

嗜酸乳杆菌 NCFM 粘附宿主后对其粘附相关基因表达的影响

韩琳琳^{1#}, 满朝新^{2#}, 吕学娜¹, 王明娜¹, 张光辉¹, 刘颖¹, 姜毓君^{1,2*}

东北农业大学,¹ 乳品科学教育部重点实验室,² 国家乳业工程技术研究中心, 哈尔滨 150030

摘要:【目的】益生菌粘附于肠道上皮细胞上是它的一种益生作用。本研究通过体内外实验,分析嗜酸乳杆菌 NCFM 对粘附相关基因的影响。【方法】利用 GO (Gene Ontolog) 分类筛选 Human Genome U133 Plus 2.0 Array 基因表达谱芯片中的粘附相关基因,通过体外 Caco-2 细胞培养模型和体内小鼠粘附模型,采用 Real-time PCR 方法对粘附相关基因进行验证分析。【结果】经 NCFM 作用后,12 个粘附相关基因呈上调表达。利用 Real-time PCR 验证,12 个基因在体内和体外经嗜酸乳杆菌 NCFM 作用后亦均同样为上调表达,其中 CCL2 基因上调表达最为明显。【结论】经体内外研究表明,嗜酸乳杆菌 NCFM 粘附肠上皮细胞后能够引起宿主粘附相关基因出现特定表达变化,为今后深入揭示其粘附作用提供必要基础。

关键词: 嗜酸乳杆菌 NCFM, Caco-2 细胞, 粘附, 基因表达

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)05-0609-06

嗜酸乳杆菌 NCFM (*Lactobacillus acidophilus* NCFM) 常作为益生菌应用于食品以及营养保健品中^[1],它能粘附于宿主肠道上皮细胞上,保证了其发挥益生功能^[2-3]。国内外的一些研究表明^[4-6],乳酸菌通过粘附素与肠黏膜上皮细胞受体粘附,维持肠道菌群平衡及发挥益生功能,对于维护胃肠道正常的生态环境稳定起重要作用。但是目前的研究重点大都放在不同菌体对肠组织的粘附作用或者菌体表面成分对粘附的影响方面,极少有人从细胞水平入手,研究乳酸菌粘附宿主细胞后诱导哪些宿主基因发生如何变化。基因芯片是近年发展起来的前沿生物杂交技术,它可同时对上万种基因的表达进行快速、准确、高效的检测,为乳酸菌整体调节机制的研究提供了全新的研究手段^[7]。因此,为更全面

的了解嗜酸乳杆菌 NCFM 作用 Caco-2 细胞后的粘附相关基因表达的情况,本研究在我们前期采用基因芯片技术分析宿主细胞表达谱变化的工作基础上^[8],通过体内和体外实验的验证,为深入揭示乳酸菌粘附机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞株:嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) NCFM 是由丹尼斯克公司 (Danisco) 惠赠。人结肠腺癌细胞 Caco-2 购自中国科学院上海生命科学研究所以。

1.1.2 基因芯片:Affymetrix 公司的 U133 Plus 2.0

基金项目:长江学者和创新团队发展计划 (IRT-0959-203); 国家科技支撑计划项目 (2009BADB9B06); 黑龙江省博士后科研启动资助金 (LBH-Q07023); 东北农业大学创新团队项目 (CXT007-3-2)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-451-55191842; E-mail: yujun_jiang@163.com

作者简介:[#]并列第一作者。韩琳琳 (1985 -), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物与生物技术, E-mail: 359603327@qq.com; 满朝新 (1978 -), 男, 黑龙江宾县人, 博士, 主要研究方向为乳品微生物, E-mail: manchaoxin@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-12-20; 修回日期: 2011-12-31

基因表达谱芯片,由上海生物芯片有限公司-生物芯片上海国家工程研究中心提供。Affymetrix 扫描仪扫描芯片后,用 GCOS1.2 软件读取、处理数据。差异基因筛选标准: $\log \text{ratio}$ (实验组和对照组比值取 \log_2 后的值) ≥ 1 为上调基因; $\log \text{ratio} \leq -1$ 为下调基因。

1.1.3 主要试剂和仪器: 特级胎牛血清、高糖 DMEM 培养基 (GIBCO 公司); Trizol Reagent (Invitrogen 公司); RNeasy Kit、RNeasy Total RNA Isolation Kit (QIAGEN 公司); ExScript™ RT-PCR Kit, SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司); Hybridization Oven 640 (Affymetrix 公司); ABI7500 实时荧光 PCR 仪 (ABI 公司); HF90 型 CO₂ 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 嗜酸乳杆菌 NCFM 粘附 Caco-2 细胞

参考 Meng 的方法^[9] 并做适当的修改,方法简述如下:嗜酸乳杆菌 NCFM 在 MRS 培养基中培养至对数生长期后,利用 DMEM 培养基调整菌浓度为 3×10^8 cfu/mL,与达到极化状态的 Caco-2 细胞在 37℃ 细胞培养箱中共孵育 2h,然后用磷酸盐缓冲液

PBS 冲洗 2 次。参用 Trizol RNA 提取方法抽提对照组(无嗜酸乳杆菌 NCFM 作用)和实验组(嗜酸乳杆菌 NCFM 作用)的 Caco-2 细胞总 RNA。

1.3 小鼠粘附模型

本实验采用清洁级昆明鼠 20 只 (20 ± 2 g),雌雄各半,清洁饲养,任意供水,自由采食。完全随机分 2 组,每组 10 只,分别为实验组(每天灌胃含 3×10^8 cfu/mL NCFM 的灭菌脱脂乳)和对照组(每天灌胃不含 NCFM 的灭菌脱脂乳)。灌胃 7 d 后,颈椎离断处死小鼠,采用 Trizol RNA 提取方法抽提小鼠肠组织 RNA。

1.4 Real-time PCR 验证体内体外粘附相关基因

1.4.1 引物: 通过 Gene Ontology (GO) 分类筛选出 Human Genome U133 Plus 2.0 Array 基因表达谱芯片中差异表达的粘附相关基因进行 Real-time PCR 实验验证。在 GenBank 中查找各基因序列,使用 Primer 5.0 软件对各差异表达基因进行跨内含子设计引物,见表 1。实验利用 GAPDH 作为内参基因,消除本底模板差异。

表 1 待测基因 Real-time PCR 引物的来源、碱基序列和扩增产物的大小

Table 1 Organism, base sequence and sizes of PCR products for target genes specific oligonucleotide primer

Organism	Gene symbol	Base sequence (5'→3')	Sizes of PCR products/bp
homo sapiens	ALACM	CATACCTTCCCGACTTGACC CTTGACTATTGTAGGTGCCTCAAAC	268
	APC	CTGGACAGATTGATTTATTAGACCG CTCCAGAACGGCTTGATACAGAT	138
	ARHGAP5	AAACTAAGAACTTCAATCCACCAACACG CGCTGACACGGTAGAGTCCTTCG	171
	CD2AP	AGACCAAGAAGCGTCAGTGATAA CTTGTTATTTCAGGGTCCACTCC	140
	DLG1	CATCCTACCACCATACCACAG TGCTGTTTCCAAGCTATCTGTGT	70
	DST	TCATCAGTCCTACCCTACG AGTTTCATAGATTTTACGAGGG	159
	ECM2	AAGTTATAATGTGTTACCAGGAAAGAA GAGACAGTAGCGGAGCAGACC	213
	ICAM1	ACCTATGGCAACGACTCCTTC CCTTCTGAGACCTCTGGCTTC	185
	ITGB8	CATTTTCATAGTTACATTCTTGATTGG CACGTCGGTAGGTGACTGCTC	176
	PCM1	CAAGATGCCAGTTCCAATGATA TGCTTTGGCTAAAGGACGATAA	147
	IL8	TCCAAACCTTTCCACCC AACTTCTCCACAACCCTCTG	155
	CCL2	CTCAGCCAGATGCAATCAATG AGATCACAGCTTCTTTGGGACAC	129
	GAPDH	AACGGATTTGGTCGTATTG GCTCCTGGAAGATGGTGAT	214

续表 1

Organism	Gene symbol	Base sequence (5'→3')	Sizes of PCR products/bp
mus musculus	ALACM	ATTCCAGAGCAGCATGA GACACCAGCAACGAGG	123
	APC	CAGGCGTGAATCCG CATTAGTAAGCCCATACATCT	272
	ARHGAP5	GACCTTCAACCCACC CTAACACGGTATAGTCCTT	162
	CD2AP	GAGAGACAGAACCCAAGG AGAACTTTACTGAGGCTT	172
	DLG1	TGCCCAGGATGGAAGATT CTTTTCACATACAATCGCACA	135
	DST	TTCTGTCTACGATACCACC ATCACCAAGTCAATGTC	279
	ECM2	TTTGTGATGAAACCGAGTG CTTTTATGGCTACTTGGTCC	162
	ICAM1	GCAGACGGAAGGCAGAT CCCACAATGACCAGCAGTA	199
	ITGB8	TTTAGACTGTATGCCTCCC CAGCAGCAATCTTTTAGC	199
	PCM1	TGGAAGGCGAAGAACAAG TTGAAGGGCTTTCGGTTT	210
	IL8	TGCTGTCCGAGGCTATG CACGTCCTGCACCCAC	212
	CCL2	CCAAAGAAGCTGTAGTT AGACCTTAGGGCAGAT	155
	GAPDH	GCCTGGAGAAACCTGCC ATACCAGGAAATGAGCTTGACA	200

1.4.2 反转录反应条件:37℃ 15 min;85℃ 5 s。
Real-time PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 34 s,循环 40 次;在 60℃ 退火 34 s 的过程中收集荧光值,并增加 60℃ 至 95℃ 的溶解曲线分析步骤。

1.5 统计分析

每个待测样品均进行 3 次重复实验,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因的相对表达量进行评价^[10]。所有的数据都是利用 SPSS 18.0 软件进行分析,采用单向方差分析法计算三次重复得到的相对定量的标准差。柱状图中的实验结果均用平均值 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 筛选嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共孵育后粘附差异表达基因

本研究所用的 Human Genome U133 Plus 2.0 Array 基因表达谱芯片覆盖了 47000 个转录本,代表 38500 个基因,基本代表了人类基因组的全部基因。通过该芯片杂交检测 NCFM 与 Caco-2 细胞共孵育

2h 后该细胞基因表达变化,发现 508 个表达差异基因,其中有 473 个基因表达上调,35 个基因表达下调。根据 GO 分类筛选,将差异表达基因分为 24 类。其中,涉及到生物粘附的基因为 12 个(筛选到的可能涉及生物粘附的基因总结于表 2),包括 ARHGAP5、ALCAM、PCM1、ICAM-1、IL-8、APC、CD2AP、DST、ECM2、CCL2、ITGB8、DLG1,此 12 个基因均表达上调。说明这些基因在 NCFM 与 Caco-2 的粘附过程中均起到一定作用。

2.2 Real-time PCR 验证

为了验证芯片结果的可靠性和准确性,相同实验条件下将 NCFM 与 Caco-2 细胞共孵育 2h 后,采用 SYBR Real-time PCR 方法对基因芯片实验结果中涉及生物粘附且差异表达的 12 个基因进行检测。同时为了更真实的模拟 NCFM 作用人肠组织后粘附相关基因的表达情况,对小鼠灌服 NCFM 后提取肠组织 RNA,以 SYBR Real-time PCR 方法检测该 12 个基因的相对表达量,与基因芯片结果进行比较,确定其是否与体外实验结果相符合。为了确定 SYBR Real-time PCR 扩增出的条带是否符合预期大小以

表 2 筛选到的可能涉及粘附调节的基因

Table 2 Probable genes related to adhesion

Gene symbol	Gene title	RefSeq ID	Ratio
ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	1552627_a_at	1.1 ↑
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	201951_at	1.4 ↑
PCM1	pericentriolar material 1	202174_s_at	1.1 ↑
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	202638_s_at	1.1 ↑
IL-8	interleukin 8	202859_x_at	1.2 ↑
APC	adenomatous polyposis coli	203525_s_at	1.4 ↑
CD2AP	CD2-associated protein	203593_at	1 ↑
DST	dystonin	204455_at	1 ↑
ECM2	extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific	206101_at	1 ↑
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	216598_s_at	2.6 ↑
ITGB8	integrin, beta 8	226189_at	1 ↑
DLG1	Discs, large homolog 1 (Drosophila)	230229_at	1 ↑

↑ denotes up-regulated expression; ↓ denotes down-regulated expression.

及是否存在引物二聚体和非特异性扩增等现象,利用核酸电泳对 SYBR Real-time PCR 扩增的条带进行验证(图 1)。从图 1 中可以看出,各基因的扩增条带单一,无杂带出现,证明无引物二聚体和非特异性扩增,且条带大小也与预期相吻合,说明扩增效果较好,准确可信。

体内外实验的 SYBR Real-time PCR 方法均以 GAPDH 内参基因的扩增曲线 Ct 值来消除本底模板差异,并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因的相对表达量进行分析,以量化该基因受嗜酸乳杆菌 NCFM 作用后的 mRNA 表达水平变化。图 2-A 是嗜酸乳杆菌 NCFM 作用 Caco-2 细胞后各粘附相关基因相对表达量变化与基因芯片结果的比较,从中可以看出在体外实验条件下,Real-time PCR 方法得到的结果与

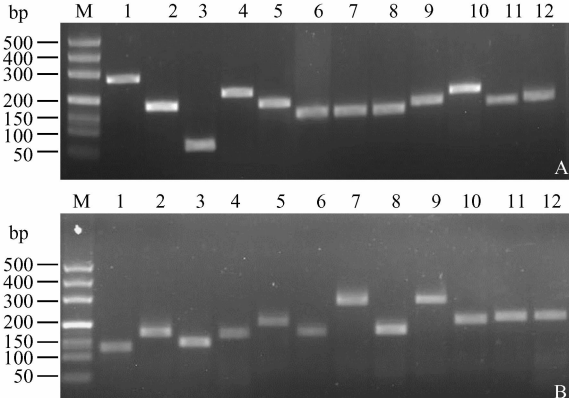


图 1 电泳验证 Real-time PCR 扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis verified the results of Real-time PCR amplification. A denotes in vitro; B denotes in vivo; M denotes maker DM500; 1-12 respectively denotes ALCAM, ARHGAP5, DLG1, ECM2, ITGB8, CCL2, APC, CD2AP, DST, ICAM-1, PCM1, IL-8.

相应基因芯片分析结果基本一致,从而验证了基因芯片分析结果的准确性和可靠性。图 2-B 是灌胃 7 天的小鼠肠组织中粘附相关基因相对表达量变化与基因芯片结果的比较,可以看出 12 个基因均表达上调,也与基因芯片结果基本一致。通过体内和体外实验均可以看出,这些基因确实都参与了嗜酸乳杆菌 NCFM 粘附肠组织的过程,发挥了重要作用,其自身的表达量也发生了相应的变化。

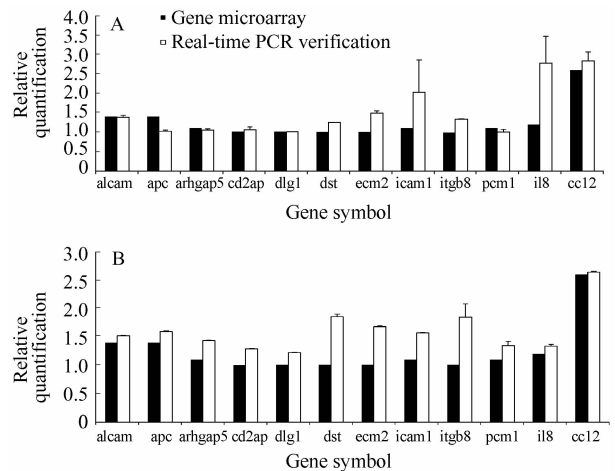


图 2 粘附相关基因的相对定量结果

Fig. 2 The relativity quality of genes according to adhesion. A denotes Real-time PCR verification in vitro; B denotes Real-time PCR verification in vivo.

3 讨论

利用基因芯片技术研究乳酸菌和宿主之间的相互作用已经成为近期的研究热点之一,它可以对大

量的遗传信息进行快速、高通量的检测。本研究利用基因芯片筛选出 12 个与粘附相关的基因,这些基因参与了细胞与其他细胞或细胞外基质的粘附作用。在宿主细胞中存在一些粘附相关的分子家族,如整合素家族、免疫球蛋白超家族、选择素家族、粘蛋白样血管地址素、钙黏着素或钙离子依赖的细胞粘附分子家族等,上述 12 个基因中的 ITGB8 是整合素家族 $\beta 8$ 组, ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) 则属于免疫球蛋白超家族,而 ICAM-1 既是整合素家族中白细胞粘附受体组 ($\beta 2$ 组) LFA-1 的配体,又同时属于免疫球蛋白超家族^[11],其他基因都是钙离子依赖或与整合素家族相互作用的细胞粘附分子。从体内和体外实验的结果可以看出,12 个粘附相关基因不同程度的上调表达,其中,关注较多的是 ALCAM,又称为 CD166 和 MEMD,属于免疫球蛋白超家族的成员,是淋巴细胞抗原 CD6 的配基。ALCAM 可同型之间结合(同嗜性粘附),也可与 CD6 和 NgCAM 等蛋白结合(异嗜性粘附)^[12]。

尽管有许多学者都采用了体外模型研究乳杆菌粘附肠上皮细胞,但极少有人会利用体内模型进行研究^[13]。虽然体外培养的 Caco-2 细胞极化后可以维持细胞极性如微绒毛和紧密连接等的重要作用,但是无法反映体内情况下整个肠道中的通路以及生物效应,所以为了更加真实的模拟益生菌粘附人肠道过程中引起的粘附相关基因的变化,我们采用小鼠体内模型并应用 Real-time PCR 技术验证基因的差异表达,发现小鼠灌胃 7 天后基因的差异表达与基因芯片的变化趋势也基本一致,说明这些基因确实参与了菌体与宿主细胞粘附过程。

但是无论是体内实验还是体外实验,Real-time PCR 方法的结果都不能与基因芯片的表达变化量完全吻合的,其原因可能包括以下三方面:第一,是来自表达谱基因芯片本身的误差,即生物学误差和实验系统误差,生物学误差主要指样本差异,其误差很难统计;而实验系统误差也是不可消除的,因此导致芯片结果不能精确定量。第二,基因芯片和 Real-time PCR 方法检测角度不同,Real-time PCR 检测是目的基因扩增后实时监测荧光信号的累积,而基因芯片是利用反向杂交的方法进行检测,这两种方法依据的基本原理不同可能会导致检测结果的差异;第三是由于目前基因芯片检测需要大型的仪器设

备,而且其费用较高,极大地限制了样品的生物学重复和技术重复。以上这些因素都可能造成两种方法在测定结果上的差异。尽管两种方法得到的结果存在一定的出入,但是都证实了 12 个粘附相关基因在体内和体外表达上调。然而,由于机体的整个通路和生物学效应是复杂的,所以各个基因之间的表达是相互影响和制约的,例如, CCL2 (即趋化因子 CC 亚家族配体 2) 即参与粘附过程也参与免疫调节^[14],这也许是其相对表达量较高的重要原因。

益生菌与肠上皮细胞的粘附过程是一个复杂的过程,受到许多因素的影响。单从筛选到的粘附相关基因的差异表达变化还不能阐明整个粘附机制,还需要系统深入的研究,相信通过我们的研究可以为进一步揭示益生菌的粘附机制提供重要的线索和依据。

参考文献

- [1] Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(2):319-331.
- [2] Goh YJ, Klaenhammer TR. Functional Roles of Aggregation-Promoting-Like Factor in Stress Tolerance and Adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15):5005-5012.
- [3] Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12):8344-8351.
- [4] 张灼阳,刘畅,郭晓奎. 益生菌的安全性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(2):257-261.
- [5] Kimoto NH, Suzuki C, Kobayashi M, Sasaki K, Mizumachi K. Inhibition of leukotriene B₄ production in murine macrophages by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129(3):321-324.
- [6] 郭兴华. 益生菌健康与临床. 北京:科学技术出版社, 2002:36.
- [7] Chao A, Wang TH, Lai CH. Overview of microarray analysis of gene expression and its applications to cervical cancer investigation. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 2007, 46(4):363-373.
- [8] 王明娜,张光辉,韩希妍,姚丽燕,周艳秋,姜毓君. 嗜酸乳杆菌 NCFM 细胞基因表达谱的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(9):1247-1252.

- [9] Meng TT, Stephen EG, Beatrice R, Lionel LB, Marie AD, Jean YC, Raphaelle BS, Philippe JS, Thierry P. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on shigella-infected human intestinal epithelial cells. *The journal of immunology*, 2006, 176(2):1228-1237.
- [10] 相丽, 姜毓君, 刘伟, 毕宇涵, 赵凤, 霍贵成. 金黄色葡萄球菌基因表达的 DNA 扣除法 Real-time RT PCR 相对定量分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica sinica)*, 2008, 48(4):526-531.
- [11] 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 北京: 科学出版社, 2001:34-69.
- [12] 庄建良, 潘群雄, 苏子剑, 许荣誉, 王聪仁. CD24, ALCAM 在大肠癌的表达及其临床意义. *国际病理科学与临床杂志 (International Journal of Pathology and Clinical Medicine)*, 2007, 27(5):382-387.
- [13] Monica PV, Sigrid CJ, Keersmaecker D, Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 276(2):140-148.
- [14] Hashemi N, Weigt SS, Xue YY, Palchevskiy V, Huang C, Zisman DA, Fishbein M, Lynch III JP, Elashoff RM, Belperio JA. Immune Response CC Chemokines, CCL5 and CCL2 Are Associated with Pulmonary Sarcoidosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2009, 179:A4011.

Lactobacillus acidophilus NCFM affects host adhesion-related gene expression after adhering to host

Linlin Han^{1#}, Chaoxin Man^{2#}, Xuena Lv¹, Mingna Wang¹, Guanghui Zhang¹, Ying Liu¹, Yujun Jiang^{1,2*}

¹Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education of China, ²National Research Center of Dairy Engineering and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: [**Objective**] Adhering to the intestinal epithelial cells is one of the beneficial functions exerting by probiotics. We tested and verified the expression of adhesion-related genes *in vivo* and *in vitro* to understand the influence from *Lactobacillus acidophilus* NCFM on host cells. [**Method**] We selected the adhesion-related genes through GO (gene ontology) category from the Human Genome U133 Plus 2.0 Array analysis. These genes were verified by *in vitro* Caco-2 cells culture model and *in vivo* mouse model using Real-time PCR method. [**Results**] After *L. acidophilus* NCFM adhering to Caco-2, we found that 12 adhesion-related genes were up-regulated. The up-regulation was confirmed *in vivo* and *in vitro* by Real-time PCR assay. Among them, the up-regulated expression of chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) gene was the most distinguished one. [**Conclusion**] Our research showed that *L. acidophilus* NCFM, adhering to Caco-2 cells, could cause the differential expression of the host adhesion-related genes. Results of this study seemed to provide some useful data for further revealing its effect on intestinal epithelial cells.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus* NCFM, Caco-2 cells, adhesion, gene expression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT-0959-203), by the Key Projects in the National science & Technology Pillar Program (2009BADB9B06), by the Start Post-doctoral Research Grant of Heilongjiang Province (LBH-Q07023) and by the Innovation Team Projects of Northeast Agricultural University (CXT007-3-2)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-55191842; E-mail: yujun_jiang@163.com

#These authors contributed equally to this work.

Received: 20 October 2010/Revised: 31 December 2010