论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1256-04

双歧杆菌脂磷壁酸对不同大肠癌细胞株转移能力及 VEGF 表达的影响

彭艳华[1],刘健龙[1],王 跃[2],刘明方[2],陈淑惠[1] (重庆医科大学:[1]临床检验诊断实验室,[2]病原生物学教研室,重庆 400016)

摘 要:**目的** 研究双歧杆菌脂磷壁酸(lipoteichoic acid,LTA)对血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达及其对大肠癌细胞株侵袭、转移能力的影响。**方法** 采用噻唑蓝比色(MTT)法检测经双歧杆菌 LTA 处理前后大肠癌细胞株 LoVo 和 HT-29 对人工基底膜(Matrigel)的黏附能力变化;Transwell 小室体外侵袭迁移实验检测经 LTA 处理前后两株细胞侵袭、迁移能力的改变。RT-PCR 和 Western blot 检测经 LTA 作用前后,VEGF 在两株细胞中的表达差异。**结果** 经 20、50、80 μg/ml 双歧杆菌 LTA 处理后,LoVo 细胞和 HT-29 细胞在 30、60、90、120 min 时的黏附率明显低于对照组($P<0.01$)经 50 μg/ml 双歧杆菌 LTA 处理 24 h 后,LoVo 细胞和 HT-29 细胞的侵袭能力及 VEGF 的 mRNA 和蛋白质的表达,与对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。**结论** 双歧杆菌 LTA 能抑制大肠癌细胞黏附、侵袭、迁移的能力,下调其 VEGF 的 mRNA 和蛋白质的表达。

关键词:双歧杆菌脂磷壁酸;大肠癌细胞株;侵袭转移;VEGF
中图法分类号:Q939.139;R73-354;R735.34 **文献标识码**:A

Lipoteichoic acid of Bifidobacterium down-regulates VEGF expressions and inhibits the metastasis of colon carcinoma

PENG Yan-hua[1], LIU Jian-long[1], WANG Yue[2], LIU Ming-fang[2], CHEN Shu-hui[1] ([1]The Clinic Laboratory of Medicine, [2]Department of Pathogenic Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of lipoteichoic acid (LTA) of Bifidobacterium on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and invasion and metastasis of colon carcinoma cell lines. **Methods** The effects of LTA on adhesion, invasion and metastasis of human colon carcinoma lines LoVo and HT-29 *in vitro* were examined by MTT colorimetric and transwell chamber. The mRNA and protein expressions of VEGF in the two colon carcinoma cells treated with LTA were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The adhesion ability decreased in LoVo cells and HT-29 cells after the treatment of LTA (20, 50, 80 μg/ml) for 30, 60, 90, 120 min ($P<0.01$); The invasion ability as well as VEGF mRNA and protein expressions decreased after 50 μg/ml LTA treatment in the two carcinoma cells ($P<0.01$). **Conclusion** LTA of Bifidobacterium can inhibit the ability of adhersion, invasion and metastasis of colon carcinoma cell lines and down-regulate the expressions of VEGF.

Key words: colon carcinoma line; lipoteichoic acid; *bifidobacterium*; metastasis; vascular endothelial growth factor

双歧杆菌(*bifidobacterium*)的表面分子脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)已经被证明是其抗肿瘤作用的主要有效成分,对多种体外培养的肿瘤细胞都具有直接的生长抑制作用,并能诱导肿瘤细胞凋亡和分化[1,2]。但双歧杆菌 LTA 对肿瘤细胞侵袭转移的影响报道甚少。本研究采用 Transwell 小室人工重组基底膜侵袭迁移实验观察了 LTA 对体外生长的大肠癌细胞转移的抑制作用,并用 RT-PCR 和 Western blot 技术探讨了 LTA 对与肿瘤细胞转移密切相关的血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

双歧杆菌 LTA 的提取纯化:按 Sutcliffe 等[3]的方法提取,用非离子型去垢剂 Tritonx-114(购自 Sigma 公司)处理两歧双歧杆菌,经 DEAE-Sephacel(购自 Sigma 公司)纯化。大肠癌细胞株:LoVo 和 HT-29(购于第四军医大学实验动物中心);小鼠成纤维细胞株:NIH3T3(重庆医科大学病理生理学教研室惠赠)。

基金项目:重庆市教委科研项目(040308)
Supported by the Scientific Project of Chongqing Municipal Education Committee (040308)
作者简介:彭艳华,女,湖南省永州市人,硕士研究生,主要从事双歧杆菌表面分子抗肿瘤方面的研究。电话:(023)89014316
通信作者:王 跃,电话:(023)68485090,E-mail:wangyue_26@hotmail.com
收稿日期:2007-06-27 修回日期:2007-09-18

提取 RNA 用的 Trizol 试剂盒购于上海生工生物有限公司；RT-PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司；VEGF 和 GAPDH 引物序列由 Invitrogen 公司合成；用于 Western blot 的鼠抗人 VEGF 单克隆抗体（一抗）、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG（二抗）购自北京中山公司；DAB 显色试剂盒购自武汉博士得公司；重组人工基底膜（Matrigel）购自美国 BD 公司；Transwell 小室（8 μm 孔径）购自美国 Costar 公司；RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司；小牛血清购自天津 TBD 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　黏附实验　　将 LoVo 和 HT-29 细胞分别接种于含 10% 小牛血清，pH 值为 7.4 的 RPMI1640 培养基中，置 37 ℃，5% CO_2 条件下培养至对数生长期，换液，分别用含 20、50、80 μg/ml 双歧杆菌 LTA 培养液继续培养 24 h 后用于实验。对照组用不含 LTA 的 RPMI1640 培养液。取对照组和实验组细胞各 2.0×10^5 个（200 μl）加入经 Matrigel 5 μg 包被、2% BSA 封板处理后的 96 孔板；置 37 ℃，5% CO_2 培养箱，分别孵育 30、60、90、120 min 后，弃去培养液，PBS 冲洗 3 次，除去未黏附的肿瘤细胞；弃 PBS 后加 MTT 20 μl，以及无血清 RPMI1640 200 μl，继续孵 3 h；吸弃培养上清溶液，加 DMSO 200 μl 溶解，噻唑蓝显色，酶联免疫检测仪 570 nm 测各孔吸光度值［$D(570)$］，计算细胞黏附率。

$$细胞黏附率(\%)=\frac{实验组\ D(570)}{对照组\ D(570)}\times100\%$$

1.2.2　侵袭实验　　LoVo 和 HT-29 细胞培养方法同黏附实验。

1.2.2.1　制备趋化因子　　用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 液培养 NIH3T3 细胞，37 ℃，5% CO_2，当细胞达 80% 饱和度时用生理盐水洗 3 次，然后加无血清 RPMI1640 液 3 ml 培养 24 h 后收集上清液，离心。－20 ℃保存备用。

1.2.2.2　侵袭实验　　将 Matrigel 按 40 μl/孔均匀铺在 Transwell 小室膜上，成胶 30 min 后置紫外灯下照射过夜，实验前 30 min 再次成胶。取对照组和实验组细胞各 2.0×10^5 个（0.6 ml）分别接种到成胶的 Transwell 小室，并将 Transwell 小室置于 24 孔板内，同时在 24 孔板内加入 NIH3T3 细胞上清液（趋化因子），每孔 0.6 ml，培养 24 h 后取出 Transwell 小室，用棉签头擦掉 Matrigel，PBS 液洗 3 次，95% 乙醇固定 15 min，HE 染色，揭下 Transwell 小室膜反贴在载玻片上，置光镜下观察，计数穿膜细胞数。结果判定：200 倍光镜下计数 5 个视野的穿膜细胞数，取均值。

1.2.3　迁移实验　　用 NIH3T3 细胞上清液为趋化剂，诱导肿瘤细胞穿过 Transwell 小室内聚碳酯膜，其表面不铺 Matrigel，其余步骤与侵袭实验相同。通过计数穿过膜的细胞数即可反映细胞的迁移能力。

1.2.4　RT-PCR　　GAPDH 为内参，引物序列：（正义链）5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，（反义链）5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，扩增片段长度为 425 bp；VEGF 引物序列：（正义链）5′-CCCACTGAGGAGTCCAACAT-3′，（反义链）5′-TCTGTCGATGGTGATGGTGT-3′，扩增片段长度为 283 bp。离心收集经 50 μg/ml 双歧杆菌 LTA 处理 24 h 前后的 LoVo 细胞和 HT-29细胞 1×10^6/ml，参考 Trizol 说明书提取总 RNA。反转录反应体系为：2 μg RNA + 0.5 μg olig（dT）+ 无 RNAase 水，终体积≤15 μl，70 ℃变性，冷却，随后在上述体系中加入 M-MLV 1 μl，dNTP 1.25 μl，RNAse 0.6 μl，M-MLV 5 × Buffer 5 μl，加水至 25 μl。42 ℃ 60 min，95 ℃ 5 min，冰浴 5 min。PCR 的反应体系：10 × PCR Buffer 5 μl，$MgCl_2$ 1.8 μl，灭菌水 17.4 μl，Promega 公司的 *Taq* 酶 0.2 μl，上游引物 1.5 μl，下游引物 1.5 μl，dNTP 0.6 μl，cDNA 2 μl，共 30 μl。反应条件为：94 ℃ 5 min 预变性；94 ℃ 30 s，61 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，32 个循环；72 ℃ 5 min。取 PCR 扩增产物 5 μl 上样于 1% 琼脂糖凝胶（含 0.5 mg/ml 的溴乙啶）。120 V 电压电泳 20 min，然后将凝胶放入凝胶电泳成像仪，在紫外光下自显影，经计算机扫描成像。在 Bio-Rad 凝胶成像仪上观察并保存结果，光密度分析。

1.2.5　Western blot 检测 VEGF 蛋白表达　　离心收集经 50 μg/ml 双歧杆菌 LTA 处理 24 h 前后的 LoVo 细胞和 HT-29 细胞，用裂解液提取蛋白，以蛋白提取液样品作 SDS-PAGE 电泳后转膜、封闭、转至 PVDF 膜、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体及小鼠抗人 β-actin 抗体，4 ℃冰箱过夜；0.01 mol/L PBST 洗涤 3 次，每次 5 min；用辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗小鼠二抗室温孵育 1 h，0.01 mol/L PBST 洗涤 4 次，每次 5 min，DAB 显色。在 Bio-Rad 凝胶成像仪上观察并保存结果，光密度分析。

上述实验重复 3 次。

1.3　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，所得数据用 SAS 统计软件进行分析，组间比较用 t 检验。

2　结果

2.1　双歧杆菌 LTA 对大肠癌细胞黏附人工基底膜能力的影响

在正常情况下，随着培养时间的延长，LoVo 细胞和 HT-29 细胞黏附 Matrigel 的能力增强。经双歧杆菌 LTA 处理后，LoVo 细胞和 HT-29 细胞黏附 Matrigel 的能力下降，且随着双歧杆菌 LTA 剂量的增加和处理时间的延长，其作用更加明显，50 μg/ml 和 80 μg/ml 作用组的黏附能力明显低于对照组，差异有显著性意义（$P<0.01$），见表 1、2。

表 1　LTA 对 LoVo 细胞黏附率的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	0.438 ± 0.068	0.447 ± 0.039	0.492 ± 0.068	0.898 ± 0.067
20 μg/ml LTA	0.439 ± 0.044	0.469 ± 0.034	0.535 ± 0.066	0.831 ± 0.065
50 μg/ml LTA	0.287 ± 0.028[a]	0.319 ± 0.023[a]	0.370 ± 0.012[a]	0.461 ± 0.068[a]
80 μg/ml LTA	0.249 ± 0.051[a]	0.303 ± 0.069[a]	0.355 ± 0.016[a]	0.466 ± 0.075[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较

表 2　LTA 对 HT-29 细胞黏附率的影响（$\bar{x}\pm s$）

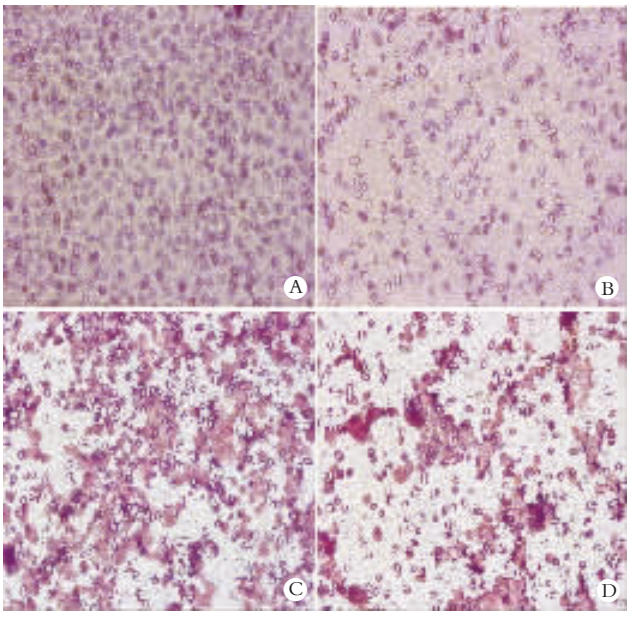
组别	30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	0.409 ± 0.081	0.439 ± 0.016	0.692 ± 0.023	0.798 ± 0.038
20 μg/ml LTA	0.385 ± 0.037	0.426 ± 0.097	0.615 ± 0.031	0.681 ± 0.036
50 μg/ml LTA	0.267 ± 0.010[a]	0.300 ± 0.036[a]	0.411 ± 0.018[a]	0.549 ± 0.021[a]
80 μg/ml LTA	0.248 ± 0.036[a]	0.308 ± 0.019[a]	0.390 ± 0.047[a]	0.475 ± 0.045[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.2　双歧杆菌 LTA 对大肠癌细胞侵袭迁移能力的影响

经 50 μg/ml 双歧杆菌 LTA 处理 24 h 后，LoVo 细胞和

HT-29细胞的侵袭迁移能力均明显下降，与对照组比较有显著性差异（$P<0.01$）（图1，表3）。



A：未处理的LoVo细胞；B：50 μg/ml LTA处理的LoVo细胞；C：未处理的HT-29细胞；D：50 μg/ml LTA处理的HT-29细胞

图1 LTA对LoVo细胞和HT-29细胞侵袭迁移能力的影响（HE×200）

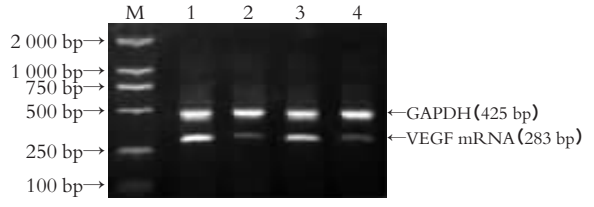
表3 LTA对LoVo细胞和HT-29细胞侵袭迁移能力的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	未处理的LoVo细胞	LTA处理的LoVo细胞	未处理的HT-29细胞	LTA处理的HT-29细胞
侵袭的细胞数量	262.2±6.7	76.4±4.9[a]	332.4±5.7	116.0±4.1[a]
迁移的细胞数量	280.0±4.7	87.2±3.6[a]	351.2±7.5	126.4±4.0[a]

a：$P<0.01$，与未处理组比较

2.3 双歧杆菌LTA对大肠癌细胞株VEGF mRNA表达的影响

实验结果表明，经50 μg/ml双歧杆菌LTA处理24 h后，LoVo细胞和HT-29细胞中VEGF的mRNA的灰度值由（0.96±0.04）下降至（0.60±0.03）和（0.95±0.02）下降至（0.59±0.03）（$P<0.01$）。见图2。

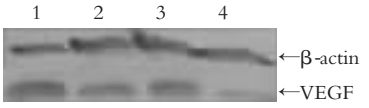


M：DNA标准（DL 2000）；1：未处理的LoVo细胞；2：50 μg/ml LTA处理的LoVo细胞；3：未处理的HT-29细胞；4：50 μg/ml LTA处理的HT-29细胞

图2 双歧杆菌LTA对LoVo细胞和HT-29细胞VEGF mRNA表达的影响

2.4 双歧杆菌LTA对大肠癌细胞株VEGF蛋白表达的影响

实验结果表明，经50 μg/ml双歧杆菌LTA处理24 h后，LoVo细胞和HT-29细胞中VEGF的蛋白质的灰度值由（0.95±0.04）下降至（0.72±0.01）和（0.91±0.03）下降至（0.56±0.03）（$P<0.01$）。见图3。



1：未处理的LoVo细胞；2：50μg/ml LTA处理的LoVo细胞；3：未处理的HT-29细胞；4：50μg/ml LTA处理的HT-29细胞

图3 双歧杆菌LTA对LoVo细胞和HT-29细胞VEGF蛋白表达的影响

3 讨论

双歧杆菌在体内具有生物学屏障、抗感染、控制内毒素血症、免疫赋活、延缓衰老以及抗肿瘤等多种重要生理功能。LTA是双歧杆菌细胞壁中的一种与黏附有关的两性线性磷酸甘油多聚体，它保持了全菌的一些重要生物学特性。1985年Sekine发现了双歧杆菌的表面分子WPG和LTA有单独的抗肿瘤作用，从而确定了双歧杆菌抗肿瘤的有效成分。国内的研究表明，双歧杆菌LTA能够体外诱导胃癌细胞BGC823凋亡，双歧杆菌LTA诱导肿瘤细胞凋亡的信号转导途径可能由TLR启动[4,5]。但LTA对肿瘤细胞侵袭转移的影响报道甚少，本研究以转移能力较高的大肠癌细胞株LoVo细胞和HT-29细胞为实验对象，利用Transwell小室人工重组基底膜侵袭、迁移实验探讨LTA在抑制大肠癌转移方面的影响。本研究中黏附、侵袭和迁移体外实验选用Matrigel为黏附基质，其成分与组织基底膜相似。在37℃时呈胶冻样，可较好的模拟组织基底膜，用作观察细胞同细胞外基质的相互作用，用于Transwell小室联合培养系统反映肿瘤细胞的侵袭运动能力。

本研究测定经不同剂量双歧杆菌LTA处理后，大肠癌细胞株黏附能力的变化，结果显示：经过低剂量LTA（20 μg/ml）处理后的两株细胞，其黏附能力没有明显改变；而经较高剂量（50、80 μg/ml）处理后的两株细胞，其黏附能力受到明显抑制。提示LTA抑制大肠癌细胞株的黏附能力需要达到一定的阈值浓度。并且发现，经过适当剂量LTA处理后的大肠癌细胞，其黏附、侵袭、转移能力受到了明显抑制。

恶性肿瘤的生长和转移必须依赖丰富的营养供给，组织中血管的生成为营养物质和氧气进入肿瘤组织、代谢产物运出组织细胞外和肿瘤细胞迁移至靶器官奠定了重要的基础条件。因此，血管生成是肿瘤生长和转移的必备条件，与肿瘤的发生、发展和转移有着密切关系。VEGF是血管生存过程中最重要的血管内皮刺激生长因子，直接作用于血管内皮细胞膜上的两种Ⅲ型酪氨酸激酶受体，能增加微血管特别是毛细血

管和小静脉的通透性，从而有利于肿瘤细胞的微转移[6]。研究表明，在大肠癌中 VEGF 表达明显增高，VEGF 表达与大肠癌生长、转移及肿瘤血管密度密切相关，并可作为判断预后的指标[7]。Lee 等[8] 发现 VEGF 在结肠息肉、无转移和有转移大肠癌中的表达率依次升高，提示 VEGF 表达增加与大肠肿瘤的进展有潜在联系。彭亦良等[9] 发现，结肠癌组织中肿瘤细胞可表达 VEGF-C，并且伴有淋巴结转移的结肠癌，其 VEGF-C 阳性表达显著高于无淋巴结转移者，提示 VEGF-C 阳性表达与结肠癌细胞的淋巴结转移关系密切。Ellis 等[10] 通过在小鼠大肠癌肝转移模型中注射小分子药物 SU5416 和 SU6668，此类药物可以特异性的抑制 VEGF 的某些受体如 VEGFR-2 等，发现能够明显抑制肿瘤血管生成、增殖及大肠癌肝转移的进一步发展，提示以 VEGF 为治疗靶点是一种理性的治疗肿瘤的方法，甚至有益于抑制临床上大肠癌肝转移患者的进一步恶化。本研究显示，经过双歧杆菌 LTA 作用后，两株大肠癌细胞中 VEGF 的表达均下降，说明 LTA 能够下调大肠癌细胞 VEGF 的表达，但它是否通过影响 VEGF 与其受体的结合或者是通过抑制 VEGF 的某些受体的表达，进而来抑制肿瘤血管生成、增殖及大肠癌细胞的侵袭转移能力，还有待进一步的实验来论证。

本研究利用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测了两株细胞中 VEGF 表达的差异。研究结果显示：经过双歧杆菌 LTA 处理后的两株细胞，VEGF 的表达明显减少。由此说明，LTA 抑制大肠癌细胞的转移的可能机制之一是 LTA 通过下调大肠癌细胞 VEGF 的产生来抑制其转移。

参考文献：

[1] Sekine K, Ohta J, Onishi M, *et al*. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of Bifidobacterium infantis [J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(1): 148 – 153.

[2] 蒋　虹，胡　宏. 双歧杆菌表面分子诱导大肠癌细胞分化的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2001，21(2)：186 – 190.

[3] Sutcliffe I C, Hogg S D. Extraction of lipoteichoic acid from Streptococcus mutants with the non-ionic detergent TritonX 114 [J]. J Microbiol Methods, 1993, 17(3): 215 – 225.

[4] 王　跃，程　磊，刘明方，等. 双歧杆菌脂磷壁酸体外诱导胃癌细胞凋亡的研究[J]. 实用肿瘤杂志，2005，20(5)：400 – 403.

[5] 王　跃，罗　强，陈淑惠，等. 双歧杆菌脂磷壁酸对结肠癌细胞 Toll 样受体表达的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2005，25(10)：803 – 805.

[6] Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on VEGF family members [J]. Int J Oncol, 2006, 28(6): 1585 – 1589.

[7] Rosen L S. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances[J]. Oncologist, 2005, 10(6): 382 – 391.

[8] Lee J C, Chow N H, Wang S T, *et al*. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(6): 748 – 753.

[9] 彭亦良，梁后杰，高晋华，等. CXCR4 和 VEGF-C 在结肠癌组织中的表达及与淋巴结转移之间的关系[J]. 第三军医大学学报，2006，28(4)：357 – 359.

[10] Ellis L M, Takahashi Y, Liu W, *et al*. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications [J]. Oncologist, 2000, 5 Suppl 1: 11 – 15.

[11] 李　焱，蒋　勇，史立群，等. HMGB1 和 VEGF-C/D 在结肠癌组织中的表达及与淋巴结转移之间的关系[J]. 第三军医大学学报，2006，28(11)：1237 – 1239.

（编辑　陈聪连）

全国消化外科新技术、新进展研讨会征文通知

由《中华消化外科杂志》编辑委员会主办，第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所、《中华消化外科杂志》编辑部、重庆市消化外科专业委员会承办的"全国消化外科学术新技术、新进展研讨会"将于 2008 年 11 月在重庆市召开。大会将以展示消化外科领域发展的新技术为主题，以手术及 Video 演示为主要形式。欢迎全国外科同仁踊跃投稿参会。

征稿内容：消化外科领域，包括肝脏肿瘤、胆道肿瘤、肝胆管结石、胰腺肿瘤、肝移植、食管疾病、胃肠疾病、胃肠肿瘤等相关学科最新临床新技术、新方法；消化外科领域相关实验研究新成果；消化外科疾病的诊治经验。

投稿要求：①论文全文 5 000 字以内，包括 500 字左右的中文摘要，请用 word 格式，文题用 3 号黑体，正文用 5 号宋体，1.5 倍行距。②文内务必注明"会议征文"字样、作者的联系地址、电话、E-mail。③请尽量使用电子邮件投稿，投稿请发《中华消化外科杂志》专用邮箱：digsurg@263.net，邮件主题注明"会议征文"。④纸版投稿请用 A4 纸打印，请寄：重庆市第三军医大学西南医院《中华消化外科杂志》编辑部 邮编：400038。⑤截稿日期：2008 年 10 月 30 日。优秀论文将在《中华消化外科杂志》优先发表，参会者可获得国家继续教育 I 类学分 10 分。

地　址：重庆市第三军医大学西南医院《中华消化外科杂志》编辑部　　邮　编：400038

联系人：陈　敏　邹迎芬　　电　话：(023)68754655，68754776

传　真：(023)65317637　　E-mail：digsurg@263.net