 2.5)组。(4)磷酸(pH 3.0)组。(5)磷酸(pH 3.5)组。(6)柠檬酸(pH 2.5)组。(7)柠檬酸(pH 3.0)组。(8)柠檬酸(pH 3.5)组。(9)阴性对照组:处理因素为组织蛋白酶K酶原稀释液(20 mmol/L Tris, pH 7.5, 5 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L  $\beta$  磷酸甘油, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L 原钒酸钠, 1% Triton $\times$ 100, 0.1% Tween 20)。(10)阳性对照组:处理因素为组织蛋白酶K的激活剂(100 mmol/L 乙酸钠, 10 mmol/L DTT, 5 mmol/L EDTA, pH 值 3.9)。依次取上述10个处理组溶液各15  $\mu$ L,每组取6份,分别加入15  $\mu$ L酶原溶液(2  $\mu$ g/L),混合均匀,于37℃水浴箱中孵育

5~10 min。

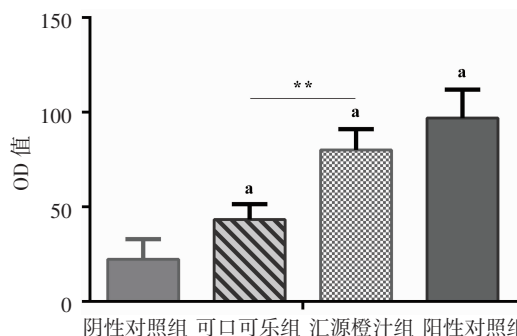
**1.2.5 明胶酶谱法检测CK的活性** 分别取5  $\mu$ L上述孵育后的各组样品,在含有0.2%明胶底物的12.5% SDS-PAGE上于4℃、100 V的条件下电泳,直至溴酚蓝到达凝胶的边缘。将凝胶取出,经震荡洗脱(65 mmol/L Tris, 20%甘油, pH 7.4, 30 min),震荡水洗10 min,漂洗(10 mmol/L 磷酸钠, 0.1 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L DTT, pH 6.0, 30 min),孵育(37℃, 23 h),洗涤(10 min),0.2%考马斯亮蓝染色1 h,然后用脱色液脱色至清晰条带出现。

**1.3 统计学处理** 应用ChemiDoc XRS+ 成像器(伯乐,加利福尼亚州,美国)采集明胶酶谱法所得电泳条带图,用“Quantity One”泳道/条带轨迹定量法(Trace Tracking)对所得条带进行光密度分析,以每个实验组6个样本所测得的光密度的平均值代表各实验组胶原降解量的多少,结果以均数 $\pm$ 标准差表示。

应用SPSS 13.0统计软件,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)将两个饮料组胶原降解量与阴性对照组和阳性对照组进行比较分析。通过单变量多因素方差分析(UNIANOVA)对不同pH的磷酸组和不同pH的柠檬酸组的胶原降解量进行比较分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 可口可乐和汇源橙汁对组织蛋白酶K活性的影响** 与阴性对照组相比,可口可乐处理组胶原降解量升高,差异有统计学意义( $t=7.49, P<0.05$ )。以阳性对照组胶原降解量作为酶活性的参考(100%),可口可乐处理组组织蛋白酶K的相对酶活性为45%;与阴性对照组相比,汇源橙汁处理组的胶原降解量升高,差异有统计学意义( $t=18.98, P<0.05$ )。汇源橙汁处理组的相对酶活性为83%。可口可乐处理组胶原降解量与汇源橙汁处理组相比差异有统计学意义( $t=10.37, P<0.05$ )(图1)。

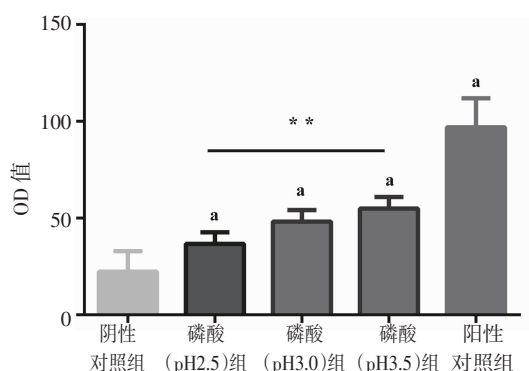


注:阴性对照组为酶原稀释液组;阳性对照组为蛋白酶激活剂组;与阴性对照组相比,\* $P<0.05$ ;两两比较,\*\* $P<0.05$

图1 可口可乐和汇源橙汁(pH 2.5)对组织蛋白酶K活性的影响

Fig 1 Effect of Coca-Cola and Huiyuan orange juice on the activity of cathepsin K

2.2 磷酸对组织蛋白酶 K 活性的影响 不同 pH (2.5~3.5) 的磷酸对组织蛋白酶 K 总体呈激活作用, 在磷酸作用下, 组织蛋白酶 K 的相对酶活性为 38%~56%。且随着磷酸溶液 pH 的升高, 组织蛋白酶 K 的酶活性逐渐加强 ( $t=5.69, 5.21$ , 均  $P<0.05$ , 图 2)。

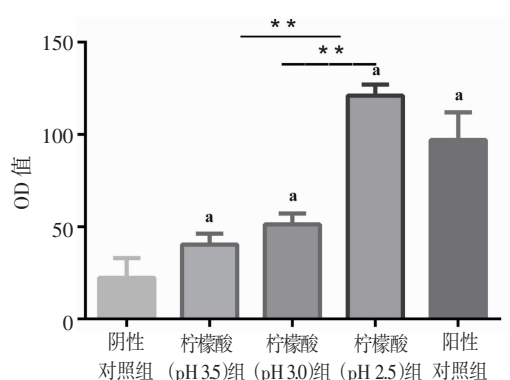


注: 阴性对照组为酶原稀释液组; 阳性对照组为蛋白酶激活剂组; 与阴性对照组相比,  $*P<0.05$ ; 两两比较,  $**P<0.05$

图 2 不同 pH 磷酸对组织蛋白酶 K 活性的影响

Fig 2 Effect of different pH phosphoric acid on the activity of cathepsin K

2.3 柠檬酸对组织蛋白酶 K 活性的影响 不同 pH (2.5~3.5) 的柠檬酸对组织蛋白酶 K 总体呈激活作用, 在柠檬酸作用下, 组织蛋白酶 K 的相对酶活性在 41%~125%。且随着柠檬酸溶液 pH 值的升高, 组织蛋白酶 K 的酶活性逐渐减弱 ( $t=4.98, 20.47$ , 均  $P<0.05$ , 图 3)。



注: 阴性对照组为酶原稀释液组; 阳性对照组为蛋白酶激活剂组; 与阴性对照组相比,  $*P<0.05$ ; 两两比较,  $**P<0.05$

图 3 不同 pH 柠檬酸对组织蛋白酶 K 活性的影响

Fig 3 Effect of different pH citric acid on the activity of cathepsin K

### 3 讨论

可口可乐和汇源橙汁是目前饮料市场份额占比较高的饮料, 这两种饮料由于对牙齿硬组织的化学酸蚀和破坏潜力非常强而被定义为具有极度酸蚀能力的饮料<sup>[11-12]</sup>。在口腔中除牙体硬组织外, 组织蛋白酶的活性也易受到酸性环境的影响<sup>[13]</sup>。本实验应用明胶酶谱法对可口可乐和汇源橙汁及其所含

饮料酸对组织蛋白酶 K 活性的影响进行了观察。

研究结果显示, 组织蛋白酶 K 在有可口可乐或汇源橙汁存在的条件下酶活性增加, 降解胶原的量显著增加。说明可口可乐或汇源橙汁能够激活无活性的组织蛋白酶 K 酶原, 产生具有活性的组织蛋白酶 K。组织蛋白酶 K 作为一种蛋白水解酶, 其主要底物是 I 型胶原<sup>[14]</sup>。I 型胶原纤维是牙本质有机基质和骨基质的主要成分。组织蛋白酶 K 通过降解 I 型胶原纤维, 在骨基质和牙本质基质破坏和改建中发挥重要作用。已有的研究证实, 龈沟液中组织蛋白酶 K 活性的升高与牙槽骨吸收显著相关<sup>[15]</sup>; 并且组织蛋白酶 K 活性的升高与种植体周围炎的骨吸收也密切相关<sup>[16]</sup>。提示摄入可口可乐或汇源橙汁会造成口腔环境中组织蛋白酶 K 活性的显著升高, 可能加速牙周炎和种植体周围炎时牙周组织及骨组织的破坏。

本研究结果显示, 汇源橙汁对组织蛋白酶 K 的激活能力显著高于可口可乐, 是可口可乐的 1.8 倍。以 pH 值表示的  $H^+$  浓度和饮料酸的缓冲性是决定酸性饮料酸蚀性的主要因素。本实验中可口可乐是含有磷酸的饮料, pH 值为 2.5; 汇源橙汁是含有柠檬酸的饮料, pH 值为 3.5。磷酸和柠檬酸均属于三元酸, 但是柠檬酸为有机酸, 缓冲作用很强, 有研究显示使橙汁饮料 pH 值达到 5.5~7.0 所需碱的量是使可口可乐 pH 值达到 5.5~7.0 所需碱量的 2 倍<sup>[10]</sup>。由于缓冲作用强, 汇源橙汁可以使自身 pH 值在较长时间内维持在较低的水平, 这可能是汇源橙汁对组织蛋白酶 K 的激活作用显著高于可口可乐的原因。

Avanija 等<sup>[17]</sup>对 380 种饮料的 pH 值进行检测发现, 93% 饮料的 pH 值在 4.0 以下, 磷酸和柠檬酸是大多数酸性饮料中加入的酸性成分, 在酸性饮料的酸蚀特性中扮有重要角色。因此本研究评价了 pH 值 (2.5~3.5) 柠檬酸溶液和磷酸溶液对组织蛋白酶 K 活性的影响。

(1) 柠檬酸溶液对组织蛋白酶 K 活性的影响: 实验结果显示, pH 值分别为 2.5、3.0、3.5 的 3 种柠檬酸溶液对组织蛋白酶 K 均有激活作用, 组织蛋白酶 K 的活性随柠檬酸溶液 pH 值的升高呈下降趋势, 组织蛋白酶 K 在柠檬酸溶液 pH=2.5 时显示了最高的酶活性, 相对酶活性达到 125%。由此推测, 摄入 pH 值 (2.5~3.0) 较低的柠檬酸饮料或食物, 如柠檬汁等, 会使暴露于口腔不同组织中组织蛋白酶 K 活性极度增加, 对暴露的胶原纤维有强大的破坏作用。这种破坏作用随柠檬酸在口腔中清除和唾液的缓冲逐渐减弱。

(2) 磷酸溶液对组织蛋白酶 K 活性的影响: 本



实验结果显示,pH 值分别为 2.5、3.0、3.5 的 3 种磷酸溶液对组织蛋白酶 K 均有激活作用,组织蛋白酶 K 的活性随磷酸溶液 pH 值的升高酶活性逐渐加强。在 pH3.0 和 pH3.5 时,磷酸和柠檬酸对组织蛋白酶 K 的作用相当。研究发现,组织蛋白酶 K 在环境 pH 值为 4.0~5.5 时,随着环境 pH 值的上升,酶的活性逐渐增强,其发挥活性的最佳 pH 值为 5.5<sup>[17-18]</sup>。因此,推测在摄入含有磷酸的饮料后,口腔环境 pH 值迅速降低,会使暴露于口腔不同组织中组织蛋白酶 K 活性增加,并发挥降解胶原基质的作用。伴随唾液的缓冲作用,口腔环境中 pH 值逐渐升高,组织蛋白酶 K 活性会更强,直到口腔环境 pH 恢复至 5.5 以上时,组织蛋白酶对胶原的破坏作用才逐渐减弱。

综上所述,可口可乐和汇源橙汁及其所含的饮料酸均能使组织蛋白酶 K 活性增强,pH<3.0 的柠檬酸对组织蛋白酶 K 活性的增强作用尤为显著。因此,摄入酸蚀性强的饮料尤其是含有柠檬酸的饮料,可能促进组织蛋白酶 K 介导的牙本质及牙周组织胶原纤维降解,加速龋病、牙周炎、种植体周围炎的进展。

#### 参考文献:

- [1] Zhao Q, Jia Y, Xiao Y. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,380(4):721
- [2] Li Z, Hou W S, Escalante-Torres C R, et al. Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 28669
- [3] Tersariol I L, Geraldini S, Minciotti C L, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex[J]. *J Endod*, 2010, 36(3): 475
- [4] Nascimento F D, Minciotti C L, Geraldini S, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin[J]. *J Dent Res*, 2011,90(4): 506
- [5] Garg G, Pradeep A R, Thorat M K. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of Cathepsin K in periodontitis[J]. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(11):1046
- [6] Tjaderhane L, Nascimento F D, Breschi L, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins[J]. *Dent Mater*, 2013, 29(1):116
- [7] Dubin G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(6): 653
- [8] Zhang W, Yang W, Wu S, et al. Effects of acid etching and adhesive treatments on host-derived cysteine cathepsin activity in dentin[J]. *J Adhes Dent*, 2014,16(5):415
- [9] Turk B, Bieth J G, Bjork I, et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins[J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995, 376(4):225
- [10] Millward A, Shaw L, Harrington E, et al. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages[J]. *Caries Res*, 1997,31(1): 44
- [11] Reddy A, Norris D F, Momeni S S, et al. The pH of beverages in the United States[J]. *J Am Dent Assoc*,2016,147(4): 255
- [12] 袁牧,张清,高学军. 可口可乐对牙釉质早期脱矿后表面显微硬度的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2016, 51(6): 357
- [13] Venediktova A A, Falameeva O V, Kolosova N G, et al. Cathepsin K and matrix metalloproteinases activity in the bone tissue of OXYS rats with developing osteoporosis [J]. *Biomed Khim*, 2010, 56(2): 274
- [14] Kafienah W, Bromme D, Buttler D J, et al. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix[J]. *Biochem J*, 1998,331 ( Pt 3): 727
- [15] Mogi M, Otagoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis[J]. *Arch Oral Biol*, 2007, 52(9): 894
- [16] Strbac G D, Monov G, Cei S, et al. Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study[J]. *J Clin Periodontol*, 2006, 33(4):302
- [17] Bromme D, Okamoto K, Wang B B, et al. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(4):2126
- [18] Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix[J]. *J Dent Res*, 2013,92(1): 87
- [14] He W, Zhong G, Wang P, et al. Downregulation of long noncoding RNA FENDRR predicts poor prognosis in renal cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2019,17(1):103
- [15] Zhang G, Han G, Zhang X, et al. Long non-coding RNA FENDRR reduces prostate cancer malignancy by competitively binding miR-18a-5p with RUNX1[J]. *Biomarkers*, 2018,23(5): 435
- [16] Jacobs B L, Lee C T, Montie J E. Bladder cancer in 2010: how far have we come[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010,60(4): 244
- [17] Roupret M, Huperran V, Yates D R, et al. A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis[J]. *BJU Int*, 2008,101(11):1448
- [18] Ye F, Wang L, Castillo-Martin M, et al. Biomarkers for bladder cancer management: present and future[J]. *Am J Clin Exp Urol*, 2014,2(1):1
- [19] Martínez-Fernández M, Feber A, Dueñas M, et al. Analysis of the polycomb-related lncRNAs HOTAIR and ANRIL in bladder cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7: 109
- [20] Zhang S, Zhong G, He W, et al. LncRNA Up-Regulated in nonmuscle invasive bladder cancer facilitates tumor growth and acts as a negative prognostic factor of recurrence[J]. *J Urol*, 2016,196(4): 1270
- [21] Li C, Cui Y, Liu L F, et al. High expression of long noncoding RNA MALAT1 indicates a poor prognosis and promotes clinical progression and metastasis in bladder cancer[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2017,15(5): 570

(2020-03-27 收稿)

(2019-12-04 收稿)

(上接第 449 页)

carcinoma cells[J]. *Cell Cycle*, 2019,18(8): 889