论著

文章编号:1000-5404(2013)22-2448-04

酪酸梭菌诱导结肠癌SW-480细胞凋亡及作用机制

杨金梅,张德纯,李 科,刘胜男,朱 辉 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室)

[摘要] **目的** 探讨酪酸梭菌(*Clostridium butyricum*, CB)诱导人结肠癌SW-480细胞凋亡的作用及机制。**方法** 采用不同浓度的酪酸梭菌(1.5×10^3、1.5×10^4、1.5×10^5、1.5×10^6、1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/mL)在不同作用时间(24、48、72、96 h)处理结肠癌SW-480细胞后,CCK8法检测CB对SW-480细胞的增殖抑制。电镜观察CB对SW-480细胞形态的影响。Annexin V-FITC/PI双标法检测细胞凋亡。Caspase试剂盒检测SW-480细胞中Caspase-3和Caspase-9的活性。Western blot法检测SW-480细胞Bax和Bcl-2凋亡蛋白表达的变化。**结果** 酪酸梭菌对SW-480细胞的生长抑制作用呈明显的时间-剂量依赖性;菌液浓度为1.5×10^7 CFU/mL和1.5×10^8 CFU/mL的酪酸梭菌处理后的SW-480细胞形成典型的凋亡小体;酪酸梭菌(1.5×10^7 CFU/mL和1.5×10^8 CFU/mL)处理能显著增强SW-480细胞Caspase-3和Caspase-9的活性,促进SW-480细胞凋亡($P<0.01$);随着菌液浓度的增加,凋亡蛋白Bax的表达增强,而抑凋亡蛋白Bcl-2的表达减弱。**结论** 酪酸梭菌可诱导SW-480细胞凋亡,其作用机制与凋亡相关基因Bax、Bcl-2和caspase-3、caspase-9的表达有关。

[关键词] 酪酸梭菌;结肠癌;SW-480细胞;凋亡

[中图法分类号] R378;R73-362;R735.35 [文献标志码] A

Apoptosis of colon cancer SW-480 cells induced by *clostridium butyricum* and its mechanism

Yang Jinmei, Zhang Dechun, Li Ke, Liu Shengnan, Zhu Hui (Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects and mechanism of *Clostridium butyricum* (CB)-induced apoptosis in human colon cancer cell line SW-480. **Methods** SW-480 cells were treated with CB at different concentrations of 1.5×10^3, 1.5×10^4, 1.5×10^5, 1.5×10^6, 1.5×10^7, and 1.5×10^8 CFU/mL for different time (24, 48, 72, or 96 h). Cell viability was tested by CCK-8 assay. Cell morphology was examined by electron microscopy. Annexin V-FITC/PI double-staining was performed to detect cell apoptosis. The activities of Caspase-9 and Caspase-3 were measured by Caspase assay kit. The protein expression of Bcl-2 and Bax was detected by Western blotting. **Results** The inhibitory effect of CB on SW-480 cells showed a significant time-dose fashion. CB with the bacterial concentration of 1.5×10^7 and 1.5×10^8 CFU/mL induced typical apoptotic bodies, increased the activities of caspase-9 and caspase-3, and promoted apoptosis in SW-480 cells ($P<0.01$). With the increase of bacterial concentration, the expression of apoptotic protein Bax was enhanced and that of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased. **Conclusion** CB effectively induces apoptosis of SW-480 cells, which may involve the expression regulation of apoptosis-related genes Bcl-2, Bax, Caspase-9, and Caspase-3.

[**Key words**] *Clostridium butyricum*; colon cancer; SW-480 cells; apoptosis

Corresponding author: Zhang Dechun, E-mail:zhangdechun46@163.com

结肠癌是人类高发恶性肿瘤,发病率呈不断上升趋势,居全球恶性肿瘤死因的第2位。在我国,结肠癌病死率已上升至恶性肿瘤病死率的第5位,严重危害人类健康。结肠癌的发生涉及多种癌基因多个阶段的过程,是多种癌基因协同作用的结果[1]。在近几年的

[通信作者] 张德纯,E-mail:zhangdechun46@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130922.1723.001.html(2013-09-22)

研究中发现,细胞凋亡与肿瘤的发生密切相关,细胞凋亡受阻可能是肿瘤发病的重要机制之一,治疗肿瘤的新思路趋向于诱导肿瘤细胞凋亡[2]。应用细菌治疗肿瘤的历史悠久,一些不良反应如毒性限制了其基础研究及临床应用,益生菌的发现和相关技术克服了这方面的缺点,并且作为益生菌寄居的场所,消化道与益生菌的关系密不可分,这为消化系统肿瘤的治疗提供了新切入点[3]。

酪酸梭菌是一种专性厌氧的革兰阳性芽孢杆菌,其短径为0.6~1.2 μm,长径为3.0~7.0 μm,两端钝圆,中间部分轻度膨胀,细菌呈直杆状或稍有弯曲,单个或成对,短链,偶见有丝状菌体,周身鞭毛,能运动。孢子卵圆,偏心或次端生。作为益生菌的酪酸梭菌已广泛应用于医药方面,但是在治疗结肠癌的基础研究方面鲜有报道。本实验初步观察酪酸梭菌对人结肠癌SW480细胞体外生长的影响,并研究其相关作用机制,旨在为其治疗消化道肿瘤的应用及进一步开发提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、菌种、试剂和主要仪器

结肠癌细胞株SW-480保存于重庆医科大学检验医学院,酪酸梭菌保存于本实验室,RPMI1640(美国HyClone公司),胎牛血清(美国HyClone公司),噻唑蓝(MTT)、7 Sea Cell Counting Kit 8(CCK-8)、Annexin V-FITC试剂盒、Caspase-3、Caspase-9活性检测试剂盒、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天,兔抗人Bax IgG多克隆抗体(Abcam),兔抗人Bcl-2 IgG多克隆抗体(ImmunoWay),β-actin肌动蛋白和辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(Bioss),化学发光检测试剂盒(碧云天),全自动酶标仪(Bio-Rad Model 680),流式细胞仪(美国BD公司),倒置显微镜(德国Leica公司),透射电镜(Hitachi-7500),化学显影仪(ChemiDocXRSBio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 酪酸梭菌采用疱肉培养基培养(多胨12 g,植胨3 g,酵母粉3 g,可溶性淀粉3 g,硫酸镁无水0.1 g,硫代硫酸钠1.0 g,磷酸氢二钠11 g,牛肉渣1 g,调pH值为7.8,高压灭菌121 ℃,15 min),取对数生长期的酪酸梭菌经灭菌的pH值为7.4的PBS洗涤3次,4 000 r/min离心10 min,加2 mL RPMI1640培养基,混匀,用分光光度计测量光密度值,调整菌液浓度为1.5×10^8 CFU/mL。

1.2.2 细胞培养 人结肠癌细胞SW-480常规培养于含10%胎牛血清的改良型RPMI1640培养液(含100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素)中,置于37 ℃、相对湿度95%、5% CO_2培养箱中培养,每2~3天换液1次,5~6 d传代1次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 CCK-8测定 将对数生长期的SW-480细胞配制成密度为1.0×10^4/mL细胞悬液,每孔100 μL接种于96孔板,再分别加入不同浓度的酪酸梭菌(1.5×10^3、1.5×10^4、1.5×10^5、1.5×10^6、1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/mL)各10 μL,另设加入等量培养液的空白对照组,每组设5个平行孔。分别培养24、48、72、96 h后每孔加入CCK-8溶液10 μL,37 ℃继续培养4 h后,用酶标仪测定不同作用时间下细胞的光密度值[$D(450)$],实验重复3次,计算细胞增殖抑制率(RI),RI=[1-$D(450)$药物组/$D(450)$对照组]×100%。

1.2.4 电镜观察细胞凋亡小体 将正常对照和经不同浓度酪酸梭菌(1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/mL)处理的SW-480细胞常规培养48 h后,用0.25%胰酶消化,收集细胞量达到1.0×10^6以上,细胞液体量大于1.5 mL时,先将细胞装入10 mL离心管,以800 r/min离心5 min,离心管底部形成松散的细胞团块,吸去上清液,保留1.5 mL细胞液体,吹散,液体量小于1.5 mL时,将细胞液装入1.5 mL EP管中,1 200 r/min离心10 min形成团块吸净上清,4%戊二醛作前固定,1%锇酸作后固定,经酒精、丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋后制备超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅染色,透射电镜下观察细胞凋亡小体。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI双标法检测细胞凋亡 将正常对照和经不同浓度酪酸梭菌(1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/mL)处理的SW-480细胞常规培养48 h后,用0.25%胰酶消化后收集细胞,按试剂盒说明书进行操作,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.6 处理后SW-480细胞Caspase活性检测 阴性对照组和经不同浓度酪酸梭菌(1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/mL)处理的SW-480细胞常规培养48 h后,收集细胞,用PBS洗涤2次,600×g 4 ℃离心5 min,收集沉淀细胞加入100 μL裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解15 min,4 ℃,17 000×g离心15 min,吸取上清液到EP管中进行Caspase活性检测,具体方法按照试剂盒说明书进行,波长405 nm下测定光密度值,按公式计算Caspase-3、Caspase-9酶活性。

1.2.7 Western blot检测 将未经处理的和经不同浓度酪酸梭菌(1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/mL)处理的SW480细胞常规培养48 h后,离心收集1.0×10^6个细胞,PBS冲洗3次,在细胞沉淀中加入100 μL细胞裂解液和蛋白酶抑制剂10 mg/mL,冰上裂解5 min,4 ℃,14 000×g离心5 min,收集蛋白上清液,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉室温下封闭2 h,加入兔抗人Bax多克隆抗体(1∶1 000)、兔抗人Bcl-2多克隆抗体(1∶1 000)、β-actin单克隆抗体(1∶1 000)孵育过夜,TBST冲洗3次,每次10 min,随后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1∶500)室温孵育2 h,TBST冲洗3次,每次5 min,化学发光剂显色,曝光,对Bax和Bcl-2蛋白表达情况进行检测。β-actin作为内参照。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 5.0统计软件进行分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示,进行重复测量方差分析。

2 结果

2.1 酪酸梭菌对SW480细胞的生长抑制作用

由表1可知:酪酸梭菌实验组在不同作用时间(24、48、72、96 h)点和不同浓度(1.5×10^3 ~ 1.5×10^8 CFU/mL)时对SW-480细胞生长均有抑制作用,与阴性对照组比较,差异具有显著性($P<0.01$);而且同一浓度的酪酸梭菌对SW-480细胞的生长抑制率随时间的延长而提高,与作用24 h时间比较,差异具有显著性($P<0.01$)。实验结果显示,酪酸梭菌对SW-480细胞的生长抑制作用呈明显的时间-剂量依赖性。

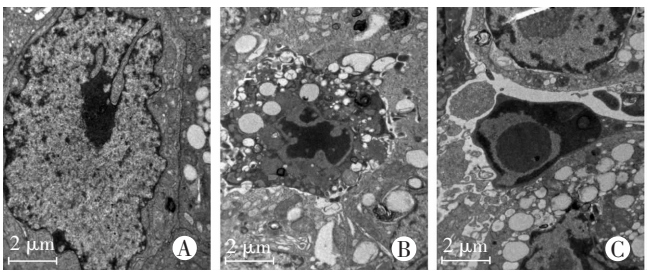
表1 不同浓度酪酸梭菌对结肠癌SW-480细胞作用不同时间生长抑制率的影响(%,$n=3,\bar{x}\pm s$)

浓度(CFU/mL)	24 h	48 h	72 h	96 h
0(阴性对照)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
1.5×10^3	0.19±0.02[a]	0.21±0.10[ab]	0.26±0.01[ab]	0.32±0.02[ab]
1.5×10^4	0.22±0.01[a]	0.27±0.01[ab]	0.32±0.04[ab]	0.41±0.03[ab]
1.5×10^5	0.33±0.04[a]	0.34±0.06[ac]	0.40±0.02[ab]	0.50±0.05[ab]
1.5×10^6	0.42±0.06[a]	0.45±0.08[ab]	0.49±0.01[ab]	0.53±0.01[ab]
1.5×10^7	0.49±0.09[a]	0.55±0.12[ab]	0.60±0.05[ab]	0.65±0.10[ab]
1.5×10^8	0.53±0.01[a]	0.61±0.03[ab]	0.67±0.00[ab]	0.73±0.05[ab]

a:$P<0.01$,与阴性对照比较;b:$P<0.01$,与同一浓度酪酸梭菌作用24 h比较

2.2 酪酸梭菌对SW480细胞超微结构的影响

经醋酸铀和枸橼酸铅染色后,电子显微镜下可见阴性对照组细胞膜完整、胞核圆形,核形态饱满,核质密度均匀一致(图1A);用酪酸梭菌(1.5×10^7和1.5×10^8 CFU/mL)处理48 h后,可见细胞和细胞器皱缩,表面粗糙,胞质致密,核染色质边集,部分细胞胞质和胞核分叶状突起并形成含核碎片和细胞器成分的多个凋亡小体,并与胞体分离,呈现典型的凋亡形态特征,以1.5×10^8 CFU/mL酪酸梭菌处理组形态更为明显(图1B、C)。



A:阴性对照组;B:1.5×10^7 CFU/mL酪酸梭菌组;C:1.5×10^8 CFU/mL酪酸梭菌组

图1 各组酪酸梭菌对SW-480细胞超微结构的影响 (TEM×10 000)

2.3 酪酸梭菌对SW-480细胞凋亡的影响

SW-480细胞经酪酸梭菌(1.5×10^7、1.5×10^8 CFU/mL)处理48 h后出现了明显的凋亡,而且随着酪酸梭菌浓度增加凋亡率提高,与阴性对照组比较,具有显著性差异($P<0.05$),见表2。实验表明酪酸梭菌能诱导结肠癌SW480细胞发生凋亡。

表2 各组酪酸梭菌对SW480细胞凋亡率的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	浓度(CFU/mL)	凋亡率(%)
阴性对照组	-	0.051 2±0.001 3
酪酸梭菌组	1.5×10^7	0.138 1±0.003 6[a]
酪酸梭菌组	1.5×10^8	0.178 1±0.002 3[a]

a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

2.4 酪酸梭菌对SW-480细胞Caspase-3、Caspase-9活性的影响

由表3可知,SW-480细胞用酪酸梭菌(1.5×10^7 CFU/mL和1.5×10^8 CFU/mL)处理后可使细胞中Caspase-3、Caspase-9活性分别提高68.3%、89.5%和58.8%、92.3%,与阴性对照组相比具有显著性差异($P<0.01$),且随着酪酸梭菌菌液浓度的升高而增强。

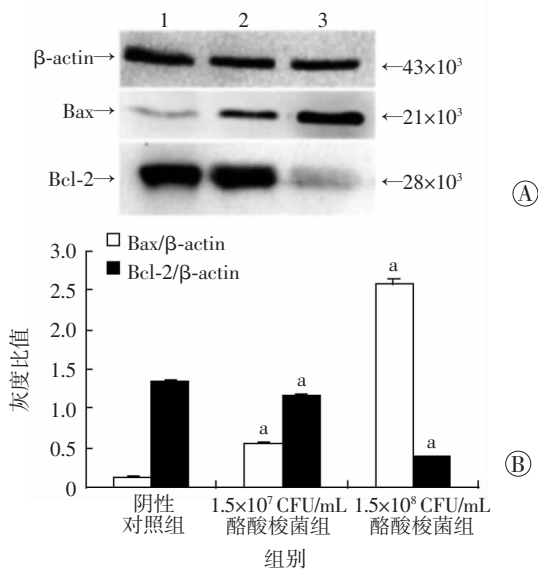
表3 各组酪酸梭菌对SW-480细胞Caspase-3、Caspase-9活性的影响($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(CFU/mL)	Caspase-3(U/mL)	Caspase-9(U/mL)
阴性对照组	-	53.67±7.02	73.67±5.03
酪酸梭菌组	1.5×10^7	90.33±7.57[a]	117.00±8.00[a]
酪酸梭菌组	1.5×10^8	101.70±4.16[a]	141.70±4.16[a]

a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

2.5 酪酸梭菌对SW-480细胞凋亡蛋白Bax和Bcl-2的影响

如图2所示,用酪酸梭菌(1.5×10^7 CFU/mL和1.5×10^8 CFU/mL)处理后可使SW-480细胞中Bax蛋白表达增加,而Bcl-2蛋白表达减少,与阴性对照组比较具有显著性差异($P<0.01$),且随着酪酸梭菌浓度增加,Bax蛋白表达增强,Bcl-2蛋白表达减弱。



A:Western blot检测 1:阴性对照组;2:1.5×10^7 CFU/mL酪酸梭菌组;3:1.5×10^8 CFU/mL酪酸梭菌组;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

图2 各组酪酸梭菌对SW-480细胞Bax和Bcl-2蛋白表达的影响

3 讨论

近年来从天然药物中寻找副作用小且疗效显著的抗肿瘤药物逐渐涉及零副作用的益生菌,如双歧杆菌在肿瘤治疗方面主要作为基因转移载体[4]。酪酸梭菌是一种典型的产丁酸菌,故又名为丁酸梭菌,革兰阳性菌有芽孢形成,存在于土壤和健康人、动物肠道,其作为临床上常用的益生菌,能防止胃肠道菌群的干扰,治疗腹泻,在提高人体体液免疫反应的同时促进人体消化功能[5-6]。最近的一项研究报道了丁酸梭菌MIYAIRI588(CBM588)在安全有效治疗膀胱癌方面有不可忽略的潜力[7-8],然而有关其抗肿瘤的分子机制鲜有报道。本实验将依据其临床疗效进一步从细胞水平证实其诱导结肠癌SW-480细胞凋亡及作用机制,实验结果表明,酪酸梭菌在不同作用时间(24、48、72、96 h)点和不同菌液浓度(1.5×10^3 ~ 1.5×10^8 CFU/mL)时对SW-480细胞生长均有抑制作用,随着酪酸梭菌浓度的增加和作用时间的延长,其抑制作用更加明显,表明酪酸梭菌对SW-480细胞生长的抑制作用与菌液浓度和作用时间有密切关系。

很多疾病尤其是肿瘤的发生与细胞凋亡密切相关,而评估抗癌药物能力的重要指标包括药物对细胞凋亡的促进[9]。细胞凋亡的特征形态学变化是有凋亡小体的形成,本次实验用电镜和流式细胞术分析后观察到经酪酸梭菌处理后细胞和细胞器皱缩,表面粗糙,胞质致密,核染色质边集,形成典型的凋亡小体,表明酪酸梭菌抑制SW-480细胞增殖的机制之一是促进细胞凋亡。

在细胞凋亡的信号传导通路中,Caspases酶起着关键性的作用,线粒体是压力信号诱导细胞凋亡的关键调控元件,线粒体膜上通透性转运(PT)孔的开放导致细胞色素C(cyt C)、凋亡诱导因子1(Apaf-1)等Caspase激活剂的释放。cyt C与Apaf-1一起激活Caspase-9从而激活Caspase-3,激活多种内切核酸酶从而产生凋亡的形成。也就是说只要细胞的死亡有Caspases酶的参与,即激活Caspase-9和Caspase-3两个关键性的酶,那么就是凋亡[10]。Bcl-2(B淋巴细胞/白血病-2)蛋白家族参与了PT孔的组成,通过调节PT孔的开放控制凋亡的发生。Bcl-2基因家族蛋白分为抑制凋亡和促进凋亡两组,凋亡抑制组有Bcl-2,其主要分布在线粒体膜与细胞质中,当其形成同或异二聚体时,具有抗凋亡作用;凋亡促进组有Bax,其分布于细胞质中,当其形成同或异二聚体时在凋亡信号刺激后从细胞质移位在线粒体膜,消除Bcl-2的功能,具有促进凋亡的作用,可见特定的Bcl-2基因家族蛋白二聚体发挥凋亡开关的作用。本研究中我们发现,在Caspase活性分析中,酪酸梭菌可使SW-480细胞中Caspase-9和Caspase-3的活性显著升高。用Western blot方法检测在酪酸梭菌处理SW-480细胞后Bcl-2和Bax的表达,结果发现处理后Bcl-2的表达显著降低,Bax的表达显著升高,实验说明酪酸梭菌促进SW-480细胞凋亡不但与Caspase-9及Caspase-3表达有关还与其调节Bcl-2和Bax的表达有关。

综上所述,本研究证实酪酸梭菌对诱导SW-480细胞凋亡有显著作用,其机制可能通过增强Caspase-9和Caspase-3的活性以及上调Bax和下调Bcl-2的表达,从而抑制SW-480细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡。

参考文献:

[1] 吕强, 邢沈阳, 赵志辉, 等. 结肠癌的研究现状及展望[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(8): 1134-1137.
[2] 周进明, 梁后杰, 彭秋平, 等. 地塞米松诱导结肠癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(8): 580-583.
[3] 王健生, 张明鑫. 益生菌在消化系肿瘤治疗中的潜在应用价值[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(6): 539-543.
[4] 蔡晓珊, 张式暖, 李文通. 双歧杆菌在肿瘤治疗中的应用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(3): 236-239.
[5] Zhang B, Yang X, Guo Y, *et al*. Effects of dietary lipids and Clostridium butyricum on serum lipids and lipid-related gene expression in broiler chickens[J]. Animal, 2011, 5(12): 1909-1915.
[6] Gao Q, Qi L, Wu T, *et al*. Clostridium butyricum activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 361(1/2): 31-37.
[7] Shinnoh M, Horinaka M, Yasuda T, *et al*. Clostridium butyricum MIYAIRI 588 shows antitumor effects by enhancing the release of TRAIL from nertrophils through MMP-8[J]. Int J Oncol, 2013, 42(3): 903-911.
[8] Nakanishi S, Kataoka K, Kuwahara T, *et al*. Effects of high amylose maize starch and Clostridium butyricum on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon[J]. Microbiol Immunol, 2003, 47(12): 951-958.
[9] Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942: 287-308.
[10] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J L, *et al*. The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942: 157-183.

(**收稿**:2013-05-24;**修回**:2013-07-18)
(编辑 邓强庭)