

# HtrA 对乳牙高致龋性变异链球菌生物膜形成的影响

徐仕珍<sup>1</sup> 杨维虹<sup>2</sup> 毛玲<sup>1</sup> 刘兴容<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究乳牙高致龋性变异链球菌(*S. mutans*) 高温需要蛋白 A(HtrA) 基因缺陷株和 HtrA 高毒力株在体外非应激环境中生物膜形成的差异。方法 用分光光度计比浊法测定前期获得的乳牙高致龋性 *S. mutans* HtrA 高毒力株、基因缺陷株和 *S. mutans* 国际标准株 UA159 的生长情况; 体外构建三菌株生物膜模型, 扫描电镜下观察生物膜形态结构; 结晶紫染色实验评估形成生物膜的量。结果 3 组 *S. mutans* 增殖的各个阶段, 与 HtrA 基因缺陷株相比, HtrA 高毒力株与 UA159 标准株的细菌浓度(OD<sub>600</sub> 值) 更高( $P < 0.05$ )。扫描电镜下观察 HtrA 高毒力株密度最大, UA159 标准株次之, HtrA 缺陷株密度最低。与 HtrA 基因缺陷株相比, 生物膜结晶紫半定量测定 4、8、12、24 h HtrA 高毒力株 OD<sub>600</sub> 值差异均有统计学意义( $P < 0.001$ )。结论 *S. mutans* 生物膜的形成受到 HtrA 的影响, HtrA 基因的缺失会降低细菌的黏附和减缓生物膜的形成。

**关键词** 变异链球菌; 高温需要 A 蛋白; 生物膜

中图分类号 R 780.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1381-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.012

龋病的发生发展就是从获得性膜的形成、细菌黏附、牙菌斑生物膜形成到引起牙齿的颜色、形态和质地发生损害性改变, 其中牙菌斑生物膜的形成与龋病发生密切相关<sup>[1]</sup>。变异链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 是造成龋病的最主要的细菌<sup>[2]</sup>, 其致龋性毒力作用基础包括产酸和耐酸、定植牙面形成生物膜及合成胞内外多糖能力<sup>[3]</sup>。高温需要蛋白 A (high temperature requirement A, HtrA) 是细菌体内的一种热休克蛋白质分子, 能够帮助细菌逃避高温、高渗和高氧浓度等环境的变化<sup>[4-5]</sup>。Gasc

et al<sup>[6-8]</sup> 首次在肺炎链球菌中发现了 HtrA, 并发现其参与控制多种细菌毒力因子的表达。课题组前期实验<sup>[9]</sup> 发现 HtrA 对变异链球菌的耐酸和黏附有重要调控作用。该实验旨在利用乳牙高致龋性的 HtrA 基因缺陷株, 探讨 HtrA 的缺失对 *S. mutans* 生物膜的影响, 为龋病的防治提供新的着手点。

## 1 材料与方法

**1.1 实验菌株** 乳牙 *S. mutans* HtrA 高毒力株与缺陷株由课题组前期获得; *S. mutans* 国际标准株 UA159 自四川大学华西口腔医学院国家重点实验室获得。

**1.2 主要实验试剂** MS 固体培养基(美国 BD 公司); BHI 培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司); 甘露糖、蜜二糖、棉子糖、山梨醇、精氨酸双水解酶肉汤细菌微量生化鉴定管、七叶苷培养基(北京陆桥技术有限责任公司)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 *S. mutans* 的复苏与培养** UA159 标准株、HtrA 高毒力株与基因缺陷株复苏经生化鉴定后接种于 MS 固体培养基, 37 °C 厌氧(80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>) 培养 48 h。

**1.3.2 *S. mutans* 体外非应激环境下 [37 °C、厌氧(80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>)] 的生长曲线测定** 挑选 3 个菌株的单菌落至 BHI 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养 24 h; 离心, 弃上清液, 无菌生理盐水漂洗, 重复 3 次; 加入 BHI 溶液稀释菌液, 调节 3 组菌悬液使酶标仪测量吸光度(optical density, OD)<sub>600</sub> = 0.05; 37 °C 厌氧培养, 在 2、4、6、8、10、12、14、16 h 时每组每管分别吸取 100 μl 细菌悬液加入 96 孔板, 测定 OD<sub>600</sub> 值。

## 1.3.3 *S. mutans* 生物膜结晶紫染色定性分析

**1.3.3.1 *S. mutans* 菌液浓度的调节** HtrA 高毒力株与基因缺陷株菌液各 2 支, 重复步骤 1.3.2 项使两菌液 OD<sub>600</sub> = 1.0, 稀释 10 倍备用。

**1.3.3.2 *S. mutans* 生物膜体外构建** 取 5 块一次性无菌 6 孔板, 每孔放入预处理的 22 mm × 22 mm 无菌盖玻片一张, 每两孔分别加入 HtrA 高毒力株菌

2020-04-15 接收

基金项目: 四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院 2014 年联合科研项目; 四川省卫生厅科研基金(编号: 100247); 四川省教育厅科研基金(编号: 13ZA0235)

作者单位: <sup>1</sup>西南医科大学颌面修复重建和再生实验室, 西南医科大学附属口腔医院儿童口腔科, 泸州 646000

<sup>2</sup>四川绵阳四〇四医院口腔科, 绵阳 621000

作者简介: 徐仕珍, 女, 硕士研究生;

刘兴容, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuxin-grong163@163.com

液、HtrA 基因缺陷株菌液, BHI 液体培养基, 每孔 5 ml; 37 °C 厌氧培养; 培养的 1、4、8、12、24 h 随机取出一块 6 孔板, 做后续染色处理。

**1.3.3.3 结晶紫染色定性分析** 随机取出一块 6 孔板, 吸干菌液, 每孔加入 PBS 5 ml, 漂洗, 吸出, 重复 3 次, 吸干; 甲醇固定 15 min, PBS 洗净, 1% 结晶紫染色 5 min, 取出盖玻片, PBS 冲掉多余染液后放于无菌载玻片上, 显微镜油镜下观察。

**1.3.4 S. mutans 生物膜扫描电镜观察**

**1.3.4.1 S. mutans 菌液浓度的调节** UA159 标准株、HtrA 高毒力株与 HtrA 基因缺陷株菌液各 1 支, 重复 1.3.2 项使 3 组菌液 OD<sub>600</sub> = 1.0 为止, 稀释 10 倍备用。

**1.3.4.2 氧化锆片表面细菌生物膜的培养** 一次性无菌 24 孔板 1 个, 11 枚抛光处理过的无菌氧化锆片间隔放入孔内, 每孔加入 0.5 ml 无菌唾液淹没氧化锆片, 37 °C 孵育 4 h; 取出 24 孔板, 去除唾液, 于有氧化锆片的孔中每孔加入 0.8 ml 含 10 g/L 蔗糖的 BHI 液体培养基、0.8 ml 无菌唾液、200 μl 调好浓度的细菌悬液 (UA159 标准株、HtrA 高毒力株与 HtrA 基因缺陷株各加 3 个孔, 余下 2 孔加 200 μl 无菌生理盐水作为空白对照组), 37 °C 厌氧培养 12 h。

**1.3.4.3 扫描电镜标本的制作与观察** 取出 24 孔板, 无菌生理盐水漂洗, 每孔中加入 2 ml 2.5% 戊二醛溶液, 4 °C 固定 4 h; 吸干, 将氧化锆片转入一块新的 24 孔板内, PBS 漂洗 2 次, 15 min/次, 乙醇梯度脱水, 样本干燥喷金, 扫描电镜镜检。

**1.3.5 S. mutans 细菌生物膜结晶紫半定量分析**

**1.3.5.1 S. mutans 菌液浓度的调节** 与 1.3.4.1 同。

**1.3.5.2 S. mutans 细菌微孔生物膜的培养** 取 4 块无菌 96 孔板, 加入调配好浓度的菌液 200 μl/孔, 第一排为 HtrA 高毒力株, 第二排为 UA159 标准株, 第三排为 HtrA 基因缺陷株, 每种菌液设置 10 个复孔; 37 °C 厌氧培养, 分别于 4、8、12、24 h 随机取出一块 96 孔板, 做后续处理。

**1.3.5.3 结晶紫染色半定量分析** 随机取出一块 96 孔板, PBS 洗板 3 次, 吸干, 室温干燥 30 min; 加入 1% 结晶紫染色液 200 μl/孔, 静置 20 min 吸出; PBS 漂洗 3 次, 吸干后干燥 30 min; 加入 95% 乙醇, 200 μl/孔, 振荡 30 min, 测定 OD<sub>600</sub> 值。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 24.0 软件进行分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差,

Leven 检验方差齐性,  $P < 0.05$  时, 组间比较采用 Dunnett's T3 法; 反之, 采用 SNK 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 S. mutans 菌株生化鉴定结果** HtrA 高毒力株、HtrA 基因缺陷株和 UA159 标准株均可分解甘露糖、山梨醇、密二糖、棉子糖, 水解七叶苷, 但不水解精氨酸。

**2.2 S. mutans 菌株体外非应激环境下的生长曲线测定** 3 组 S. mutans 菌株在体外非应激环境下的生长曲线趋势基本一致, 但在细菌增殖的各个阶段, HtrA 高毒力株与 UA159 标准株相对于 HtrA 基因缺陷株具有更高的细菌浓度 (以 OD<sub>600</sub> 值计算)。HtrA 高毒力株与 HtrA 基因缺陷株比较, 2 h 后差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

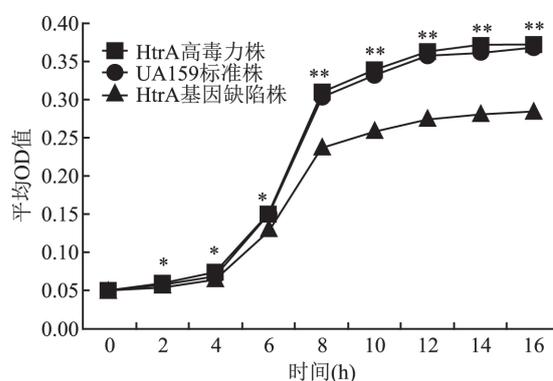


图1 3组菌株生长曲线测定结果  
与 HtrA 基因缺陷株比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.3 S. mutans 生物膜结晶紫染色定性分析** 结晶紫染色后油镜下观察 24 h, 随着时间推移, 各菌株密集度逐渐加大。但不同时间段两者细菌密集度不同, HtrA 高毒力株密度明显高于 HtrA 基因缺陷株。见图 2。

**2.4 S. mutans 生物膜扫描电镜观察** 扫描电镜下观察 3 个菌株的密度, HtrA 高毒力株密度最大, UA159 标准株稍次之, HtrA 基因缺陷株密度最低。见图 3。

**2.5 S. mutans 细菌生物膜结晶紫半定量分析** 4、8、12、24 h HtrA 高毒力株与 HtrA 基因缺陷株比较, OD<sub>600</sub> 值差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。见表 1。

## 3 讨论

生物膜是微生物黏附于牙面形成的复合体, 是

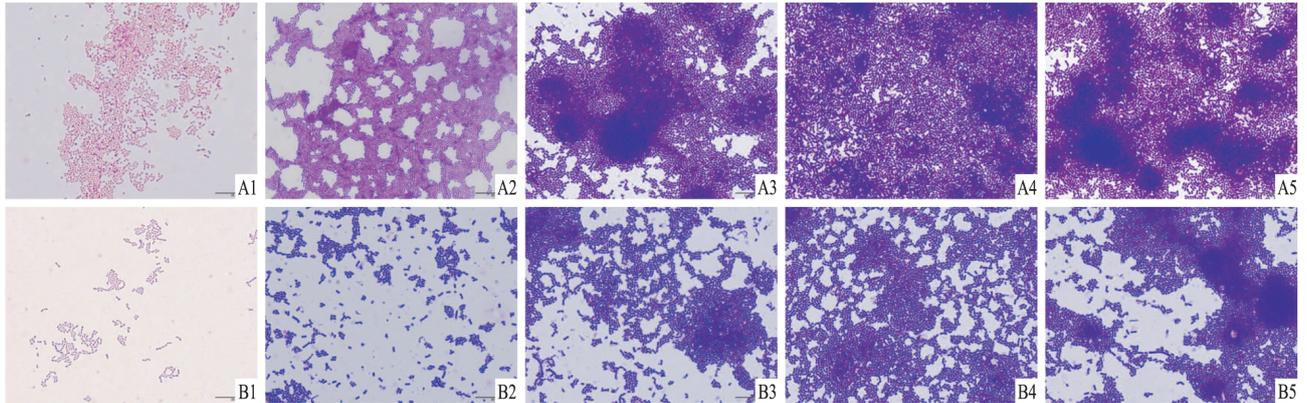


图2 HtrA 高毒力株和 HtrA 基因缺陷株结晶紫染色油镜观察 ×1 000  
A: HtrA 高毒力株; B: HtrA 基因缺陷株; 1: 1 h; 2: 4 h; 3: 8 h; 4: 12 h; 5: 24 h

表1 3个菌株不同时间点结晶紫染色 OD<sub>600</sub> 值( $\bar{x} \pm s$ )

时间(h)	组别(n=10)			F 值	P 值		
	UA159 标准株	HtrA 高毒力株	HtrA 基因缺陷株		P1	P2	P3
4	0.460 ± 0.067	0.856 ± 0.082	0.403 ± 0.121	70.670	<0.001	0.183	<0.001
8	0.754 ± 0.135	1.130 ± 0.077	0.672 ± 0.061	64.506	<0.001	0.105	<0.001
12	1.014 ± 0.147	1.171 ± 0.111	0.862 ± 0.165	11.701	0.021	0.024	<0.001
24	1.233 ± 0.293	1.329 ± 0.143	1.009 ± 0.200	5.518	0.341	0.032	0.001

P1: HtrA 高毒力株与 UA159 标准株比较; P2: UA159 标准株与 HtrA 基因缺陷株比较; P3: HtrA 高毒力株与 HtrA 基因缺陷株比较

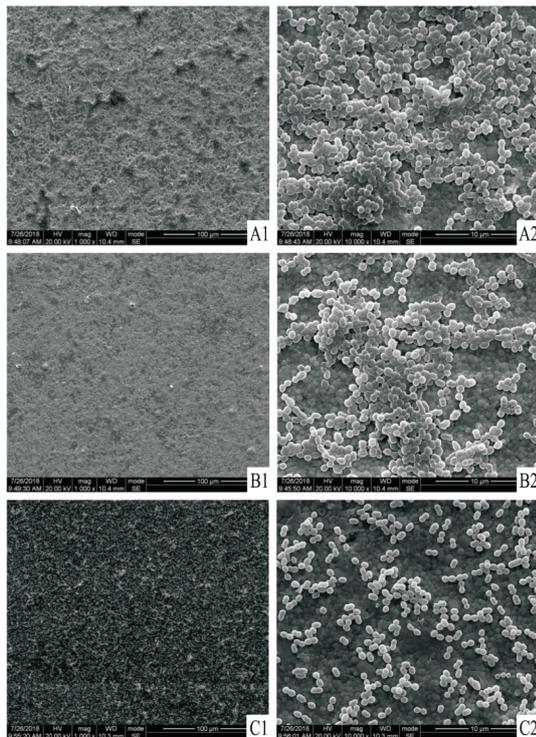


图3 HtrA 高毒力株、UA159 标准株和 HtrA 基因缺陷株扫描电镜下观察

A: HtrA 高毒力株; B: UA159 标准株; C: HtrA 基因缺陷株; 1: ×1 000; 2: ×10 000

集聚。丝氨酸蛋白酶的 HtrA 家族分布广泛,在多种细菌、植物及人体内都发现其同系物,这种蛋白酶具有管家蛋白的作用,能降解错误折叠的蛋白质,维持细菌的生理稳态和适应外界应激环境起重要作用<sup>[10]</sup>。Ahn et al<sup>[11]</sup>在 *S. mutans* 中仅发现一个 HtrA 基因的存在,并且证明了它不仅是调控 *S. mutans* 的生长和耐热性的关键因子,还是调控 *S. mutans* 某些基因转录和生物膜形成的关键因子。

Ahn et al<sup>[11]</sup>证实 HtrA 在 *S. mutans* 的遗传转化中起着控制生长和反应能力的重要作用。敲除 HtrA 基因的 *S. mutans* 对承受低温和高温,低 pH 值以及氧化剂和 DNA 破坏剂的能力降低<sup>[5]</sup>。HtrA 基因的缺失导致 *S. mutans* 在 37 °C 时缓慢生长,在 42 °C 耐热性降低<sup>[11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>表明 HtrA 基因的缺失可以限制细菌的存活能力,在酸性环境下,HtrA 突变体的生长速度比野生株大大降低。本实验显示两实验组 *S. mutans* 生化鉴定结果与标准株 *S. mutans* 相符,说明了 HtrA 基因并不会对 *S. mutans* 生物学特性和遗传特性造成严重影响。而在体外非应激条件下,两实验组 *S. mutans* 菌株的生长曲线趋势与 UA159 标准株虽然基本一致,但在 4 h 以后,HtrA 高毒力株组与 UA159 标准株组的菌液浓度均高于 HtrA 基因缺陷株组,这说明 HtrA 基因可能并

*S. mutans* 赖以生存的微生态环境,它的形成包括两个过程,即早期细菌黏附牙面和后期细菌相互作用、

不影响乳牙 *S. mutans* 生长的基本趋势,但 HtrA 基因的缺失会使 *S. mutans* 的生长增殖速度降低。实验中扫描电镜下观察到各菌株的生物膜:HtrA 高毒力株密度最大,HtrA 基因缺陷株密度最低,HtrA 缺陷株的生物膜较 HtrA 高毒力株的生物膜显得粗糙、稀薄,这与结晶紫染色光镜下结果一致,两者相互印证 HtrA 基因的缺失可降低 *S. mutans* 的黏附,使其形成的生物膜松散、稀薄。细菌生物膜结晶紫半定量分析发现 HtrA 高毒力株生物膜的形成比 HtrA 基因缺陷株生物膜的形成快且多,差异有统计学意义 ( $P \leq 0.001$ ),说明 HtrA 基因的缺失会减缓 *S. mutans* 生物膜的形成速度。综上,HtrA 基因与细菌生长、应激耐受力、反应能力和生物膜的形成有关。Biswas et al<sup>[5]</sup> 认为 HtrA 可能影响 *S. mutans* 糖酵解有关的细胞外酶从而进一步影响 *S. mutans* 生物膜的形成能力,本课题组早期研究<sup>[13]</sup> 表明毒力因子 GTFs 蛋白和基因在乳牙 *S. mutans* HtrA 基因缺陷株中的表达高于 HtrA 高毒力株,但其生物学活性低于 HtrA 高毒力株。证实了 HtrA 基因在乳牙 *S. mutans* GTFs 的分泌过程中可有重要的调控作用,GTFs 生物学活性的降低直接导致了细胞外葡聚糖的减少,进而减缓了 *S. mutans* 在牙面的黏附与生物膜的形成。

总之,HtrA 是 *S. mutans* 生长、生物膜形成和能力发展的调控网络的组成部分,这将为临床上防龋治疗提供新的方向。

### 参考文献

- [1] Marsh P D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries[J]. *Dent Clin North Am* 2010, 54(3): 441-54.
- [2] Galvão L C, Rosalen P L, Rivera-Ramos I, et al. Inactivation of

- the *spxA1* or *spxA2* gene of *Streptococcus mutans* decreases virulence in the rat caries model [J]. *Mol Oral Microbiol* 2016, 32(2): 142-53.
- [3] Lemos J A, Palmer S R, Zeng L, et al. The biology of *Streptococcus mutans* [J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(1): 435-48.
- [4] Banerjee A, Biswas I. Markerless multiple-gene-deletion system for *Streptococcus mutans* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(7): 2037-42.
- [5] Biswas S, Biswas I. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans* [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(10): 6923-34.
- [6] Gasc A M, Giammarinaro P, Richter S, et al. Organization around the *dnaA* gene of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Microbiology*, 1998(144): 433-9.
- [7] Lyon W R, Caparon M G. Role for serine protease HtrA (DegP) of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factors SpeB and the hemolysin streptolysin S [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(3): 1618-25.
- [8] Rigoulay C, Entenza J M, Halpern D, et al. Comparative analysis of the roles of HtrA-Like surface proteases in two virulent staphylococcus aureus strains [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(1): 563-72.
- [9] 王玲,刘瑶,韩林秀,等. HtrA 对乳牙变异链球菌产酸、黏附的体外研究 [J]. *西南医科大学学报* 2019, 42(6): 507-11.
- [10] Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein [J]. *Cell*, 1999, 97(3): 339-47.
- [11] Ahn S J, Lemos J A, Burne R A. Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159 [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(9): 3028-38.
- [12] Kang K H, Lee J S, Yoo M, et al. The influence of HtrA expression on the growth of *Streptococcus mutans* during acid stress [J]. *Mol Cells*. 2010; 29(3): 297-304.
- [13] 李政,朱虹倩,谢茹,等. HtrA 对乳牙高致龋性变异链球菌 GTFs 表达及活性的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2016, 32(4): 475-9.

## Effect of HtrA on the formation of biofilm of *Streptococcus mutans* with high cariogenicity in primary teeth

Xu Shizhen<sup>1</sup>, Yang Weihong<sup>2</sup>, Mao Lin<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Laboratory of Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, Southwest Medical University; Dept of Pediatric Dentistry, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000;

<sup>2</sup>Dept of Stomatology, Mianyang Four Zero Four Hospital of Sichuan, Mianyang 621000)

**Abstract Objective** To study the difference between the high temperature requirement serine proteinase A (HtrA) gene-deficient *Streptococcus* strains and high-virulent strains of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) in the formation of biofilm *in vitro* on non-stressful environment. **Methods** Taking the high virulence strain of HtrA screened from high caries-sensitive deciduous teeth obtained in the early stage and the high cariogenic HtrA gene defective strain and the international standard strain UA159 as the research objects, and the growth curve of them was

# 白细胞介素-1 $\beta$ 诱导甲状腺细胞凋亡机制的研究

李阿楠<sup>1</sup> 张晓序<sup>1</sup> 任翠平<sup>2</sup> 沈际佳<sup>2</sup> 左春林<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨在桥本甲状腺炎(HT)中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )诱导甲状腺细胞凋亡及其可能的作用机制。方法

① 不同浓度、不同时间 IL-1 $\beta$  刺激大鼠甲状腺细胞系(FRTL-5 细胞),采用实时荧光定量 PCR 方法检测 FRTL-5 细胞自杀因子(Fas) mRNA 的表达。② 设立对照组、IL-1 $\beta$  组、IL-1 $\beta$  + caspase-8 抑制剂(Z-ETD-FMK)组,采用流式细胞术检测各组的甲状腺细胞凋亡率。结果 ① 定量 PCR 结果显示 IL-1 $\beta$  与 FRTL-5 细胞 Fas mRNA 表达水平存在剂量-时间依赖关系,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); ② 流式细胞术结果显示,与对照组比较,IL-1 $\beta$  作用后,甲状腺细胞的凋亡率增加( $P < 0.05$ );联合加入 Z-ETD-FMK 后,可抑制 IL-1 $\beta$  诱导甲状腺细胞凋亡率的增加( $P < 0.05$ )。结论 IL-1 $\beta$  可能通过 Fas 和 caspase-8 途径导致甲状腺细胞的凋亡。

**关键词** 桥本甲状腺炎; 凋亡; 白细胞介素-1 $\beta$ ; FRTL-5 细胞; 自杀相关因子

中图分类号 R 581.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1385-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.013

桥本甲状腺炎(Hashimoto thyroiditis, HT) 又称

慢性淋巴细胞性甲状腺炎,是由多种因素导致的一种器官特异性自身免疫性甲状腺疾病<sup>[1]</sup>。该病早期没有明显的临床症状,随着疾病进展则有甲状腺功能减退的表现。其病理特点主要表现为淋巴细胞的浸润,同时可伴有淋巴滤泡形成。研究<sup>[2]</sup>表明,自杀相关因子(factor associated suicide, Fas)介导的细胞凋亡可能是引起甲减的重要途径。Fas 的表达变化可能受局部炎性环境的影响,如促炎因子白细胞介素 1- $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , INF- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等<sup>[3-4]</sup>。前期研究<sup>[5]</sup>表明 IL-1 $\beta$  在 HT 患者甲状腺组织中高表达,可能与甲状腺细胞的 Fas 表达增加相关,但具体机制不明。该研究将通过体外培养大鼠甲状腺细胞系(FRTL-5 细胞),探究 IL-1 $\beta$  是否通过影响 Fas 和 caspase-8 的表达来调控甲状腺细胞凋亡,从而探讨 IL-1 $\beta$  在 HT 发病机制中的作用,为 HT 的临床治疗提供一个潜在的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 大鼠甲状腺细胞 FRTL-5(美国 ATCC 公司);重组人 IL-1 $\beta$ (美国 Sigma 公司);Z-ETD-FMK 抑制剂(美国 R&D 公司);胎牛血清、RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);0.25% 胰酶细胞消化液(上海碧云天生物技术有限公司);TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(美国

2020-03-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270864)

作者单位:<sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院内分泌科,合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学基础医学院微生物与寄生虫学教研室,合肥 230032

作者简介:李阿楠,女,硕士研究生;

左春林,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: zuochl@163.com

evaluated by spectrophotometer turbidimetry. The biofilm model of the three strains was constructed *in vitro*, the morphology and structure of the biofilm were observed under scanning electron microscope( SEM), and the amount of biofilm formation was evaluated by crystal purple staining. **Results** Compared with HtrA gene-deficient strains, the bacterial concentration(OD<sub>600</sub> value) of HtrA high virulent strains and UA159 standard strains was higher than that of HtrA gene deficient strain in each stage of *S. mutans* proliferation in the three groups, and the differences were statistically significant( $P < 0.05$ ). Under scanning electron microscope, the density of HtrA high virulence strain was the highest, followed by UA159 standard strain, and the density of HtrA deficient strain was the lowest. Semi-quantitative determination of biofilm crystal purple for 4, 8, 12, 24 h, there was significant difference in OD<sub>600</sub> value between HtrA high virulence strain and HtrA gene deficient strain( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The formation of *S. mutans* biofilm is affected by HtrA, and the deletion of HtrA gene reduces bacterial adhesion and slows biofilm formation.

**Key words** *Streptococcus mutans*; high temperature requirement serine proteinase A; biofilm