

[文章编号] 1000-1182(2014)03-0297-06

## 6~8岁儿童龋病相关唾液蛋白组的电喷雾 离子阱—串联质谱分析

鄢国伟<sup>1,2</sup> 黄文明<sup>1,2</sup> 薛红蕾<sup>1,2</sup> 贾玉焕<sup>1,2</sup> 杨德琴<sup>1,2</sup>

1.重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科; 2.口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 400017

**[摘要]** **目的** 采用电喷雾离子阱—串联质谱分析法(ESI-MS/MS)比较高龋组和无龋组儿童唾液蛋白组,初步探索唾液蛋白组与龋病的关系,并探索龋敏感性相关的生物标志物。**方法** 以高龋组、无龋组儿童各10名为研究对象,收集唾液样本,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),经过滤-辅助的蛋白酶解(FASP)及液相色谱分析后,进行ESI-MS/MS鉴定,并对高龋唾液组和无龋唾液组间的蛋白差异进行分析。**结果** 高龋组蛋白量显著高于无龋组,高龋组、无龋组鉴定的多肽数分别为602、481个,分别属于286、227个蛋白。两组之间差异表达多肽数为361个,差异表达蛋白数为118个,包含基质金属蛋白酶9、黏蛋白7、乳铁蛋白、碳酸酐酶6、天青杀素、冷凝集素等。**结论** 高龋组儿童唾液蛋白量高于无龋组,基质金属蛋白酶9、黏蛋白7、乳铁蛋白、碳酸酐酶6、天青杀素、冷凝集素等高龋组与无龋组之间差异表达蛋白的检测,为进一步探索龋敏感性相关生物蛋白标志物奠定了基础。

**[关键词]** 龋病; 唾液蛋白组; 电喷雾离子阱—串联质谱; 生物标志物

**[中图分类号]** R 781.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2014.03.020

**Relationship between dental caries and salivary proteome by electrospray ion-trap tandem mass spectrometry in children aged 6 to 8 years** Yan Guowei<sup>1,2</sup>, Huang Wenming<sup>1,2</sup>, Xue Honglei<sup>1,2</sup>, Jia Yuhuan<sup>1,2</sup>, Yang Deqin<sup>1,2</sup>. (1. Dept. of Endodontics, The Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400017, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Science, Chongqing 400017, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship between salivary proteome and dental caries and to promote the biomarker studies of dental caries susceptibility by comparing the salivary proteome of caries-active children and caries-free children with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). **Methods** Ten caries-active children and ten caries-free children were sampled. The salivary proteome of the two groups was studied, and the differential protein between the two groups was analyzed by ESI-MS/MS after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, filter-aided sample preparation, and liquid chromatography. **Results** The concentration of salivary protein was higher in the caries-active group than in the caries-free group. The polypeptide counts of the caries-active and caries-free groups were 602 and 481, which belonged to 286 and 227 proteins, respectively. The differential polypeptide count of the two groups was 361, and the differential protein count was 118. The detected proteins included matrix metalloproteinase-9 (MMP9), mucin-7 (MUC7), lactotransferrin (LTF), carbonic anhydrase 6 (CA6), azurocidin (AZU), and cold agglutinin. **Conclusion** The total salivary protein was higher in the caries-active group than in the caries-free group. The preliminary detection of differential proteins (MMP9, MUC7, LTF, CA6, AZU, and cold agglutinin) may lay some foundation for biomarker research of dental caries susceptibility.

**[收稿日期]** 2013-11-15; **[修回日期]** 2014-02-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81170950); 重庆市卫生局医学科研计划重点基金资助项目(2011-1-062); 重庆市医学重点学科《牙体牙髓病学》建设基金资助项目(2011); 重庆市渝北区科技基金资助项目[(2011)33号]

**[作者简介]** 鄢国伟, 硕士, E-mail: yanw1109@126.com

**[通讯作者]** 杨德琴, 教授, 博士, E-mail: yangdeqin@gmail.com

**[Key words]** dental caries; salivary proteome; electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry; biomarkers

唾液是口腔生态区的重要组成部分, 主要作用包括对食物的预消化, 润滑口内组织, 以及保护口

腔健康等<sup>[1]</sup>。唾液蛋白的复杂性决定了唾液功能的多样性,唾液富组蛋白能抑制钙磷酸盐的溶解,对保持牙面完整具有重要意义;唾液免疫球蛋白、溶菌酶、乳铁蛋白等具有明显的抗菌活性,是唾液屏障的重要组成部分<sup>[2-3]</sup>;同时唾液蛋白能影响细菌在牙表面的定植、黏附,可以促进牙面微生态结构牙菌斑的形成。龋病以无机物脱矿及有机物分解为基本病理改变,牙菌斑是细菌致龋的主要形式。唾液蛋白特性包括抑制钙磷酸盐溶解、抗菌活性、调节细菌黏附等,其均与龋病密切相关<sup>[4]</sup>。唾液可以反映机体系统和口腔局部环境之间的复杂平衡,常用于辅助诊断口腔疾病和系统性疾病<sup>[5]</sup>,如用于探索牙周病、舍格伦综合征、颌面部肿瘤等的唾液生物标志物<sup>[6]</sup>。

电喷雾离子阱—串联质谱 (electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS) 是近年来发展成熟的高通量蛋白组分析工具,具有样本需求小、分析速度快、精度高的特点<sup>[7-8]</sup>。本研究旨在使用ESI-MS/MS分析不同龋敏感性儿童的唾液蛋白组,探索唾液蛋白组与龋病之间的关系,从而推动龋敏感性相关生物标志物的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验对象及分组

根据WHO编著的《口腔健康调查基本方法》第4版龋病诊断标准,对重庆市一小学6~8岁第一恒磨牙均已萌出的儿童进行筛查,确定20名受试者,并与监护人签署知情同意书。将受试者分为高龋组(10名,其中男、女各5名)和无龋组(10名,其中男、女各5名),高龋组纳入标准为龋失补牙数(decayed-missing-filled tooth index, dmft)大于等于8;无龋组纳入标准为dmft=0<sup>[9-10]</sup>。所有受试者均为汉族儿童,重庆市户口,无长期(>3个月)异地居住史;检查前1个月未服用抗生素,除龋齿外无其他口腔疾病、先天性疾病和系统性疾病。本研究获得了重庆医科大学附属口腔医院伦理委员会的批准。

### 1.2 样本收集以及聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

受试者取样前一晚及当天早晨均未刷牙,早晨未进食,在上午8—9点钟进行样本收集,嘱受试者把自然的、未受刺激的唾液缓慢吐入50 mL无菌塑料杯内,持续5 min,无菌EP管收集5 mL唾液样本,冰浴下转-20 °C冰箱,干冰冷冻运回实验室进行样本制备<sup>[11-12]</sup>。将高龋组所有样本混合,命名为SH;将

无龋组所有样本混合,命名为SN。超滤浓缩SH和SN, Bradford法定量后进行SDS-PAGE。

### 1.3 过滤-辅助的蛋白酶解(filter-aided sample preparation, FASP)及液相色谱分析

FASP酶解浓缩样本后,进行毛细管高效液相色谱分析,不同酶解产物在随液相流过色谱柱时因所受阻力不同而达到分离目的,其中液相A液为0.1%甲酸水溶液, B液为0.1%甲酸乙腈水溶液。色谱柱0.15 mm×150 mm,以95%的A液平衡。相关液相梯度如下:0~50 min, B液线性梯度从4%到50%;50~54 min, B液线性梯度从50%到100%;54~60 min, B液维持在100%。

### 1.4 ESI-MS/MS鉴定及数据分析

酶解产物经液相色谱分离后在高压电场作用下离子化,然后经离子阱分析器使不同离子分离,扫描检测正离子,每次全扫描后采集10个碎片图峰进行二级质谱,以上自动化操作采用Q-Exactive质谱仪完成。质谱原始文件使用软件Mascot 2.2和Proteome Discoverer 1.3进行查库鉴定,并对SH组和SN组间的蛋白差异进行分析。

## 2 结果

### 2.1 样本定量及SDS-PAGE

样本经过混合浓缩以后,SH组全蛋白质量浓度为23.8 g·L<sup>-1</sup>, SN组全蛋白质量浓度为14.8 g·L<sup>-1</sup>,从蛋白量上看,SH组显著高于SN组。进一步的SDS-PAGE显示(图1),SH组、SN组的带型相似度极高,与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液相比,SH组、SN组除了位于43×10<sup>3</sup>~66.2×10<sup>3</sup>的主要条带外,还散在分布有许多不同的条带,充分体现了唾液蛋白的复杂性。

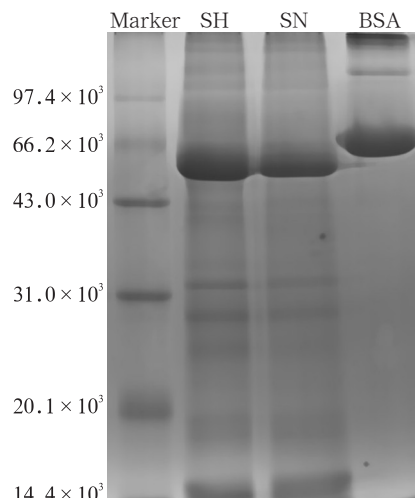


图1 SDS-PAGE结果

Fig 1 Results of SDS-PAGE

## 2.2 ESI-MS/MS鉴定

2组的ESI-MS/MS结果见图2、3和表1。SN组、SH组的蛋白峰型高度相似(图2、3),2组丰度最高的前8个蛋白峰所对应的质荷比一致(表1),SN中丰度最高的前10个蛋白峰均能在SH中找到质荷比

相同的蛋白峰,表明SH、SN两组蛋白样本在总体上具有相似性,与SDS-PAGE结果一致。但从蛋白峰总数上看,SH组明显高于SN组,主要集中于低丰度蛋白峰(图2、3)。

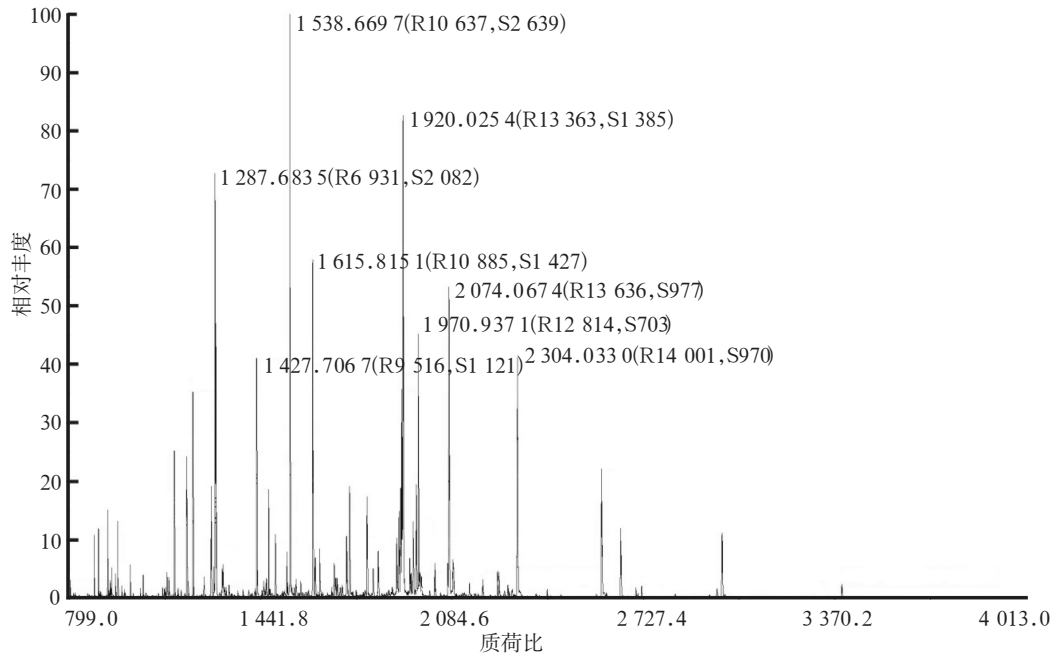


图2 SH组样本的ESI-MS/MS频谱

Fig 2 The spectrum report from ESI-MS/MS of SH group

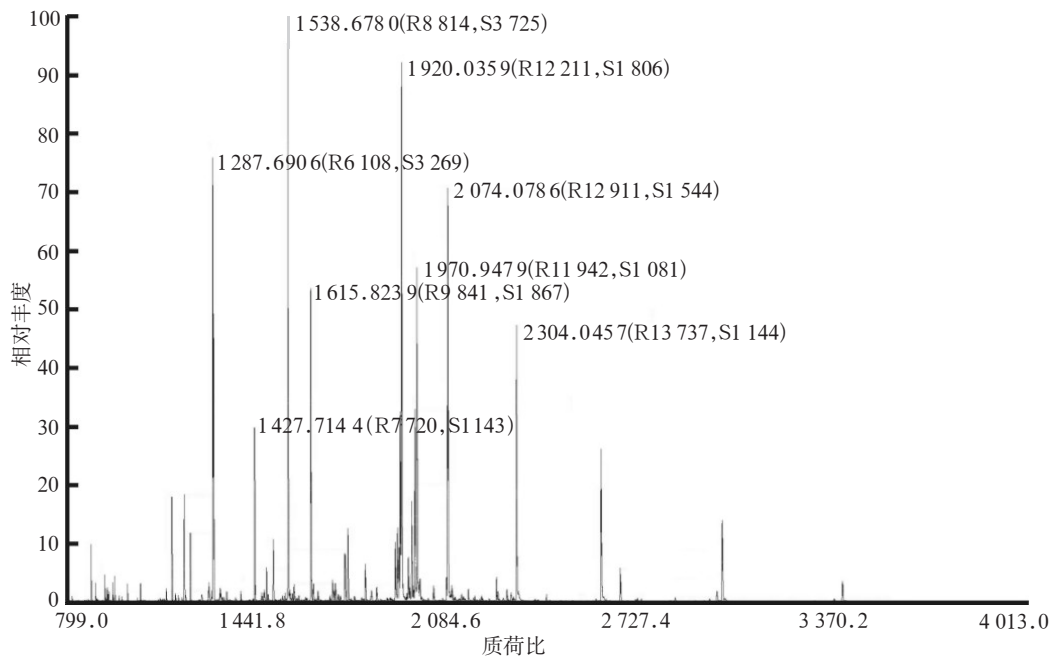


图3 SN组样本的ESI-MS/MS频谱

Fig 3 The spectrum report from ESI-MS/MS of SN group

表1 SH、SN组丰度最高的8个蛋白峰对应的质荷比

Tab 1 The mass-to-charge ratio corresponding to the 8 highest protein peak of SH group and SN group

组别	1	2	3	4	5	6	7	8
SH	1287.68	1427.71	1538.67	1615.82	1920.03	1970.94	2074.07	2304.03
SN	1287.69	1427.71	1538.68	1615.82	1920.04	1970.95	2074.08	2304.05

2.3 数据分析

经查库统计, SH组检测到的多肽数为602个, 分属286个蛋白; SN组检测到的多肽数为481个, 分属227个蛋白。在多肽数层面上比较, SH、SN组共有多肽数为361个, 差异表达多肽数也为361个, 分属187个蛋白, 其中SH组专属多肽数为241个, 分属126个蛋白; SN组专属多肽数为120个, 分属61个蛋白。直接从蛋白数层面上比较, SH、SN组差异表达蛋白数为118个, 其中SH组专属的有88个, SN组专属的有30个, 均低于差异表达多肽所对应的蛋白数。

检出的唾液高丰度蛋白包括α-淀粉酶、富组蛋白、唾液朊蛋白、部分免疫球蛋白等, 在SH组与

SN组均有检出。只在SH组检出的蛋白(或多肽)包括基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)、黏蛋白7(mucin-7, MUC7)、乳铁蛋白(lactotransferrin, LTF)、免疫球蛋白多肽Ig kappa chain、Ig lambda chain等(表2)。只在SN组检出的蛋白(或多肽)包括碳酸酐酶6(carbonic anhydrase 6, CA6)、天青杀素(azurocidin, AZU)、冷凝集素(cold agglutinin)、内收蛋白(adducin 2, ADD2)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH3A1)、半胱天冬酶14(caspase-14, CASP14)等(表3)。表2、表3列出了SH、SN两组具有完善信息的特有蛋白。

表 2 SH特有蛋白

Tab 2 The special protein of SH

蛋白全称	蛋白缩写	蛋白全称	蛋白缩写
angiotensinogen	AGT	lymphotoxin alpha	LTA
protein AMBP	AMBP	lactotransferrin	LTF
apolipoprotein B-100	APOB	lymphocyte antigen 6D	LY6D
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI A	lactotransferrin	LTF
actin-related protein 2/3 complex	ARPC	melanotransferrin	MF12
biotinidase	BTD	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3
ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	tetratricopeptide repeat protein 7A	TTC7A
kininogen-1	KNG1	nuclear pore complex protein Nup153	NUP153
complement factor B	-	mucin-7	MUC7
carboxypeptidase A1	CPA1	mucin-5AC	MUC5AC
cathepsin B	CTSB	cytosolic 5'-nucleotidase 1B	NT5C1B
inter-alpha (Globulin) inhibitor H2	ITIH2	macrophage migration inhibitory factor	MIF
neutrophil elastase	ELANE	protein Tro alpha1 H <sub>1</sub> myeloma	-
ezrin	EZR	prostatin	PRSS8
vinculin	VCL	putative DNA-binding protein inhibitor ID-2B	-
filamin A	FLNA	histone H3.3	H3F3A
fibronectin	FN1	RECQL4 ATP-dependent DNA helicase Q4	RECQL4
fructose-bisphosphate aldolase	-	rheumatoid factor RF-ET9	RF-ET9
ganglioside GM2 activator	GM2A	S100A4 Protein S100-A4	S100A4
hemoglobin subunit gamma-1	HBG1	S100A7 Protein S100-A7	S100A7
hemoglobin subunit gamma-2	HBG2	alpha-1-antitrypsin	SERPINA1
histone H3.1	HIST1H3H	protein (SNC73)	SNC73
apoptosis-associated speck-like protein	PYCARD	lamin-B1	LMNB1
kallikrein-11	KLK11	transcription elongation regulator 1	TCERG1
UGa8L	-	trefoil factor 3	TFF3
Ig kappa chain V - III	-	talin-1	TLN1
Ig lambda chain	IGLV2-11	matrix metalloproteinase-9	MMP9
complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	C1QTNF3	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1	TAL1
capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta	CAPZB	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	EIF4G3
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A
high-mobility group nucleosome binding domain 1	HMGN1	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	ITIH1
myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS		

注: SH特有蛋白共88种, 剔除模糊蛋白, 剩余63种。

表 3 SN特有蛋白

Tab 3 The special protein of SN

蛋白全称	蛋白缩写	蛋白全称	蛋白缩写
adducin 2 (beta)	ADD2	golgi membrane protein 1	GOLM1
aldehyde dehydrogenase	ALDH3A1	anti-folate binding protein	-
conserved hypothetical protein	LOC285084	leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1
azurocidin	AZU	malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1
apolipoprotein H (Beta-2-glycoprotein 1)	APOH	niemann-pick disease, type C2	NPC2
carbonic anhydrase 6	CA6	nucleobindin-1	NUCB1
peptidoglycan recognition protein 1	PGLYRP1	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD
collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	caspase-14	CASP14
collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	peroxiredoxin-4	PRDX4
collagen alpha-1(X X V III) chain	COL28A1	uteroglobin	SCGB1A1
collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	alpha-1-antitrypsin	SERPINA1
cold agglutinin FS-1 H-chain	-	cornifin-A	SPRR1A
FGA protein	FGA		

注：SN特有蛋白共30种，剔除模糊蛋白，剩余25种。

### 3 讨论

6~8岁儿童的口腔卫生意识尚未成熟，口腔卫生习惯尚未完全建立，是龋病发生的高危群体，常作为龋病进展研究的目标人群。唾液蛋白组与龋病进展密切相关<sup>[4,13-14]</sup>，本研究采用ESI-MS/MS描述了不同龋敏感性6~8岁儿童的唾液蛋白组，获得了高龋组和无龋组的差异蛋白组信息。

本研究中蛋白浓缩定量及ESI-MS/MS频谱显示，高龋组儿童唾液蛋白总量及种类均高于无龋组，提示蛋白量可能与龋病有一定关系。其可能的机制，一方面是某些唾液蛋白可作为致龋菌的营养底物，促进其生长繁殖，增加致龋作用；另一方面部分唾液蛋白参与构成釉质表面获得性膜，促进了致龋菌对牙表面的黏附，进而增加患龋率<sup>[15-16]</sup>。同时研究表明，高龋组与无龋组的差异蛋白峰主要集中于低丰度区域，提示龋病相关的唾液蛋白可能是唾液中的低丰度蛋白，这与已有的研究结果<sup>[17]</sup>一致。在多肽数层面上比较，高龋专属数为241个，属于126个蛋白；无龋组专属数为120个，属于61个蛋白。直接从蛋白数层面上比较，高龋组专属的有88个，无龋组专属的有30个，均低于差异表达多肽对应的蛋白数，这提示存在着同一类蛋白中的不同多肽分别存在于高龋组、无龋组的情况，这一结果揭示了同一类蛋白中不同的多肽可能具有防龋和促进龋病发生发展的不同功能。例如，免疫球蛋白多肽Ig kappa chain、Ig lambda chain只在高龋组检出，表明Ig kappa chain、Ig lambda chain可能与龋病发生

发展相关。对高龋组与无龋组均高检出的免疫球蛋白组分，传统研究表明其能通过抗菌作用达到一定的防龋效果，如IgY能抑制变异链球菌生长，并能与部分变异链球菌血清型发生交叉凝集反应，有一定的防龋效能<sup>[18]</sup>；分泌型免疫球蛋白也能通过凝集、溶解变异链球菌，减少其对牙表面的定植、黏附，从而降低致龋菌斑的形成，达到防龋目的。

本研究结果初步表明，MMP9、MUC7、LTF、CA6、AZU、冷凝集素等高龋组与无龋组之间的差异表达蛋白，与龋病进展或防龋有不同程度的相关性，其可能包含了龋易感性监测的候选蛋白标志物。基质金属蛋白酶系统是存在于细胞外基质中最主要的酶系统，可降解牙本质有机质，故高龋组特有蛋白MMP9可能在龋病的发生发展过程中发挥着重要的作用<sup>[19]</sup>。MUC7是牙齿表面获得性膜的主要成分，在酸性富脯蛋白的协作下，能调节细菌对牙面的黏附，可能在龋病的发生发展中起重要作用<sup>[2]</sup>。LTF是唾液中天然的抗菌成分，但研究<sup>[3]</sup>表明龋活跃儿童唾液LTF含量百分比高于无龋儿童，且dmft值越高，LTF含量百分比越高，这与本研究结果一致。对无龋组特有蛋白，Kivelä等<sup>[20]</sup>发现CA6低下与患龋率升高有关，特别与口腔卫生差的受试者dmft值成负相关，且无龋儿童唾液中的CA6活性高于龋活跃儿童，与本研究结果一致，这提示唾液CA6可能对保护牙齿、抵抗龋病有重要作用。AZU被发现与牙龈炎、牙周炎引起的早期炎症性牙周破坏相关，是潜在的牙周炎生物标志物，但其可能的防龋作用尚需进一步探索。冷凝集素是非免疫性唾液凝集素的一种，能选择性地凝集口腔细菌，从而有利于细菌从

口腔中清除。唾液凝集素可以特异性地结合变异链球菌的表面抗原rPAc, 介导变异链球菌聚集, 从而降低致龋菌斑的形成, 减少龋病的发生<sup>[21]</sup>。此外, 尚有其他只在SH组或SN组检出的特有蛋白, 其可能的致龋或防龋潜能尚需进一步研究证实。

本研究作为简化的探索性实验, 尚未有效克服高丰度背景蛋白的干扰, 对细菌蛋白等低丰度蛋白尚不能进行有效的鉴别, 但细菌蛋白是唾液蛋白当中一个不容小觑的群体。本研究中受试者均来源于同一地区, 人口流动性较小, 生活习惯及饮食习惯基本相同, 因此本研究合理地简化了两组唾液蛋白中食物成分的比较。但不容忽视的是, 在唾液中存在丰富的源于食物的蛋白, 如大米蛋白、蔬菜蛋白等<sup>[17]</sup>。唾液中的食物蛋白不仅可作为细菌代谢底物, 还能改变唾液流速、唾液缓冲能力等唾液理化性质。同时, 饮食因素是龋病病因四联因素之一, 深入研究唾液蛋白与龋病的关系尚需完善对食物蛋白的探索。

本研究结果初步表明, 高龋组儿童唾液蛋白总量及种类均高于无龋组, MMP9、MUC7、LTF、CA6、AZU、冷凝集素等高龋组与无龋组之间初步检测出的差异表达蛋白, 为进一步探索龋敏感性相关生物标记物提供了一定的实验依据。

### [参考文献]

- [1] Proctor GB, Pramanik R, Carpenter GH, et al. Salivary proteins interact with dietary constituents to modulate tooth staining[J]. *J Dent Res*, 2005, 84(1):73-78.
- [2] Denny P, Hagen FK, Hardt M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(5):1994-2006.
- [3] 郝高峰, 林焕彩. 唾液乳铁蛋白和溶菌酶含量与乳牙患龋的关系[J]. *中华口腔医学杂志*, 2009, 44(2):82-84.
- [4] Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JR, et al. The role of salivary peptides in dental caries[J]. *Biomed Chromatogr*, 2005, 19(3):214-222.
- [5] Caporossi L, Santoro A, Papaleo B. Saliva as an analytical matrix: state of the art and application for biomonitoring[J]. *Biomarkers*, 2010, 15(6):475-487.
- [6] Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, et al. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review[J]. *OMICS*, 2011, 15(6):353-361.
- [7] Roucher VF, Desnots E, Naël C, et al. Use of UPLC-ESI-MS/MS to quantitate free amino acid concentrations in micro-samples of mammalian milk[J]. *Springerplus*, 2013, 2:622.
- [8] Tsutsui H, Mochizuki T, Maeda T, et al. Simultaneous determination of DL-lactic acid and DL-3-hydroxybutyric acid enantiomers in saliva of diabetes mellitus patients by high-throughput LC-ESI-MS/MS[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(6/7):1925-1934.
- [9] 马瑞, 姜云涛, 姜葳, 等. 不同龋敏感者变异链球菌临床分离株的致龋特性[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2007, 27(2):141-143.
- [10] Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3):1001-1009.
- [11] Navazesh M. Methods for collecting saliva[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 694:72-77.
- [12] Aizenbud D, Peri-Front Y, Nagler RM. Salivary analysis and antioxidants in cleft lip and palate children[J]. *Arch Oral Biol*, 2008, 53(6):517-522.
- [13] Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries[J]. *Adv Dent Res*, 2000, 14:40-47.
- [14] Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology[J]. *Caries Res*, 2004, 38(3):247-253.
- [15] Kościelniak D, Jurczak A, Zygmunt A, et al. Salivary proteins in health and disease[J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(4):451-457.
- [16] Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins[J]. *J Dent Res*, 1997, 76(3):734-743.
- [17] Jagtap P, McGowan T, Bandhakavi S, et al. Deep metaproteomic analysis of human salivary supernatant[J]. *Proteomics*, 2012, 12(7):992-1001.
- [18] 袁铿, 汪泱, 詹天佐. 抗致龋病IgY的制备及防龋功能的观察[J]. *江西医学院学报*, 2002, 42(6):153-155.
- [19] Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease[J]. *J Dent Res*, 2006, 85(12):1074-1084.
- [20] Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, et al. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence[J]. *Caries Res*, 1999, 33(3):178-184.
- [21] 朱炳, 黄定明, 周学东. 非免疫性唾液凝集素的研究进展[J]. *国外医学口腔医学分册*, 2003, 30(3):206-208.

(本文编辑 李彩)