

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0284-03

## 双歧杆菌对小鼠黑素瘤 B16 细胞增殖和细胞周期的影响

### Inhibitory activity of *Bifidobacteria adolescentis* on growth and cell cycle of B16 cell

黄红莹<sup>1,2</sup>, 黄汉菊<sup>1\*</sup> (1. 华中科技大学 同济医学院 病原生物系, 武汉 430030; 2. 河南大学 细胞与分子免疫实验室, 河南 开封 475004)

**[摘要]** **目的:** 探讨双歧杆菌对小鼠恶性黑素瘤 B16 细胞的增殖及细胞周期的影响。**方法:** 用 MTT 比色法测定 B16 细胞活力, 用 H-E 染色法观察 B16 细胞形态, 用流式细胞术测定 B16 细胞周期。**结果:**  $1 \times 10^9$  cfu/ml 的双歧杆菌作用 B16 细胞 24 h 后, 细胞增殖抑制率为 36.69%;  $1 \times 10^8$  cfu/ml 的双歧杆菌作用 B16 细胞 72 h 后, 抑制率为 63.47%; 由此可见, 双歧杆菌对 B16 细胞具有显著的增殖抑制作用。经双歧杆菌处理后, B16 细胞核浆比例下降, 细胞变小, 核仁减少, 说明 B16 细胞胞质和细胞核都趋于成熟化; 经双歧杆菌处理后 B16 细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期 [对照组和处理组 G<sub>1</sub> 期细胞比例分别为 (41.22 ± 1.15)% 和 (67.25 ± 3.13)%], 但凋亡作用不明显 [处理组凋亡率为 (1.87 ± 0.04)%]。**结论:** 双歧杆菌通过影响细胞周期抑制 B16 细胞的生长。

**[关键词]** 双歧杆菌; B16 细胞; 细胞周期

**[中图分类号]** R730.54 **[文献标志码]** A

双歧杆菌是一种生理性有益菌, 其对人体的免疫增强作用早已为人们所熟知。目前的研究资料表明它还对多种肿瘤的发生与发展具有抑制作用<sup>[1-5]</sup>。恶性黑素瘤是一种好发于皮肤的高度恶性肿瘤, 发病率呈不断上升趋势, 其对放疗与化疗均不敏感, 这给晚期恶性黑素瘤的治疗带来一定的困难。鉴于双歧杆菌对黑素瘤细胞的影响还未见报道, 本实验观察了双歧杆菌对小鼠 B16 细胞的作用, 旨在寻找抗黑素瘤的生物制剂。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株、菌种和试剂

小鼠黑素瘤 B16 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所; 青春双歧杆菌购自河南省医科院; MTT、DMSO 和 PI 购自 Sigma 公司; RPMI 1640 培养液、胎牛血清为 TBD 公司产品。全自动酶标仪 (Thermo Wultiskan Ascent), 流式细胞仪 (FACS Calibur), 倒置显微镜 (Axioskop 2 plus)。

### 1.2 双歧杆菌的培养与计数

采用 PYG 培养液培养, pH 7.4 的 PBS 洗涤 3 次,  $1\ 500 \times g$  离心 15 min, 加 1 ml PBS 混匀, 85 °C 水浴 15 min, 细菌计数板计数。双歧杆菌数量为  $18 \times 10^{10}$  cfu/ml。

### 1.3 MTT 法检测双歧杆菌对 B16 细胞生长的抑制作用

取对数生长期的 B16 细胞, 用 0.25% 胰酶消化成单细胞悬液, 调整细胞密度, 接种 96 孔细胞培养

板, 细胞数为  $1 \times 10^4$ /孔, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中培养, 细胞贴壁后, 对照组加细胞培养液, 处理组加入不同数量的双歧杆菌 (分别为  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  cfu/ml), 设 3 个复孔; 继续培养 24 h; 每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中培养 4 h 后吸去培养液, 每孔加入 DMSO 150 μl, 于振荡器上振摇, 待蓝色晶体完全溶解后, 在酶标仪上测定 570 nm 处的光密度 (D) 值。实验重复 3 次, 取平均值, 计算 B16 细胞抑制率。

同在上在 96 孔板中加入 B16 细胞, 细胞数为  $5 \times 10^3$ /孔, 待细胞贴壁后, 对照组加细胞培养液, 处理组加入双歧杆菌, 数量为  $1 \times 10^8$  cfu/ml, 分别检测 12、24、36、48、60、72 h 各孔的光密度值, 计算 B16 细胞抑制率。抑制率 (%) = (对照组  $D_{570}$  - 处理组  $D_{570}$ ) / 对照  $D_{570} \times 100\%$

### 1.4 H-E 法检测双歧杆菌作用 B16 细胞后的形态变化

胰酶消化细胞, 调整细胞密度, 接种于内含玻片的 6 孔培养板中, 细胞数为  $2.5 \times 10^5$ /孔。每孔 3 ml, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h 后换液, 对照组加细胞培养液, 处理组加入  $1 \times 10^8$  cfu/ml 的双歧杆菌, 继续培养 24 h, 取出玻片, H-E 染色, 倒置显微镜下观察细胞形态的改变。

### 1.5 流式细胞术检测细胞周期

**[作者简介]** 黄红莹 (1964-), 女, 河南省开封市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: hanju.huang@Gmail.com

25 ml 培养瓶加 B16 细胞悬液 4 ml/瓶,细胞数为  $5 \times 10^5$ /瓶。于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中培养 12 h 后,处理组加入  $1 \times 10^8$  cfu/ml 的双歧杆菌,继续培养 24 h,收集细胞, pH 7.4 的 PBS 洗涤 3 次,  $800 \times g$  离心 8 min, 75% 冷乙醇  $4^\circ\text{C}$  固定。PI 避光染色 30 min, 流式细胞术分析细胞周期, 每个数据为  $1 \times 10^4$  个细胞的测定值。实验重复 3 次, 取平均值。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数间比较用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 双歧杆菌对 B16 细胞增殖的抑制作用

双歧杆菌具有抑制 B16 细胞增殖的作用, 不同剂量的双歧杆菌对 B16 细胞的抑制作用不同,  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$  cfu/ml 的双歧杆菌作用 B16 细胞后, 抑制率为 1.00% ~ 8.15%;  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  cfu/ml 的双歧杆菌作用 B16 细胞后, 抑制率为 31.33% ~ 36.69% (图 1)。但此范围内的双歧杆菌对 B16 细胞的抑制率并不随细菌数量的上升出现明显变化。

双歧杆菌对 B16 细胞的抑制随作用时间延长而增强,  $1 \times 10^8$  cfu/ml 的双歧杆菌作用 B16 细胞 12 h, 对 B16 细胞抑制率为 11.7%; 作用 72 h, 其抑制率升至 63.47% (图 2)。

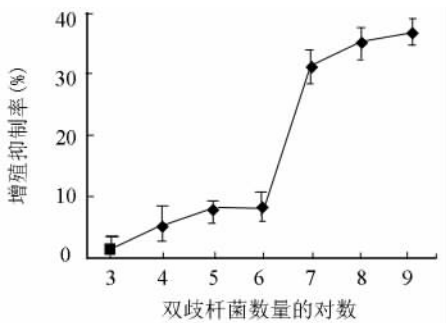


图 1 双歧杆菌对 B16 细胞增殖抑制的量-效关系

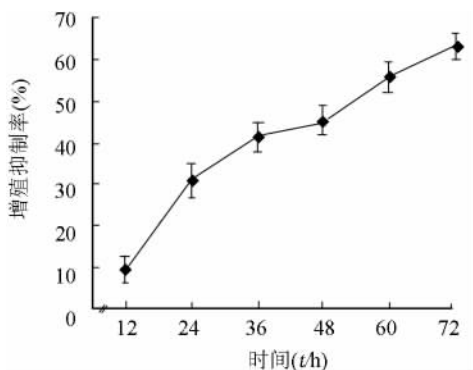


图 2 双歧杆菌对 B16 细胞增殖抑制的时-效关系

### 2.2 双歧杆菌对 B16 细胞形态的影响

双歧杆菌作用于 B16 细胞 24 h 后, 细胞形态出现了变化, 核浆比例下降, 细胞变小, 核仁减少; 而正常组则细胞较大, 折光性好, 细胞较圆, 大小均一, 形态一致 (图 3)。

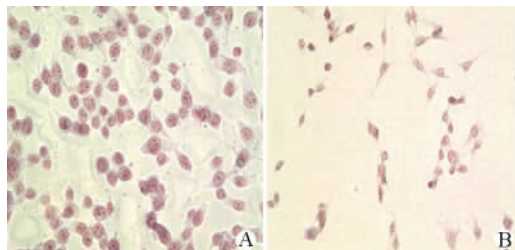


图 3 双歧杆菌作用致 B16 细胞形态的改变 ( $\times 400$ )

A: 对照组; B: 双歧杆菌组

### 2.3 双歧杆菌对 B16 细胞周期和凋亡的影响

对照组  $G_0/G_1$ 、S、 $G_2/M$  期细胞比例分别为  $(41.22 \pm 1.15)\%$ 、 $(53.23 \pm 2.72)\%$ 、 $(5.55 \pm 2.48)\%$ , 双歧杆菌处理组对应的细胞周期比例分别为  $(67.25 \pm 3.13)\%$ 、 $(21.66 \pm 2.18)\%$ 、 $(11.09 \pm 1.26)\%$ , 与正常组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。对照组和双歧杆菌处理组的凋亡率分别为  $(0.77 \pm 0.031)\%$  和  $(1.87 \pm 0.04)\%$ , 说明双歧杆菌对 B16 细胞的凋亡作用不明显 (图 4)。

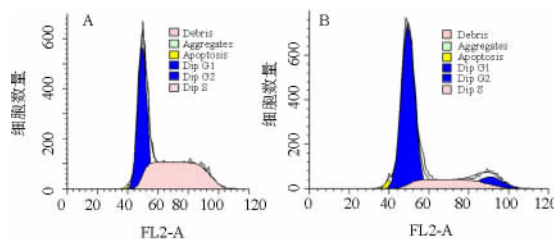


图 4 双歧杆菌作用后 B16 细胞周期的变化

A: 对照组; B: 双歧杆菌组

## 3 讨论

黑素瘤是恶性程度很高的肿瘤, 可循血液和淋巴转移至全身各器官黏膜, 其临床化疗效果很差, 有效率低于 25%。生物反应调节剂对多种恶性肿瘤具有明显的直接或间接的抗肿瘤活性, 与化疗药物具有协同作用或疗效相加作用, 两者联合应用在维持肿瘤患者的长期生存方面具有独到之处<sup>[6-7]</sup>。Kammula 等<sup>[8]</sup>报道应用白介素-2 治疗有转移的肿瘤患者 1 241 例, 其中恶性黑素瘤 653 例, 获完全缓解者缓解时间 60 ~ 146 个月, 不良反应可以耐受, 认为

选择适当的患者和适当的治疗方法,可有效延长生存时间。但 Atzpodien<sup>[9]</sup>、Kienstra等<sup>[10]</sup>报道未见这种情况,20个月的随访发现有半数患者肿瘤复发,故临床效果现在难以肯定。因此,寻找更为有效的肿瘤治疗生物制剂是目前研究的热点。双歧杆菌是一种G<sup>+</sup>专性厌氧菌,与梭状芽孢杆菌相比,它天然无致病性,也不形成芽孢,是一种寄居在人体及其他哺乳动物肠道内的正常菌群,理论上不存在安全隐患的问题。文献<sup>[1-3]</sup>报道双歧杆菌在体内具有抑制多种肿瘤的作用。但其对黑色素瘤的作用还未见报道。作者采用MTT显色法观察双歧杆菌对B16细胞的影响,结果发现经双歧杆菌处理后,B16细胞的生长增殖能力及细胞活力均受到明显抑制,并且其抑制作用随使用剂量的增大和作用时间的延长而明显增强,细菌数量达到 $1 \times 10^8$  cfu/ml、作用72 h后,其抑制率可达63.47%。

从形态学上观察双歧杆菌作用后细胞的改变,发现未经处理的B16细胞表现为细胞较大,透明,折光性好,细胞圆形,大小均一,形态一致。经 $1 \times 10^8$  cfu/ml的双歧杆菌处理后,表现为核浆比例下降,细胞变小,核仁减少;说明B16细胞胞浆和细胞核都趋于成熟化,双歧杆菌具有诱导B16细胞向成熟细胞分化的趋势。

细胞增殖是通过细胞周期的运行实现的,细胞周期调控是在各期的控制点上进行的。细胞周期中存在两个重要的调控G<sub>1</sub>/S和G<sub>2</sub>/M期调控点,只要G<sub>1</sub>期内的正调节因子累积达到一定程度,周期越过G<sub>1</sub>/S交界点以后,细胞就不再依赖于细胞外促生长因子而顺序完成整个细胞周期,因而G<sub>1</sub>/S调控点是影响细胞周期的关键。本实验应用流式细胞仪分析细胞周期,发现双歧杆菌能阻止B16细胞从G<sub>1</sub>期向S期的进展,造成G<sub>1</sub>期细胞堆积,阻止DNA合成和复制,起到抑制B16细胞增殖周期的作用,这可能是其抗肿瘤的机制之一。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] Leahy SC, Hiqqins DG, Fitzgerald GF, et al. Getting better with bifidobacteria [ J ]. Appl Microbiol, 2005, 98( 6 ): 1303-1315.
- [2] Le Leu RK, Brown IL, Hu Y, et al. A synbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon[ J ]. J Nutr, 2005, 135( 5 ): 996-1001.
- [3] 易成,郭志英,黄英,等. 婴儿双歧杆菌介导的CD/5-FC自杀基因系统对黑色素瘤的抑瘤实验[ J ]. 四川大学学报( 医学版 ), 2005, 36( 2 ): 165-168.
- [4] Li X, Fu GF, Fan YR, et al. *Bifidobacteria adolescent* as a delivery system endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth [ J ]. Cancer Gene Ther, 2003, 10( 2 ): 105-111.
- [5] Fugimori M, Amano J, Taniguchi S. The genus bifidobacteria for cancer-gene therapy [ J ]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2002, 5( 20 ): 200-203.
- [6] Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells[ J ]. Cancer Res, 2006, 66( 22 ): 10995-11004.
- [7] Jarvinen TA, Liu ET. Simultaneous amplification of HER-2 ( ERBB2 ) and topoisomerase IIalpha ( TOP2A ) genes-molecular basis for combination chemotherapy in cancer[ J ]. Curr Cancer Drug Targets, 2006, 6( 7 ): 579-602.
- [8] Kammula VS, White DE, Rosenberg SA. Trends in the safety of high dose bolus interleukin 2 administration in patients with metastatic cancer[ J ]. Cancer, 1998, 83( 4 ): 797-805.
- [9] Atzpodien J, Neuber K, Kamanabrou D, et al. Combination chemotherapy with or without s. c. IL-2 and IFN-alpha: results of a prospectively randomized trial of the Cooperative Advanced Malignant Melanoma Chemoimmunotherapy Group( ACIMM ) [ J ]. Br J Cancer, 2002, 86( 2 ): 179-184.
- [10] Kienstra MA, Padhya TA. Head and neck melanoma[ J ]. Cancer Control, 2005, 12( 4 ): 242-247.

[ 收稿日期 ] 2007-01-30

[ 修回日期 ] 2007-04-30

[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。(1)公历世纪、年代、年、月、日和时间、时刻必须使用阿拉伯数字,如20世纪90年代、2006-02-15、5 h、30 min、30 s、14:36:08等;年份不能用简称,“1998年”不能写作“98年”。(2)物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3)非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如3支、5根等。(4)数值范围的表达要求:5万至10万应写成5万~10万,不能写成5~10万; $3 \times 10^9$ 至 $5 \times 10^9$ 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ ,或 $(3 \sim 5) \times 10^9$ ,不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$ ;60%至70%不能写成60~70%,应写成60%~70%; $25.5 \pm 0.5$  mg应写成 $(25.5 \pm 0.5)$ mg。(5)带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如4 mm × 2 mm × 3 mm,不能写成 $4 \times 2 \times 3$  mm或 $4 \times 2 \times 3$  mm<sup>3</sup>。

(本刊编辑部)