

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):554-560; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

嗜酸乳杆菌 NCFM 对 Caco-2 细胞中 PTX3 基因表达的影响

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

¹东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030

²东北农业大学, 国家乳业工程技术研究中心, 哈尔滨 150086

摘要:【目的】研究嗜酸乳杆菌 NCFM 对肠道上皮细胞中免疫与炎症介质因子 PTX3 表达的影响, 并进一步揭示其调节机制。【方法】嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共培养 0、2、4、8 和 12 h, 提取细胞 RNA, 采用 Real Time RT-PCR 方法检测 PTX3 基因的表达。嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共培养 0、0.5、1、2 和 4 h, 提取细胞蛋白质, 采用 Western blot 方法检测 NF- κ B 的磷酸化水平; 用 NF- κ B 的特异性抑制剂 PDTC 预处理 Caco-2 细胞 30 min, 然后加入嗜酸乳杆菌 NCFM 作用 2 h, 提取细胞 RNA, 采用 Real Time RT-PCR 方法检测 PTX3 基因的表达。【结果】嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共培养后能诱导 PTX3 的表达, 并且在共培养 4 h 的时候 PTX3 的表达量达到最大, 然后逐渐下降; 嗜酸乳杆菌 NCFM 能快速的诱导 NF- κ B 的磷酸化, 并且在加入其特异性抑制剂 PDTC 后, PTX3 的表达显著下降。【结论】嗜酸乳杆菌 NCFM 作用于肠道上皮细胞后能够通过迅速激活 NF- κ B 途径暂时性的调控 PTX3 的表达。

关键词: 嗜酸乳杆菌 NCFM, Caco-2 细胞, PTX3 基因, NF- κ B 途径

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)04-0554-07

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 是人及动物肠道中极为重要的一类益生菌^[1-2], 粘附于宿主肠道后通过定植保护作用而发挥益生功能^[3]。肠道上皮细胞不仅构成了肠道粘膜屏障^[4], 而且经胃肠道给予嗜酸乳杆菌等乳酸菌后, 能分泌细胞因子、趋化因子和一些炎症介质等, 进而调整肠道菌群平衡、抑制不良微生物的增殖, 增强机体的免疫能力, 降低胆固醇, 抑制肿瘤的形成和发展等^[5-6]。因此, 了解乳酸菌作用于肠道上皮细胞后引起这些细胞因子等的表达变化及其调控机制, 对研究乳酸菌作用后的宿主的反应尤其是免疫调节反应非常重要。

本实验室前期已利用基因芯片技术检测了人肠道上皮细胞 Caco-2 细胞与嗜酸乳杆菌 NCFM (*Lactobacillus acidophilus* NCFM) 共培养后的基因表达变化, 发现表达差异基因为 508 个, 其中上调表达 473 个, 包括一些细胞因子、趋化因子和炎症介质。Pentraxin 3 (PTX3) 就是其中重要的上调表达基因之一^[7]。PTX3 是长链五球体蛋白, 属于炎症急性期反应蛋白。单核的巨噬细胞、树突细胞、成纤维细胞和内皮细胞等都能产生 PTX3^[8-9]。PTX3 是固有免疫反应中起重要作用的一个因子, 其在抵抗病原体的入侵、清除凋亡的细胞和调节免疫反应的过程

基金项目: 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); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金 (2007RFQXN010); 东北农业大学创新团队项目 (CXT007-3-2)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-451-55190577; E-mail: yujun_jiang@163.com

作者简介: #并列第一作者。吕学娜 (1986-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物与生物技术, E-mail: 361725510@qq.com; 满朝新 (1978-) 男, 黑龙江宾县人, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为乳及乳酸菌的研究, E-mail: 87402577@qq.com

收稿日期: 2010-11-07; **修回日期:** 2011-01-16

中都发挥着重要的作用^[9-11]。研究表明,在巨噬细胞和成纤维细胞中一般通过 NF- κ B 途径调节 PTX3 的表达^[12-13]。

由于 PTX3 在提高宿主防御功能的过程中发挥着重要的作用,本实验对嗜酸乳杆菌 NCFM 作用于肠道上皮细胞后引起的 PTX3 基因的表达变化及其调节机制进行了研究,为全面了解该乳酸菌的免疫调节机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞株:嗜酸乳杆菌 NCFM (*Lactobacillus acidophilus* NCFM) 由丹麦丹尼斯克 (Danisco) 公司惠赠。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。

1.1.2 主要试剂和仪器:胎牛血清、DMEM (NQBB 公司); PDTC (Sigma 公司); Trizol Reagent (Invitrogen 公司); ExScriptTM RT-PCR Kit (TaKaRa 公司); GAPDH 抗体 (Santa 公司)、NF- κ B 磷酸化抗体 (Cell Signal Technology 公司)、HRP 标记的羊抗兔 IgG (Santa 公司); PVDF 膜 (Millipore 公司); ECL 发光试剂盒 (TransGen 公司); X-胶片 (EastmanKodak 公司); ABI7500 实时荧光 PCR 仪 (ABI 公司); 电泳仪及转膜仪 (Bio-Rad 公司)

1.2 细胞培养及与菌体的共培养

3×10^6 cells/well 的 Caco-2 细胞在 37°C 下用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 5% CO₂ 的培

养箱内培养,隔天换液,连续培养 16—17 d 后,细胞可达到极化状态。

嗜酸乳杆菌 NCFM 在 MRS 培养基中培养至对数生长期后,离心收集菌体,并用 DMEM 培养液重悬菌体,调整其浓度为 3×10^7 cfu/mL。之后与达到极化状态的 Caco-2 细胞在 37°C、5% CO₂ 条件下共同培养 12 h。期间于第 0、2、4、8 和 12 h 用 4°C 磷酸盐缓冲液分别对实验组 (嗜酸乳杆菌 NCFM 作用组) 和对照组 (无嗜酸乳杆菌 NCFM 作用组) 的 Caco-2 细胞冲洗 3 次。收集细胞,提取细胞总 RNA 和蛋白质。

1.3 NF- κ B 抑制实验

以 NF- κ B 的特异性抑制剂 (PDTC, 40 μ mol/L) 与极化状态的 Caco-2 细胞共孵育 30 min, 然后加入 3×10^7 cfu/mL 的嗜酸乳杆菌 NCFM 菌悬液在 37°C、5% CO₂ 条件下共同培养 2 h 后,用 4°C 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次。然后收集细胞,提取细胞总 RNA。

1.4 Real Time RT-PCR 方法检测 PTX3 基因的表达

1.4.1 RNA 的提取和检测:参照标准的 Trizol RNA 提取方法抽提实验组和对照组的 Caco-2 细胞总 RNA。并以琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度值来检测 RNA 的完整性和纯度。

1.4.2 引物设计:根据 GenBank 中各基因序列,对待检测基因 PTX3 和内参基因 GAPDH,利用 Primer 5.0 软件设计特异性上下游引物,见表 1。

表 1 待检测基因引物的碱基序列、T_m 值及扩增产物的大小

Table 1 Base sequence, T_m and predicted sizes of PCR products for target genes specific oligonucleotide primer

Gene	Gene No.	Oligonucleotide sequence (5'→3')	T _m /°C	Product/bp
GAPDH	NM_002046	AACGGATTTGGTCGTATTG	53.2	214
		GCTCCTGGAAGATGGTGAT	54.1	
PTX3	NM_002852	TTGCGATTCTGTTTGTGCT	56.8	124
		GTGGGGTCTCAGTGGG	55.2	

1.4.3 Real Time RT-PCR 反应条件:对所提取的 Caco-2 细胞总 RNA 反转录获得 cDNA 后,进行 Real Time RT-PCR 反应,反应条件为:95°C 预变性 10 s; 95°C 变性 5 s,60°C 退火 34 s,40 个循环。分析待检测基因的 Ct 值,利用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法对目的基因的表达量进行计算。每次 Real Time RT-PCR 反应都进行扩增曲线和融解曲线分析,以评估扩增的特异性。

1.5 Western blot 方法检测 NF- κ B 蛋白的磷酸化

由于 NF- κ B 蛋白的磷酸化是 NF- κ B 途径被激活的标志,所以利用 Western Blot 方法检测 NF- κ B 蛋白的磷酸化^[14]。调整实验组和对照组的总蛋白浓度一致,取 30 μ g 蛋白,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后,转移至 PVDF 膜上,然后用脱脂乳封闭 1 h。一抗为兔源的 NF- κ B

P65 磷酸化抗体(1:1000),二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5000),ECL 发光液显色后,X-胶片进行曝光。GAPDH 作为内参蛋白。

1.6 数据分析

实验数据采用 SPSS 12.0 软件进行统计和方差分析(ANOVA)。所有数据均以平均值 \pm 标准差表示, $p < 0.05$,表示差异显著, $p < 0.01$,表示差异极显著。

2 结果

2.1 嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导 Caco-2 细胞中 PTX3 基因的表达

本实验室此前已经通过芯片杂交技术检测了嗜酸乳杆菌 NCFM 作用于 Caco-2 细胞 2 h 后的基因表达变化,发现嗜酸乳杆菌 NCFM 能诱导 PTX3 基因的表达。为进一步检测嗜酸乳杆菌 NCFM 作用于 Caco-2 细胞后诱导 PTX3 基因表达的动态变化趋

势,我们利用嗜酸乳杆菌 NCFM 分别与 Caco-2 细胞共同培养 0、2、4、8 和 12 h,然后采用 Real Time RT-PCR 方法对 PTX3 基因的表达进行检测,并以管家基因 GAPDH 作为内参基因,结果如图 1 所示。

通过图 1 可以看出,嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共培养 0、2、4、8 和 12 h 后,实验组和对照组中 PTX3 和 GAPDH 基因 mRNA 表达的扩增曲线重合度良好。其中共培养 0、4 和 12 h 后,实验组 PTX3 基因扩增曲线的 Ct 值明显小于对照组,并且内参基因 GAPDH 表现出相同的规律;而共培养 2 h 和 8 h 后,实验组 PTX3 基因扩增曲线的 Ct 值却大于对照组。因而,无法通过直接分析 PTX3 基因扩增曲线的 Ct 值对其 mRNA 的表达量进行比较。故此我们利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,以 GAPDH 扩增曲线的 Ct 值消除本底模板差异后,对 Caco-2 细胞中 PTX3 基因受嗜酸乳杆菌 NCFM 作用后 mRNA 表达水平的变化进行量化,结果见图 2。

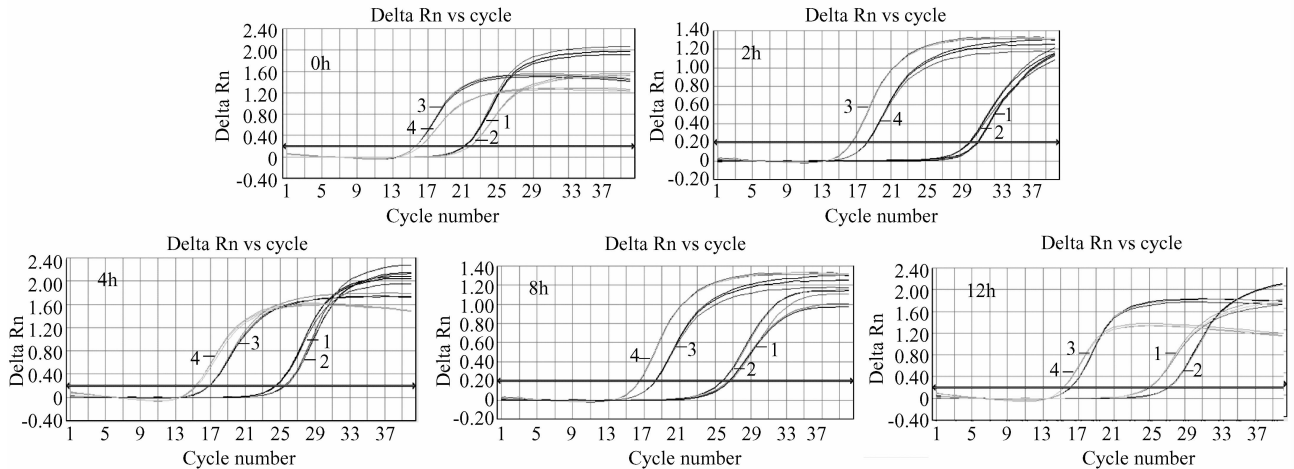


图 1 嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共培养不同时间后 PTX3 和 GAPDH 的实时荧光扩增曲线

Fig. 1 The Real Time RT-PCR curves of PTX3 and GAPDH in Caco-2 cells treated with NCFM for different times. 1, 2: The Real Time RT-PCR curves of PTX3 in Caco-2 cells treated with NCFM or without NCFM, respectively; 3, 4: The Real Time RT-PCR curves of GAPDH in Caco-2 cells treated with NCFM or without NCFM, respectively. 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h: Caco-2 cells were treated with NCFM for 0 h, 2 h, 4 h, 8 h and 12 h, respectively.

由图 2 可以看出,随着嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共培养时间的延长,与对照组相比 PTX3 基因的表达量明显增大并且差异极显著($p < 0.01$),在 4 h 时候达到最高($p < 0.001$)。然后开始呈逐渐下降趋势,但至 12 h 时与对照组相比差异仍极显著($p < 0.01$)。

2.2 嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导 Caco-2 细胞中 NF- κ B 的磷酸化

PTX3 基因的启动子区域含多个转录因子结合位点(包括 AP-1, NF- κ B 和 NF-IL-6)^[8],有研究指出 NF- κ B 途径不仅参与了脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导巨噬细胞中 PTX3 基因的表达,而

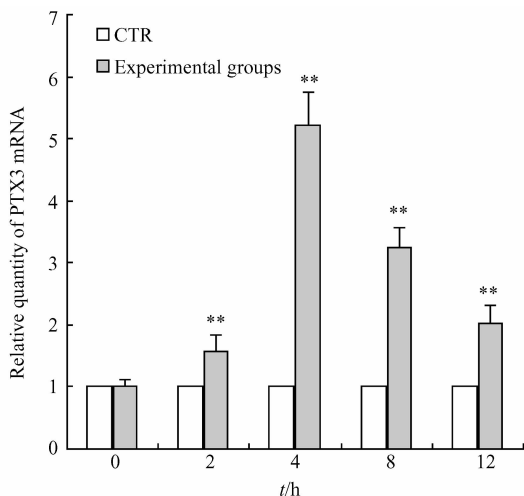


图2 嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导 Caco-2 细胞中 PTX3 基因的表达

Fig. 2 NCFM up-regulates PTX3 gene expression in Caco-2 cells. 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h; Caco-2 cells were treated with NCFM for 0 h, 2 h, 4 h, 8 h and 12 h, respectively. CTR: control groups; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control groups.

且对 TNF- α 诱导人类成纤维细胞中 PTX3 基因的表达亦起到不可缺少的作用^[12-13]。为了研究 NF- κ B 途径是否也在嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导 Caco-2 细胞 PTX3 基因表达的过程中发挥一定的作用,我们检测了嗜酸乳杆菌 NCFM 与 Caco-2 细胞共培养 0、0.5、1、2 和 4 h 后 NF- κ B 的磷酸化结果,结果见图 3。

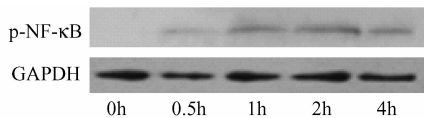


图3 嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导 Caco-2 细胞中 NF- κ B 的磷酸化

Fig. 3 NCFM triggers NF- κ B phosphorylation in Caco-2 cells. 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h; Caco-2 cells were treated with NCFM for 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h and 4 h, respectively. P, phosphorylated protein.

由图 3 可以看出,嗜酸乳杆菌 NCFM 能迅速的诱导 NF- κ B 的磷酸化。在共培养 0.5 h 的时候, NF- κ B 开始被激活并逐渐加强,持续到第 4 h 时 NF- κ B 的磷酸化开始逐渐减弱,说明嗜酸乳杆菌 NCFM 能暂时性的迅速诱导 NF- κ B 的磷酸化。

2.3 NF- κ B 抑制剂 (PDTC) 对嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导 Caco-2 细胞中 PTX3 基因表达的抑制

为进一步研究 NF- κ B 途径对嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导的 Caco-2 细胞中 PTX3 基因表达的作用,将 Caco-2 细胞用 NF- κ B 特异性的抑制剂 PDTC 预处

理,然后再与嗜酸乳杆菌 NCFM 共培养 2 h,采用 Real Time RT-PCR 方法对 PTX3 基因的表达进行检测,并以管家基因 GAPDH 作为内参基因。由图 4 可以看出,抑制剂 PDTC 处理组和未加抑制剂组与嗜酸乳杆菌 NCFM 共培养后 PTX3 和 GAPDH 基因表达的扩增曲线重合度良好,说明扩增效果较好,结果可信。

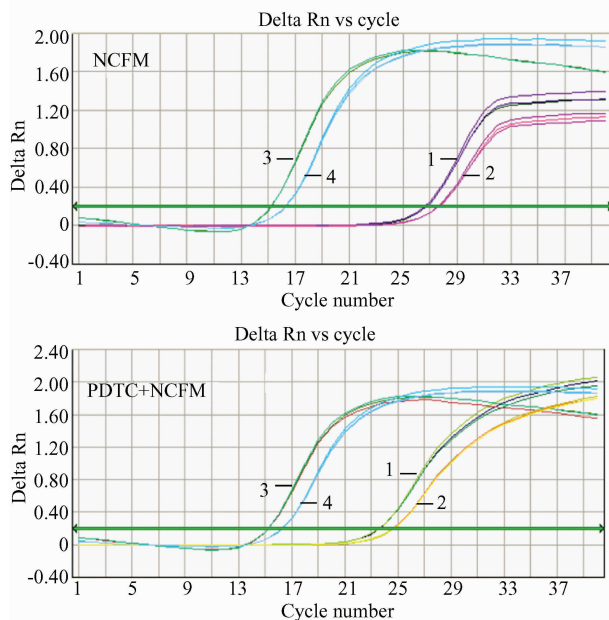


图4 经/未经 PDTC 处理的 Caco-2 细胞与 NCFM 共培养后 PTX3 和 GAPDH 的实时荧光扩增曲线

Fig. 4 The Real Time RT-PCR curves of PTX3 and GAPDH in Caco-2 cells (pretreated with or without PDTC) cocultured with NCFM. 1, 2: The Real Time RT-PCR curves of PTX3 in experimental and control groups, respectively; 3, 4: The Real Time RT-PCR curves of GAPDH in experimental and control groups, respectively. NCFM: the Caco-2 cells were treated with NCFM for 2 h; PDTC + NCFM: the Caco-2 cells were treated with PDTC for 30 min before treated with NCFM for 2 h.

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,以 GAPDH 扩增曲线的 Ct 值消除本底模板差异后,对 Caco-2 细胞中 PTX3 基因 mRNA 表达水平的变化进行量化,结果见图 5。可以看出,PDTC 对 Caco-2 细胞进行预处理后可以明显的降低由嗜酸乳杆菌 NCFM 诱导的 PTX3 基因的表达。结果进一步说明 NF- κ B 途径在嗜酸乳杆菌 NCFM 作用于 Caco-2 细胞后诱导 PTX3 表达的过程中发挥着不可缺少的作用。

3 讨论

乳酸菌能对机体产生有益的作用,一个世纪以

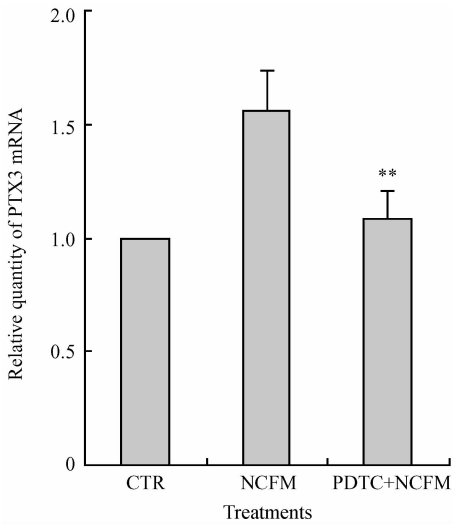


图5 PDTC对嗜酸乳杆菌NCFM诱导Caco-2细胞中PTX3基因表达的抑制

Fig. 5 Inhibition of NCFM induced PTX3 gene expression in Caco-2 cells by PDTC. CTR: control groups; ** $p < 0.01$ compared to the groups treated with NCFM.

来,其益生作用得到了广泛而深入的研究。近年来,利用基因芯片技术研究乳酸菌与宿主之间的相互作用已成为热点之一。前期研究中我们利用基因芯片研究发现,益生菌-嗜酸乳杆菌NCFM作用于人肠道上皮细胞Caco-2细胞后能够上调长链五球体蛋白PTX3转录水平的表达^[7],并且这一发现通过本研究的Real Time RT-PCR方法得到验证。

PTX3在机体的固有免疫反应中起着非常重要的作用^[11],文献表明炎症因子如TNF- α 、IL-1 β 或LPS作用于成纤维细胞、单核巨噬细胞和上皮细胞等后能诱导PTX3的表达^[12-13]。Belcher, C. E等利用基因芯片技术发现,致病菌*Bordetella pertussis*刺激支气管上皮细胞BEAS-2B后也能诱导PTX3的表达^[15]。研究还发现,PTX3缺陷的小鼠对细菌和真菌的感染更敏感^[16],而体内巨噬细胞高表达PTX3的小鼠对酵母多糖和副球孢子菌属(*Paracoccidioides*)则具有更好的吞噬性^[17]。由上可以看出,PTX3在增强机体抵抗病原体的入侵和调控机体固有免疫反应等方面发挥着重要的作用。然而,目前普遍对益生菌对PTX3的调控机制缺乏了解,本研究首次利用嗜酸乳杆菌NCFM揭示了益生菌对该基因的免疫调控作用,丰富了益生菌产生益生作用的理论依据。与国内外研究相比,具有一定的创新性,并在一定程度上拓宽了益生菌的研究

视角。

有研究指出,NF- κ B途径在TNF- α 、IL-1 β 或LPS诱导人类成纤维细胞和巨噬细胞等产生PTX3的过程中有着非常重要的作用^[12-13]。本研究中,我们发现嗜酸乳杆菌NCFM作用于Caco-2细胞后能刺激NF- κ B途径中NF- κ B蛋白的磷酸化,并诱导PTX3的产生(图1-3)。利用NF- κ B特异性抑制剂PDTC预处理Caco-2细胞后,PTX3的表达量明显下降(图5),表明NF- κ B途径在嗜酸乳杆菌NCFM上调Caco-2细胞中PTX3表达的过程中发挥着重要作用。此外有报道称乳杆菌可活化肠道免疫的重要启动者Toll样受体^[18],本研究也发现随着共培养时间的延长,嗜酸乳杆菌NCFM也能诱导Toll-like receptor 2 (TLR2)的产生(数据未给出)。综合以上结果表明,对于Caco-2细胞,嗜酸乳杆菌NCFM可能通过激活TLR2介导的NF- κ B途径调控PTX3的表达。

PTX3虽然在机体的固有免疫反应中有着非常重要的作用,但是其长期持续的表达会对机体的组织造成损伤^[19]。嗜酸乳杆菌NCFM作用于Caco-2细胞后可诱导PTX3的产生,但随着作用时间的延长,PTX3的表达量呈现减少的趋势,并最终逐渐趋向于未作用组的表达量(图2),表明嗜酸乳杆菌NCFM只是暂时性的诱导PTX3的表达,这可能是嗜酸乳杆菌NCFM可以增强机体免疫功能,但不会由于免疫过度反应引起机体组织损伤的原因。最近的研究也表明,PTX3在女性生殖方面也发挥着一定的作用,其缺乏与女性生殖力的缺陷有关^[9]。这意味着嗜酸乳杆菌NCFM对宿主PTX3的上调,可能会对女性生殖力方面产生一定的有益作用。

嗜酸乳杆菌NCFM是一株具有良好益生功能的乳酸菌,我们采用基因芯片技术对其作用后的宿主细胞基因的变化情况进行分析后,进一步研究了嗜酸乳杆菌NCFM作用于肠道上皮细胞后诱导PTX3表达的机制。我们发现嗜酸乳杆菌NCFM作用于Caco-2细胞后能通过激活TLR2介导的NF- κ B途径暂时性的上调PTX3的产生。尽管这只是在体外条件下得到的结果,仍需要通过进一步的体内研究来确证,但是本研究所初步揭示的益生菌-嗜酸乳杆菌NCFM增强机体免疫力的分子机制,为今后的研究方向提供了重要线索。

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] Altermann E, Russell WM, Andrea MA, barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Dobson A, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2005, 102(11): 3906-3912.
- [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(2): 8344-8351.
- [4] Gampbell N, Yio XY, So L P, Mayer L. The intestinal epithelial cell; processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunological Reviews*, 1999, 172(1): 315-324.
- [5] 赵瑞香, 李元瑞, 罗磊. 嗜酸乳杆菌生产特性的研究. 西北农林科技大学学报(*Journal of Northwest Sci-thch University of Agriculture and Forestry*), 2002, 30(3): 85-88.
- [6] 张灼阳, 刘畅, 郭晓奎. 益生菌的安全性. 微生物学报(*Acta Microbiological Sinica*), 2008, 48(2): 257-261.
- [7] 王明娜, 张光辉, 韩希研, 姚丽燕, 周艳秋, 姜毓君. 嗜酸乳杆菌 NCFM 对 Caco-2 细胞基因表达谱的影响. 微生物学报(*Acta Microbiological Sinica*) 2009, 49(9):1247-1252.
- [8] Altmeyer A, Klampfer L, Goodman AR, Vilcek J. Promoter structure and transcriptional activation of the murine TSG-14 gene encoding a tumor necrosis factor/interleukin-1-inducible pentraxin protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(43): 25584-25590.
- [9] Bottazzi B, Bastone A, Doni A, Garlanda C, Valentino S, Deban L, Maina V, Cotena A, Moalli F, Vago L, Salustri A, Romani L, Mantovani A. The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 79: 909-912.
- [10] Soares AC, Souza DG, Pinho V, Vieira AT, Nicoli JR, Cunha FQ, Mantovani A, Reis LF, Dias AAM, Teixeira MM. Dual function of the long Pentraxin PTX3 in resistance against plmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes and Infection*, 2006, 8(5): 1321-1329.
- [11] Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Immunology*, 2006, 18(1): 10-15.
- [12] Goodman AR, Levy DE, Reis LF, Vilcek J. Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000, 67: 387-395.
- [13] Basile A, Sica A, Aniello E, Breviaro F, Garrido G, Castellano M, Mantovani A, Introna M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF- κ B in tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(13): 8172-8178.
- [14] Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science*, 2006, 90: 519-531.
- [15] Belcher CE, Drenkow J, Kehoe B, Gingeras TR, Mcnamara N, Lemjabbar H, Basbaum C, Relman DA. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *PNAS*, 2000, 97(25): 13847-13852.
- [16] Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, Acetis MD, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, Desantis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Roman L, Mantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, 2002, 420: 182-186.
- [17] Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, Teixeira MM, Brown GD, Mantovani A, Gordon S, Reis FL, Dias AA. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75: 649-656.
- [18] Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulation Epithelial Barrier Function. *Gastroenterology*, 2007, 132: 1359-1374.
- [19] Han B, Mura M, Andrade CF, Okutani D, Lodyga M, Santos CC, Keshavjee S, Matthay M, Liu M. TNF- α -Induced Long Pentraxin PTX3 expression in Human Lung Epithelial Cells via JNK. *The Journal of Immunology*, 2005, 175(12): 8303-8311.

Expression of PTX3 gene in Caco-2 cells treated with *Lactobacillus acidophilus* NCFM

Xuena Lv^{1#}, Chaoxin Man^{2#}, Linlin Han², Mingna Wang², Guanghui Zhang², Ying Liu², Shiqin Yang², Yuqing Xue², Yujun Jiang^{1,2*}

¹ Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science and Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

² National Research Center of Dairy Engineering and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150086, China

Abstract: [**Objective**] To study the expression of immunity and inflammatory mediator factor PTX3 in intestinal epithelial cells treated with *Lactobacillus acidophilus* NCFM and further to reveal the regulatory mechanism. [**Methods**] Caco-2 cells were cocultured with *Lactobacillus acidophilus* NCFM for 0, 2, 4, 8, 12 h and 0, 0.5, 1, 2, 4 h respectively, then the total RNA and protein were extracted. The expression of PTX3 gene was analyzed by Real Time RT-PCR. The phosphorylation levels of NF- κ B was analyzed by Western Blot. Caco-2 cells were pretreated with PDTC for 30 min before cocultured with *Lactobacillus acidophilus* NCFM for 2 h, then the total RNA was extracted and the expression of PTX3 gene was analyzed by Real Time RT-PCR. [**Results**] *Lactobacillus acidophilus* NCFM could induce the expression of PTX3 in Caco-2 cells. The PTX3 expression peaked at 4 h after coculture. Then its expression gradually waned out. *Lactobacillus acidophilus* NCFM could rapidly activate the phosphorylation of NF- κ B, and the expression of PTX3 was decreased notably after pretreated with PDTC for 30 min. [**Conclusion**] *Lactobacillus acidophilus* NCFM could transiently regulate the immunity and inflammatory mediator factor PTX3 expression through rapidly activating NF- κ B signaling pathway in Caco-2 cells.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus* NCFM, Caco-2 cells, PTX3 gene, NF- κ B signaling pathway

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science and Technology Support Program of China (2009BADB9B06), by the Postdoctoral Science-Research Foundation of Heilongjiang Province (LBH-Q07023), by the Science and Technology Development Foundation of Harbin (2007RFQXN020) and by the Innovative Team Projects Northeast Agricultural University (CXT007-3-2)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-55190577; E-mail: yujun_jiang@163.com

Equal contribution

Received : 7 November 2010/Revised: 16 January 2011