

嗜酸乳杆菌胞外蛋白的分离纯化及抑制 HT-29 细胞增殖作用的研究

贾彦, 任效东, 江岩, 明珠, 赵培, 庞广昌, 阎亚丽, 陈庆森

(天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

摘要: 为探讨嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 分泌的相关蛋白质及其促进肠道稳态的功能作用, 本研究以 *L. acidophilus* 作为研究对象, 固体培养获得胞外蛋白粗提液, 采用 Sephadex G-100 凝胶层析纯化, 收集胞外蛋白各组分, 用考马斯亮蓝法和 SDS-PAGE 方法分别测定各蛋白组分的含量及分子量, 然后采用四氮唑蓝比色分析法(MTT 法)鉴定各蛋白组分抑制 HT-29 细胞增殖的能力。研究显示, 分离 *L. acidophilus* 胞外蛋白获得两个蛋白峰, 分子量分别为 67 ku 和 37 ku, 含量分别为 0.066 mg/mL 和 0.021 mg/mL, 不同浓度 (0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$) 的 67 ku 和 37 ku 胞外蛋白分别对 HT-29 细胞作用 12 h、24 h、48 h 和 72 h, 均显示抑制细胞增殖的作用, 且呈现明显的量效关系和时间依赖效应, 其中 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 67 ku 和 37 ku 胞外蛋白对 HT-29 细胞作用 48 h 的抑制率分别为(38.41 \pm 1.94)%和(45.06 \pm 1.58)%。综上所述, 固体培养 *L. acidophilus* 可获得两种胞外蛋白 (即 37 ku 和 67 ku), 其对 HT-29 细胞增殖具有不同程度的抑制作用, 其中 37 ku 胞外蛋白的抑制作用较强。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 胞外蛋白; HT-29 结肠癌细胞; 抑制作用

文章编号: 1673-9078(2016)11-56-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.009

Isolation and Purification of *Lactobacillus acidophilus* Extracellular

Proteins and Their Inhibitory Effect on the Proliferation of HT-29 Cells

JIA Yan, REN Xiao-dong, JIANG Yan, MING Zhu, ZHAO Pei, PANG Guang-chang, YAN Ya-li, CHEN Qing-sen

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: To explore the related proteins secreted by *Lactobacillus acidophilus* and their functional roles in promoting gut homeostasis, the extracellular protein crude extract was obtained from *L. acidophilus* solid culture, and each fraction of the extracellular proteins was collected after purification and isolation using Sephadex G-100 gel chromatography. The amount of protein and molecular mass of each protein fraction were determined by Coomassie brilliant blue method and SDS-PAGE electrophoresis, respectively. Then, the inhibitory effect of each *L. acidophilus* extracellular protein fraction on the proliferation of HT-29 cells was investigated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Two protein peaks were obtained after purification, their molecular weights were 67 ku and 37 ku, respectively, and their protein contents were 0.066 mg/mL and 0.021 mg/mL, respectively. HT-29 cells were treated with both 67 ku and 37 ku extracellular proteins at concentrations of 0.001 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, and 1 $\mu\text{g/mL}$ for 12 h, 24 h, 48 h, or 72 h, respectively. Both proteins showed an inhibitory effect on the proliferation of HT-29 cells in a time- and dose-dependent manner. Among the tested concentrations, the inhibition rates of the 67 ku and 37 ku extracellular proteins at $\mu\text{g/mL}$ on HT-29 cells were (38.41 \pm 1.94)% and (45.06 \pm 1.58)%, respectively. In conclusion, *L. acidophilus* cultured on solid medium produced two types of extracellular proteins (37 ku and 67 ku), which inhibited the proliferation of HT-29 cells to different degrees, and the 37 ku extracellular protein exhibited a relatively strong inhibitory effect.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; extracellular protein; HT-29 colon cancer cells; inhibitory effect

收稿日期: 2015-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31071522)

作者简介: 贾彦 (1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事发酵生物技术的研发

通讯作者: 阎亚丽 (1960-), 女, 副教授, 主要从事食品生物技术的研发; 陈庆森 (1957-), 男, 教授, 主要从事生物活性物质与肠道健康, 蛋白(酶)资源研究开发的研究

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)的菌体细长杆状,为革兰氏阳性菌;分类地位为乳杆菌科、乳杆菌属;适宜生长温度为 35~38 °C,适宜 pH 值为 5.5~6.0,且具有较强的耐酸性,故生长繁殖环境不苛刻;代谢方面该菌可利用葡萄糖和果糖等多种糖类进行同型发酵,产生 DL 型乳酸;蛋白质分解能力弱^[1]。国内外众多的研究表明,*L. acidophilus* 具有耐胃酸和耐胆汁盐的能力,能够顺利通过人体胃肠道系统,实现对肠道发挥益生保健的功能^[2,3],主要表现具有改善和增强肠道内菌群多样性的作用,调控人体的免疫力,降低胆固醇的水平,缓解乳糖不耐症,同时也报道具有抑制肠道粘膜肿瘤细胞的生长的作用^[4,5],以及具有改善肠道微生态失衡以及生物拮抗作用^[6,7]。

目前,已有很多研究表明,益生菌分泌的化合物具有免疫调节作用,能够促进肠道稳态。冯美琴等^[8]研究发现植物乳杆菌 70810 分泌的胞外多糖-1 (EPS-1) 和胞外多糖-2 (EPS-2) 对体外培养的 HT-29 细胞的增殖均具有明显的抑制作用,随着胞外多糖浓度的增加,抑制率也逐渐增大,研究还显示胞外多糖-2 的抑制率明显高于胞外多糖-1。邢书函等^[9]研究发现藏灵菇中的干酪乳杆菌 KL1 分泌的胞外多糖,对人结肠癌细胞 HCT-8 的增殖抑制和诱导细胞凋亡作用。用 CCK-8 法检测细胞活力,结果表明胞外多糖能有效降低 HCT-8 的活力并抑制其增殖,且细胞生长抑制率呈时间-剂量依赖性。用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测细胞凋亡情况,表明胞外多糖处理组的阳性细胞明显高于对照组,由此判断胞外多糖可诱导 HCT-8 细胞凋亡的发生,从而抑制 HCT-8 细胞的增殖。Schlee 等^[10]研究嗜酸乳杆菌 PZ 1138、发酵乳杆菌 PZ 1162,干酪乳杆菌干酪亚种 LMGP-17806 分泌出的一种胞外蛋白,实验证明它可以诱导上皮细胞抗菌肽-h β D-2 的分泌。产生 h β D-2 的过程是由 NF- κ B 和 AP-1 诱导发生的,并有多数激酶参与,包括 MAPKs, ERK, p38 和 JNK,最后造成 IL-8 的分泌量增加。近期有关植物乳杆菌 STp 肽的研究表明,该肽具有改变溃疡性结肠炎 (UC) 肠道树突状细胞的特性^[11]。

当今,有关益生菌分泌的胞外蛋白对维持人类胃肠道稳态和保护肠粘膜屏障究竟是以何种方式和免疫途径发挥作用,是一个非常重要的科学问题。本研究以 *L. acidophilus* 作为研究对象,固体培养 *L. acidophilus*,并分离纯化其表达的胞外蛋白;初步探讨分泌的胞外蛋白对结直肠癌细胞的抑制功效,为人类更科学地利用益生菌资源奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料与试剂

菌种:嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* CICC6005)购自中国工业微生物菌种保藏中心;细胞:人类结肠癌 HT-29 细胞,购自江苏齐氏生物科技有限公司;自配改良番茄汁琼脂(TJA)培养基(g/L):将新鲜番茄洗净,切碎(勿捣碎),置 4 °C 冰箱 8~12 h 至有上清液析出,纱布过滤即成,取上述番茄汁 50 mL,酵母粉 5 g,牛肉浸膏 10 g,乳糖 20 g,葡萄糖 2 g,吐温 80 1 mL,醋酸钠 5 g,琼脂粉 15 g,水加至 1000 mL, pH 6.8 \pm 0.2,高压灭菌 121 °C, 20 min;结肠癌 HT-29 细胞生长培养基:10 mL 胎牛血清和 90 mL 改良型 RPMI-1640 培养基混匀;细胞冻存液:5 mL 胎牛血清、改良型 4 mL RPMI-1640 培养基和 1 mL 10% DMSO 混匀;5% SDS-PAGE 浓缩胶(5 mL);30% 丙烯酰胺(0.85 mL)、1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8, 1.25 mL)、10% SDS (0.05 mL)、10% 过硫酸铵(0.05 mL)、TEMED (0.004 mL)、双蒸水(2.85 mL);12% SDS-PAGE 分离胶(10 mL);30% 丙烯酰胺(4.0 mL)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8, 2.5 mL)、10% SDS (0.1 mL)、10% 过硫酸铵(0.1 mL)、TEMED (0.008 mL)、双蒸水(3.3 mL);噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、Sephadex G-100 葡聚糖凝胶,均购自北京索莱宝科技有限公司;考马斯亮蓝 G-250, Sigma 公司;SIGMA-ALDRICH 蛋白定量试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

3K15 高速冷冻离心机, Sigma 公司;HD-5 电脑紫外检测仪,上海沪西分析仪器有限公司;BS-100A 自动部分收集器,上海沪西分析仪器有限公司;BT-100 恒流泵,上海沪西分析仪器有限公司;紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Thermo 酶标仪 (MuLiskan MK3), Thermo 公司;CO₂ 培养箱 (HERAcell 240i), Thermo 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 *L. acidophilus* 的活化和培养

挑取保藏斜面菌种接入液体改良的 TJA 培养基中,37 °C 条件下培养 24 h,得活化 *L. acidophilus*。将已活化的 *L. acidophilus* 按 1.5% 接种量涂布于改良的 TJA 培养基中,37 °C 静止厌氧培养 48 h。

1.2.2 *L. acidophilus* 胞外蛋白的粗提取

按 1.2.1 方法培养后,刮下 *L. acidophilus* 菌苔,将菌苔转移至灭菌的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液

(pH=7.2~7.4),用漩涡振荡器充分振荡;在室温条件下10000 r/min,离心10 min,收集上清液。重复洗涤一次,合并上清液,备用。

1.2.3 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析

(1) 凝胶的预处理:称取15 g Sephadex G-100 葡聚糖凝胶加入到盛有适量蒸馏水的烧杯中,并按照说明书进行预处理。

(2) 装柱:将自制的、洁净的层析柱($\Phi 1.6\text{ cm}\times 50\text{ cm}$)垂直固定在铁架台上,关闭出口,向柱内加入1/5高度的PBS,将溶胀好的凝胶搅拌成稀浆状,慢慢倒入柱内,使其自然沉降,待凝胶自然沉降2~3 cm后,打开柱的出口,调整合适的流速,使凝胶继续沉降,如此重复操作,得到一个连续均匀的柱床。装柱后用2~3个柱床体积的pH=7.2~7.4的0.05 mol/L磷酸盐缓冲液冲洗平衡柱子。

(3) 样品的预处理:取2.5 mL *L. acidophilus* 胞外蛋白粗提液,10000 r/min,低温离心10 min后,过0.22 μm 的滤膜。

(4) 上样及洗脱:首先紫外检测器选择波长280 nm、预热稳定、选择灵敏度0.5 A、基线变得平稳且调零后方可上样;然后,将粗蛋白液体经过透析脱盐,浓缩处理后,作为胞外蛋白进一步纯化的上样液,每次上样2 mL,上样完毕后用缓冲液以1 mL/min的速度洗脱,自动收集装置每3 min收集一管,合并相同组分管,以备胞外蛋白组分的鉴定。

1.2.4 Bradford 法测各组分组胞外蛋白含量

按《SIGMA-ALDRICH 蛋白定量试剂盒-快速》安全技术说明书进行操作,制作标准蛋白含量的标准曲线。样品蛋白含量的测定:准确移取0.5 mL的蛋白溶液置于试管中,然后再分别加入5.0 mL考马斯亮蓝G-250试剂,在室温下反应2 min,以PBS溶液作为空白对照,于595 nm波长处测定样品的吸光度。

改良的TJA固体培养基培养*L.acidophilus*

刮下菌苔,转移至PBS,充分振荡

离心,取上清

粗提液除盐,浓缩

凝胶过滤层析(Sephadex G-100)

纯化的*L.acidophilus*胞外蛋白

SDS-PAGE 电泳鉴定

图1 嗜酸乳杆菌胞外蛋白分离提取的技术路线

Fig.1 Schematic representation of the extraction and separation of the extracellular proteins of *Lactobacillus acidophilus*

1.2.5 SDS-PAGE 测定分离各组分的分子量

参考文献^[12]。

1.2.6 *L. acidophilus* 胞外蛋白分离纯化的技术路线

按照本研究所采用的方法,确定了*L. acidophilus* 胞外蛋白分离提取的技术方法,如图1。

1.2.7 MTT 法检测 *L. acidophilus* 胞外蛋白对 HT-29 细胞增殖的影响

1.2.7.1 人类结肠癌 HT-29 细胞的复苏、传代和冻存

参考文献^[13]和江苏齐氏生物科技有限公司提供的培养方法进行的操作,最后转移至液氮中保存。

1.2.7.2 MTT 法检测 *L. acidophilus* 分泌胞外蛋白对 HT-29 细胞增殖的影响

(1) 试验分组:将 HT-29 结肠癌细胞培养至生长对数期,随后试验分成4组,即空白组(仅含完全培养基)、对照组(只有 HT-29 细胞)、37 ku 胞外蛋白组(HT-29 细胞+37 ku 胞外蛋白)、67 ku 胞外蛋白组(HT-29 细胞+67 ku 胞外蛋白)。将 *L. acidophilus* 分离纯化的两种胞外蛋白设定不同浓度作用于 HT-29 细胞,67 ku 胞外蛋白组和37 ku 胞外蛋白组均设定剂量为0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 4个浓度组。根据 Mosmann^[14]的噻唑蓝(MTT)方法检测不同浓度的胞外蛋白在不同时间段(12 h、24 h、48 h 和 72 h)对 HT-29 细胞生长的抑制率。

(2) 将 HT-29 细胞稀释到10000 cells/孔,并接种到96孔板中,每孔100 μL 置于培养箱中37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养。

(3) 培养12 h后,细胞贴壁,吸弃培养液。将胞外蛋白用完全培养基配成不同浓度溶液,分别加到对应的孔中,每组6个复孔。

(4) 在培养箱中培养后,每孔中加入20 μL MTT 溶液,放于培养箱中孵育4 h。

(5) 吸弃孔中液体,每孔中加入100 μL 二甲基亚砜(DMSO),在振荡器上震荡5~10 min,溶解解晶体,在490 nm下测定吸光度值。计算抑制率。

(6) 抑制率计算:抑制率(IR%)=(1-加药组 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值/对照组 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值) $\times 100\%$

1.2.8 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行分析处理,进行单因素方差分析和 LSD 多重比较,处理结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,定义($p<0.05$)为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 嗜酸乳杆菌胞外蛋白的提取研究

2.1.1 嗜酸乳杆菌胞外蛋白提取与 Sephadex G-100 凝胶层析结果

按照 1.2.5 方法获得 *L. acidophilus* 胞外蛋白粗提液、除盐与浓缩后,依 1.2.3 凝胶层析方法对处理后的上清液进行分离,全部凝胶层析的洗脱过程共约 2.5 h。根据紫外检测仪检测洗脱液紫外吸收能力的强弱,可以看到层析图谱上分为两个明显的洗脱峰(如图 2 所示),命名为 A 峰与 B 峰,分别收集两个的液体,按照 1.2.4 方法测得其蛋白浓度分别为 0.021 mg/mL、0.066 mg/mL。

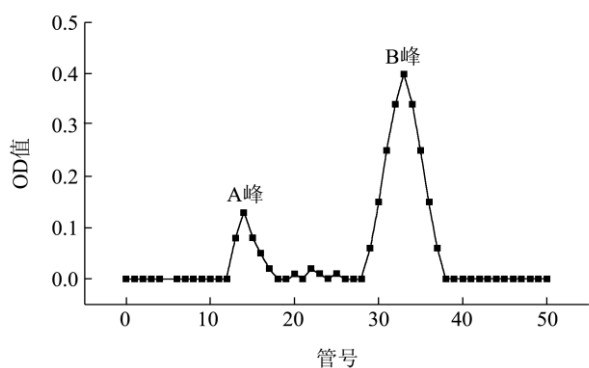


图 2 嗜酸乳杆菌胞外蛋白的凝胶层析图谱

Fig.2 Gel filtration elution profile of the extracellular proteins of *Lactobacillus acidophilus*

2.1.2 SDS-PAGE 测胞外蛋白分子量

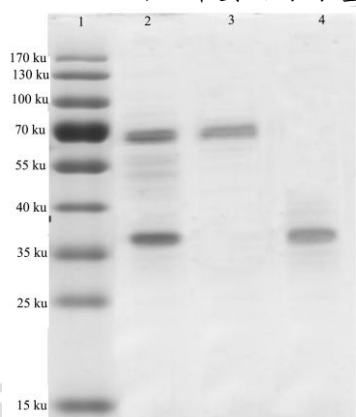


图 3 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis result

注: 1, Marker; 2, 胞外蛋白粗提液; 3, 经 Sephadex G-100

层析 A 峰; 4, 经 Sephadex G-100 层析 B 峰。

分别对胞外蛋白粗提液及两组胞外蛋白组分进行 SDS-PAGE 电泳分析,判断粗提液及两组胞外蛋白组分分子量大小,结果如图 3 所示。

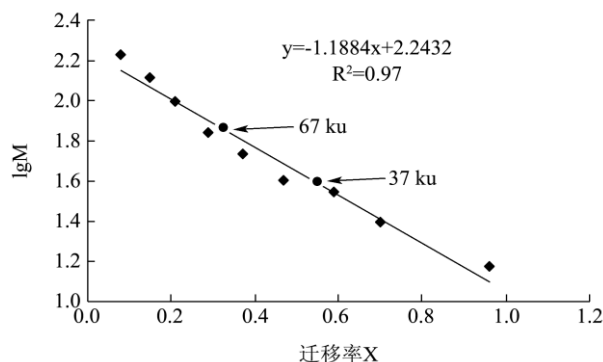


图 4 蛋白质相对分子量的对数与其迁移率的标准曲线

Fig.4 Standard curve of the logarithm of protein relative molecular weight and its mobility ratio

以蛋白质 Marker 中各蛋白迁移率 X 作为横坐标,以相应分子量对数为纵坐标作图,得到一条标准曲线,如图 4。根据图 4 得到蛋白质相对分子量与迁移率的关系方程为: $\lg M = -1.188X + 2.243$ 。由此可以计算 *L. acidophilus* 胞外蛋白的分子量。研究结果表明,图 3 中是胞外蛋白粗提液经 Sephadex G-100 凝胶层析后鉴定获得的电泳谱带。得到两个胞外蛋白,经 SDS-PAGE 测定其分子量,确定 A 峰胞外蛋白组分的分子量为 67 ku, B 峰胞外蛋白组分的分子量为 37 ku。

按照 *L. acidophilus* 胞外蛋白分离纯化的技术路线获得的胞外蛋白的各组分(67 ku 和 37 ku)分别进行浓缩,放入冰箱-20 °C 保存,备用。

2.2 MTT 法检测嗜酸乳杆菌胞外蛋白对 HT-29 细胞增殖的作用

依据 1.2.7.2 的研究方法,检测 *L. acidophilus* 分泌胞外蛋白对 HT-29 细胞增殖的作用,研究结果见表 1 和表 2。

表 1 67 ku 胞外蛋白对 HT-29 细胞抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of 67 ku extracellular protein on HT-29 cells

67 ku 胞外蛋白浓度/($\mu\text{g/mL}$)	细胞生长抑制率/%			
	12 h	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0	0
0.001	5.47 \pm 1.77**	7.61 \pm 2.17**	13.39 \pm 2.20**	13.43 \pm 0.96**
0.01	8.74 \pm 1.29*** ⁺	13.20 \pm 3.20*** ⁺	21.16 \pm 1.81*** ⁺	23.61 \pm 0.63*** ⁺
0.1	12.04 \pm 1.77*** ⁺ Δ	18.60 \pm 2.49*** ⁺ Δ	29.23 \pm 1.78*** ⁺ Δ	31.08 \pm 0.97*** ⁺ Δ
1	14.67 \pm 1.89*** ⁺ Δ ▲	23.28 \pm 3.05*** ⁺ Δ ▲	38.41 \pm 1.94*** ⁺ Δ ▲	37.12 \pm 0.78*** ⁺ Δ ▲

注: 0 $\mu\text{g/mL}$ 为对照组, **表示与对照组比较 $p < 0.01$; +表示与 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($p < 0.05$); Δ 表示与 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($p < 0.05$); \blacktriangle 表示与 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($p < 0.05$)。

由表 1 的结果可以看出, 不同浓度 (0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$) 67 ku 胞外蛋白作用于 HT-29 细胞 12、24、48 和 72 h 后, *L. acidophilus* 分泌的 67 ku 胞外蛋白对 HT-29 细胞的生长呈现明显的剂量依赖关系和时间依赖效应, 并且 67 ku 胞外蛋白不同浓度处理后细胞生长抑制率与对照组相比均有极显著性差异 ($p < 0.01$)。从蛋白浓度因素看, 应用 LSD 法进行多重比较分析显示, 不同作用浓度两两比较均有显著性差异 ($p < 0.05$); 从作用时间因素看, 应

用 LSD 法进行多重比较显示, 浓度为 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 时, 12 h 与 24 h 的抑制率之间无显著性差异 ($p > 0.05$), 48 h 与 72 h 各组浓度均无显著性差异 ($p > 0.05$)。因此, 若进一步评价 *L. acidophilus* 分泌的 67 ku 胞外蛋白对 HT-29 细胞相关免疫信号通路的研究, 选择 48 h 为作用时间。其它各组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$), 在浓度 1 $\mu\text{g/mL}$ 作用 48 h 的条件下, 胞外蛋白对 HT-29 细胞生长的抑制率最高为 38.41%。

表 2 37 ku 胞外蛋白对 HT-29 细胞抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of 37 ku extracellular protein on HT-29 cells

37 ku 胞外蛋白 浓度/ $\mu\text{g/mL}$	细胞生长抑制率/%			
	12 h	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0	0
0.001	7.56 \pm 1.17**	11.97 \pm 1.74**	18.26 \pm 1.52**	16.78 \pm 1.79**
0.01	10.50 \pm 1.43***+	17.70 \pm 1.16***+	30.00 \pm 1.25***+	31.60 \pm 1.68***+
0.1 L	13.90 \pm 1.67*** Δ	21.97 \pm 1.48*** Δ	38.00 \pm 1.01*** Δ	37.20 \pm 1.31*** Δ
1	17.36 \pm 1.51*** Δ \blacktriangle	24.87 \pm 1.74*** Δ \blacktriangle	45.06 \pm 1.58*** Δ \blacktriangle	42.87 \pm 1.98*** Δ \blacktriangle

注: 0 $\mu\text{g/mL}$ 为对照组, **表示与对照组比较 $p < 0.01$; +表示与 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($p < 0.05$); Δ 表示与 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($p < 0.05$); \blacktriangle 表示与 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($p < 0.05$)。

不同浓度 (0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 $\mu\text{g/mL}$) 37 ku 胞外蛋白作用于 HT-29 细胞 12、24、48 和 72 h 后的细胞增殖抑制率如表 2 所示, 37 ku 胞外蛋白对 HT-29 细胞的生长抑制率与 67 ku 胞外蛋白对 HT-29 细胞的作用基本相似, 仅是细胞生长抑制率更显著, 即 37 ku 胞外蛋白浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 作用 48 h, 对 HT-29 细胞的生长抑制率达到 45.06%。

3 讨论

嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 是人体肠道中的重要微生物, 能改善和调节肠道微生物菌群的平衡^[15], 调控机体免疫系统, 促进肠道屏障因子的表达水平, 改善营养物质的加工和吸收以及抑制肿瘤细胞的形成等^[16,17], 起到健康促进效果。益生菌的胞外蛋白可以参与调节肠粘膜的免疫机制, 包括与宿主免疫系统的作用、调节黏膜屏障功能等^[18], 通过这些机制可以促进肠道稳态。胞外蛋白可以作为功能性蛋白用于肠道疾病的生物免疫治疗, 为解决肠道疾病等常见及难愈疾病提供了一条新的和有效的途径。长期以来, 人们认为益生菌“通常比较安全”, 但从治疗作用考虑而选择的益生菌株通常对肠上皮细胞具有较好的黏附能力, 而这一特性也增加了肠道细菌移位的风险, 严重时会导致自发性细菌性腹膜炎, 内毒素血症, 肝肾综

合征等疾病。因此, 开展益生菌胞外蛋白的研究与开发, 阐述其对结肠癌等相关疾病的防治具有科学价值^[19]。

本研究采用固态培养的方法获取 *L. acidophilus* 分泌的胞外蛋白。研究筛选了对分离提取胞外蛋白干扰最小的培养基 (改良番茄汁琼脂 (TJA)) 培养 *L. acidophilus*, 培养获得的菌泥直接转移至灭菌的磷酸盐缓冲液, 选择离心力去沉淀, 收集上清液, 以便实现杂蛋白的污染达到最低的水平。我们经过探索采用 Sephadex G-100 作为胞外蛋白的分离介质, 同时通过预实验对凝胶层析柱的规格进行了反复摸索, 最终确定 Sephadex G-100 凝胶层析分离 *L. acidophilus* 的胞外蛋白的条件为: 柱子规格为: $\Phi 1.6 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$, 柱体积约为 100 mL; 洗脱液: pH=7.2~7.4 的 0.05 mol/L 磷酸盐溶液; 上样量: 2 mL; 速度洗脱: 1 mL/min。该分离纯化的条件对胞外蛋白实现了较好的分离。经过 Sephadex G-100 凝胶层析分离和 SDS-PAGE 电泳的分析鉴定, 证实两种胞外蛋白组分的分子量分别为 67 ku 和 37 ku, 其蛋白含量分别为 0.021 mg/mL 和 0.067 mg/mL。

研究表明, MTT 法检测结果的准确性受铺板细胞的数量、MTT 的用量及显色时间等因素的影响^[20]。细胞的数量过少, 其差异性难以表现, 而细胞的数量过

多, 则可能由于细胞生长过密而发生生长停滞或造成的光吸收饱和, 出现误差。通过预实验发现 HT-29 细胞的最佳接种量为 10000 个/孔, 同时严格控制 MTT 的用量和显色时间等因素, 排除对测定结果的影响。本研究通过采用 MTT 方法分析 *L. acidophilus* 两种胞外蛋白对 HT-29 细胞的增殖抑制作用, 结果提示两种胞外蛋白对 HT-29 细胞的生长呈现明显的剂量依赖关系和时间依赖效应。67 ku 和 37 ku 胞外蛋白的浓度均在 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的作用剂量, 作用 48 h 的条件下对 HT-29 细胞的生长抑制率分别达到 38.41% 和 45.06%, 从抑制强度分析 37 ku 优于 67 ku 的作用效果。分析该研究结果可能原因有: (1) 分子量较小的蛋白与 HT-29 细胞表面的受体的亲和力更高, 37 ku 的胞外蛋白能够通过应激细胞内相关信号通路途径中某些关键蛋白的表达及修饰, 从而发生对 HT-29 细胞更明显的抑制作用^[21]。(2) 37 ku 的胞外蛋白是通过调控细胞周期的关键蛋白, 从而影响肿瘤细胞生长、增殖或阻止肿瘤细胞周期 G1/S 的进程。由此可以推断, *L. acidophilus* 分泌的两种胞外蛋白均可通过抑制细胞增殖或相关信号通路途径关键蛋白修饰控制人类结肠癌 HT-29 细胞的发生和发展, 显然其作用的机理尚需进一步研究探讨。

4 结论

目前国内外对益生菌胞外蛋白探索和研究较少, 本研究以 *L. acidophilus* 为研究对象, 经固态培养和 SephadexG-100 凝胶层析分离后, 获得分子量分别为 37 ku、67 ku 的两种胞外蛋白组分。这两种蛋白对 HT-29 细胞均具有不同程度的生长抑制的作用, 其中 37 ku 的胞外蛋白的抑制作用较强, 接近 50% 抑制率。从而推断出, *L. acidophilus* 分泌的胞外蛋白具有抑制 HT-29 结肠癌细胞生长的作用。

参考文献

- [1] 肖仔君, 陈惠音, 杨汝德. 嗜酸乳杆菌及其应用研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2007, 8(11): 90-92
XIAO Zi-jun, CHEN Hui-yin, YANG Ru-de. The research and development of *Lactobacillus acidophilus* [J]. Science and Technology of Guangzhou Food Industry, 2007, 8(11): 90-92
- [2] 林超, 王伟, 陈雪, 等. 含嗜酸乳杆菌的新鲜干酪的研制[J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 122-126
LIN Chao, WANG Wei, CHEN Xue, et al. The development of fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(1): 122-126
- [3] 苏安分. 嗜酸乳杆菌活菌制剂开发研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011
SU An-fen. Research and development of *L. acidophilus* viable preparations [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011
- [4] Singhi S C, Baranwal A. Probiotic use in the critically ill [J]. Indian J. Pediatr, 2008, 75(6): 621-627
- [5] Mattila T, Sandholm P, Myllrinen R, et al. Technological challenges for future probiotic foods [J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2): 173-182
- [6] 武岩峰, 张晓磊, 张予心, 等. 益生菌通过调整正常菌群缓解酒精性肝损伤的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1-6
WU Yan-feng, ZHANG Xiao-lei, ZHANG Yu-xin, et al. Ameliorating alcoholic liver injury by adjusting intestinal flora with probiotics [J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1-6
- [7] 杨菲, 王济, 王琦. 过敏性疾病与肠道菌群失调的相关性及对过敏体质研究的启示[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 509-514
YANG Fei, WANG Ji, WANG Qi. Allergic diseases and intestinal flora imbalance for allergic constitution research [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 38(8): 509-514
- [8] 冯美琴, 张琦, 玛依诺木图拉, 等. 植物乳杆菌胞外多糖的脱色及其体外抑瘤效应[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 107-111
FENG Mei-qin, ZHANG Qi, Mahinur Mutuvullad, et al. Decolorization and Anti-tumor Activity *in vitro* of Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810 [J]. Food Science, 2011, 32(21): 107-111
- [9] 邢书涵, 连正兴, 孙勇, 等. 藏灵菇源干酪乳杆菌 KL1 胞外多糖抑制人结肠癌细胞增殖的研究[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 284-288
XING Shu-han, LIAN Zheng-xing, SUN Yong, et al. Inhibitory effect of Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* strain KL1 from Tibetan Kefir on proliferation of human colon cancer cells [J]. Food Science, 2012, 33(7): 284-288
- [10] Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, et al. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin [J]. Infection and Immunity, 2007, 75: 2399-2407
- [11] Al-Hassi H O, Mann E R, Sanchez B, et al. Altered human gut dendritic cell properties in ulcerative colitis are reversed by *Lactobacillus plantarum* extracellular encrypted peptide

- STp [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(5): 1132-1143
- [12] 陈庆森,吴子健,庞广昌.实用生物化学实验指导[M].浙江大学出版社,2013
CHEN Qing-sen, WU Zi-jian, PANG Guang-chang. Practical biological chemical experiment instruction [M]. Zhejiang University Press, 2013
- [13] Gong J, Chen Q, Yan Y, et al. Effect of casein glycomacropeptide on subunit p65 of nuclear transcription factor- κ B in lipopolysaccharide-stimulated human colorectal tumor HT-29 cells [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2014, 3(2): 51-55
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63
- [15] Xiao S D, De Zhang Z, Lu H, et al. Multicenter, randomized, controlled trial of heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB in patients with chronic diarrhea [J]. *Advances in Therapy*, 2003, 20(5): 253-260
- [16] Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective [J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 88(S1): S89-S94
- [17] 吴亚丽,谢俊霞,卢楠,等.姜黄素对结肠癌细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用研究[J].现代食品科技,2014,30(4):74-79
WU Ya-li, XIE Jun-xia, LU Nan, et al. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma LOVO cells [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(4): 74-79
- [18] 任科雨,卢放根,吴小平,等.嗜酸乳杆菌对小鼠结肠炎的疗效及结肠黏膜转录因子表达的影响[J].世界华人消化杂志, 2009,17(22):2251-2258
REN Ke-yu, LU Fang-gen, WU Xiao-ping, et al. Clinical efficacy of *Lactobacillus acidophilus* against experiment murine colitis and effects on the expression of STAT1,T-bet and GATA3 [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2009, 17(22): 2251-2258
- [19] 刘齐,孙美玲,王鲁峰,等.益生菌的功能活性及其分子机理探究的研究进展[J].中国酿造, 2014,33(1):14-19
LIU Qi, SUN Mei-ling, WANG Lu-feng, et al. Research progress of probiotics functional activities and the mechanism of these functions in molecular level [J]. *China Brewing*, 2014, 33(1): 14-19
- [20] 黄艳,易阳艳.MTT 法检测纤维蛋白胶对人脂肪源干细胞增殖的影响[J].中国美容医学,2015,5:18
HUANG Yan, YI Yang-yan. MTT assay for the influence of fibrin glue on human adipose-derived stem cells proliferation [J]. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 2015, 5: 18
- [21] Sánchez B, Urdaci M C, Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions [J]. *Microbiology*, 2010, 156(11): 3232-3242