

植物乳杆菌 NDC 75017 对 Caco-2 细胞中 *il-6* 表达的影响

刘颖¹, 满朝新², 吕学娜¹, 韩琳琳¹, 薛玉清¹, 杨相宜¹, 单艺², 张英华¹, 姜毓君^{1,2*}

¹东北农业大学食品学院, 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】本研究通过体外实验, 分析植物乳杆菌 NDC75017 对免疫相关基因白细胞介素 6 (*il-6*) 表达的影响, 并进一步揭示其机制。【方法】植物乳杆菌 NDC 75017 作用于 Caco-2 细胞 0、2、4、6、8、10 和 12 h, 采用 Real Time PCR 方法检测 *il-6* 基因和 toll 样受体 2 (*tlr2*) 的表达。植物乳杆菌 NDC 75017 与 Caco-2 细胞共培养 0、0.5、1、2 和 4 h, 用 western blot 方法检测 NF- κ B 的磷酸化水平; NF- κ B 的特异性抑制剂 PDTC 预处理 Caco-2 细胞 30 min 后, 再加入植物乳杆菌 NDC 75017 作用 2 h, 用 Real Time PCR 方法检测 *il-6* 基因及 *tlr2* 的表达量。【结果】植物乳杆菌 NDC 75017 诱导 Caco-2 细胞中 *il-6* 和 *tlr2* 基因的表达, 并且分别在诱导 8 h 和 6 h 时表达量达到最大。植物乳杆菌 NDC 75017 能够快速诱导 NF- κ B 的磷酸化作用, 在加入其特异性抑制剂 PDTC 后, *il-6* 和 *tlr2* 基因的表达显著下降。【结论】植物乳杆菌 NDC 75017 能通过 *tlr2* 介导的 NF- κ B 信号通路来诱导细胞因子 *il6* 短暂性的表达。

关键词: 植物乳杆菌 NDC 75017, Caco-2 细胞, 白细胞介素 6 (*il-6*), toll 样受体 2 (*tlr2*), NF- κ B 信号通路
中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 10-1237-07

益生菌是能够对宿主健康产生有益影响的一类活的微生物^[1]。它能够维持肠道菌群平衡, 调节免疫系统, 增强乳糖耐受性, 降低血清胆固醇水平, 并能够产生维持肠道健康的代谢产物^[2-3]。人类肠道中的乳酸杆菌能够增强机体的先天性和获得性免疫^[4-5]。植物乳杆菌是与人体共生的益生菌, 具有免疫调节性质, 能够定植于肠道并改善肠道菌群平衡, 还能够诱导机体的固有免疫应答和获得性免疫应答反应^[6]。

Toll 样受体 2 (*tlr2*) 是一种模式识别受体, 能够在不同的细胞类型中表达, 并识别病原相关分子模

式, 同时 TLR 信号转导途径能够激活 NF- κ B 并进一步调节免疫相关基因的表达^[7]。

白细胞介素 6 (*il-6*) 是一种免疫相关的多效性细胞因子, 同时有促炎性和抗炎性的性质^[8-9]。*il6* 能够在一些疾病引起的不同组织中的炎症反应中发挥保护效应, 还能够对粘膜层和肠上皮细胞等产生保护作用^[10]。肠上皮细胞, 巨噬细胞等都能够诱导产生 *il6*, 并且通过 NF- κ B 途径来调节其表达^[11-12], *il6* 基因在提高宿主免疫与防御功能中发挥着极其重要的作用。本文通过使用本实验室在通辽发酵乳制品中分离得到的植物乳杆菌 NDC 75017 作用于

基金项目: 国家自然科学基金(31171718); 黑龙江省教育厅科学技术研究重点项目(12511z005); 国家“863 计划”(2011AA100902); 长江学者和创新团队发展计划(IRT-0959-203); 黑龙江省青年科学基金项目(QC2009C55)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-451-86632508; E-mail: yujun_jiang@163.com

作者简介: 刘颖(1987-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: 549979215@qq.com

收稿日期: 2012-01-31; **修回日期:** 2012-06-26

肠上皮细胞,研究该益生菌的免疫调节作用并揭示其作用机制,为深入揭示该益生菌的免疫调节机理提供依据,且具有重要的科学理论意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞株:植物乳杆菌 NDC 75017 (*Lactobacillus plantarum* NDC 75017) 是从内蒙古通辽地区传统发酵乳制品中分离得到的。人结肠腺癌细胞 Caco-2 购自于中国科学院上海生命科学研究所以。

1.1.2 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); PDTC (Sigma 公司); ExScript™ RT-PCR Kit、SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司); NF-κB 磷酸化抗体 (Cell Signal Technology 公司); GAPDH 抗体 (Santa 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)。电泳仪、转膜仪 (Bio-Rad 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 细胞与菌体的共培养

1 × 10⁶ cells/well 的 Caco-2 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 的培养箱

内培养,连续培养 15 - 16 天后,细胞达到极化状态。

植物乳杆菌 NDC 75017 在 MRS 培养基中,30℃ 下培养至对数生长期后,3000 × g 离心 10 min 收集菌体,并用 DMEM 培养基调整菌浓度为 1 × 10⁸ CFU/mL。之后与达到极化状态的 Caco-2 细胞在 37℃ 细胞培养箱中分别共培养 2、4、6、8、10 和 12 h。用 4℃ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 对实验组 (植物乳杆菌 NDC 75017 作用) 和对照组 (无植物乳杆菌 NDC 75017 作用) 的 Caco-2 细胞冲洗 2 次。收集细胞,参照 Trizol RNA 提取方法提取 Caco-2 细胞总 RNA 和蛋白质。

1.3 NF-κB 抑制实验

用 DMSO 溶解 NF-κB 的特异性抑制剂 PDTC 至 40 μmol/L,然后与极化状态的 Caco-2 细胞共培养 30 min,之后加入 1 × 10⁸ CFU/mL 的植物乳杆菌 NDC 75017 菌悬液在 37℃ 细胞培养箱中共培养 2 h,用 PBS 冲洗 2 次。最后收集细胞,参照 Trizol RNA 提取方法提取 Caco-2 细胞总 RNA。

1.4 Real Time PCR 方法检测 Caco-2 细胞中基因的表达

1.4.1 引物设计:对待测免疫相关基因 *il6*, 模式识别受体 *tlr2* 和内参基因 *gapdh* 用 Real Time PCR 方法进行验证,在 GenBank 中查找基因序列,利用 Primer 5.0 软件跨内含子设计引物,并利用 *gapdh* 作为内参基因消除本底模板差异,见表 1。

表 1 待测基因引物的来源,碱基序列, T_m 值和扩增产物的大小

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

| Organism | Gene | Gene No. | Oligonucleotide sequence (5'→3') | T _m /°C | Product/bp |
|--------------|--------------|-----------|----------------------------------|--------------------|------------|
| Homo sapiens | <i>Gapdh</i> | NM_002046 | AACGGATTTGGTCGTATTG | 53.2 | 214 |
| | | | GCTCCTGGAAGATGGTGAT | 54.1 | |
| | <i>il-6</i> | NM_000600 | GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAG | 54.9 | 225 |
| | | | GCTCTGGCTTGTTCCTCAC | 55.1 | |
| | <i>tlr2</i> | NM_003264 | GATGCCTACTGGGTGGAG | 52.6 | 223 |
| | | | AAAGACGGAATGGGAGA | 52.2 | |

1.4.2 Real Time PCR 反应条件:对所提取的 Caco-2 细胞总 RNA 反转录获得 cDNA,反应条件为:37℃, 15 min; 85℃, 5 s。然后进行 Real Time PCR 反应,反应条件为:95℃ 预变性 10 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 34 s, 40 个循环。

1.5 Western blot 方法检测蛋白的磷酸化水平

由于 NF-κB 蛋白磷酸化水平是 NF-κB 信号通

路是否被激活的标志,所以本文采用 Western Blot 方法检测 NF-κB 蛋白的磷酸化水平^[13]。调整实验组和对照组的总蛋白浓度一致,20 μg 蛋白经过 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后将其转移至 PVDF 膜上,用脱脂乳封闭膜 1 h。然后用一抗即兔源的 NF-κB p65 磷酸化抗体 (1:1000), 4℃ 孵育过夜,随后用二抗 HRP 标记的山

羊抗兔 IgG (1:5000) 孵育 1 h, 再用 ECL 发光液显色, 最后用 X-胶片进行曝光。以 GAPDH 作为内参蛋白来检测植物乳杆菌 NDC 75017 作用于细胞后目的蛋白的表达变化。

1.6 统计分析

每个待测样品均进行 3 次重复实验, 根据待检测基因的 Ct 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因的相对表达量进行分析, 计算。实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计和方差分析 (ANOVA)。所有实验数据均以平均值 \pm 标准差来表示, $p < 0.05$, 表示差异显著, $p < 0.01$, 表示差异极显著。

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{对照组}}$$

2 结果

2.1 植物乳杆菌 NDC 75017 诱导 *il6* 和 *tlr2* 基因在 mRNA 水平上的表达变化

Tlr2 能够识别微生物成分并激活固有免疫反应。用植物乳杆菌 NDC 75017 分别与 Caco-2 细胞共培养 2、4、6、8、10 和 12 h 后, 分析植物乳杆菌 NDC 75017 对于细胞中免疫相关基因 *il6* 和模式识别受体 *tlr2* 表达的影响。本实验 Real Time PCR 方法中, 用内参基因 *gapdh* 的扩增曲线 Ct 值来消除本底模板差异, 并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因表达量进行分析, 量化 *il6* 基因和 *tlr2* 受植物乳杆菌 NDC 75017 作用后 mRNA 表达水平的变化。用 DMEM 培养基代替植物乳杆菌 NDC 75017 与细胞共培养作为阴性对照。结果如图 1 所示。

从图 1-A 可以看出, 随着植物乳杆菌 NDC 75017 与 Caco-2 细胞共同孵育时间的延长, 作用组与对照组相比 *il6* 基因的表达量大体上呈现先上升后下降趋势, 但在 6 h 时有略微的下降并差异极显著 ($p < 0.001$), 在 8 h 时基因的表达量迅速上升并且达到最大值 ($p < 0.001$)。8 h 后呈现快速下降趋势, 直至 12 h 时与对照组相比差异仍极显著 ($p < 0.01$)。

由图 1-B 中可得出, 植物乳杆菌 NDC 75017 能够快速引发 *tlr2* 的激活, 并随着菌与细胞共培养时间的延长, 直到 10 h 时 *tlr2* 表达量仍上调。在 6h 时表达量达到最大并且差异极显著 ($p < 0.01$), 直到 12 h 时表达量也是极显著 ($p < 0.01$)。从结果中我

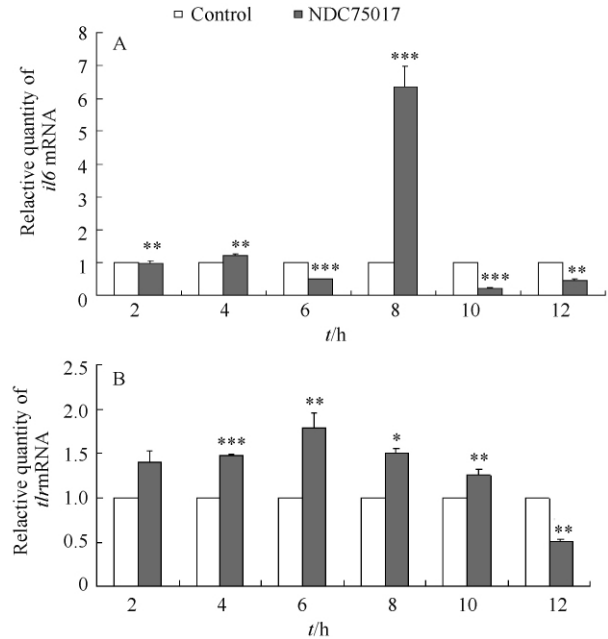


图 1 植物乳杆菌 NDC 75017 诱导 Caco-2 细胞中 *il-6* 和 *tlr2* 基因的表达

Fig. 1 *L. plantarum* NDC 75017 induced gene expressions of *il6* and *tlr2*. Caco-2 cells were stimulated with *L. plantarum* NDC 75017 (10^8 CFU/mL) at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h. A: *il6*, B: *tlr2*. After stimulation RNA were extracted, and the induction of the genes encoding *il6* and *tlr2* were determined by quantitative real time PCR. The messenger RNA levels were normalized to the relative expression of *gapdh*. Results were expressed as mean fold increase \pm SD with $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control groups.

们也可以看出 *tlr2* 受体在共培养过程中比较稳定, 且持续时间也较长。

2.2 植物乳杆菌 NDC 75017 激活 NF- κ B 蛋白的磷酸化

Pedro 等证明了 *B. Lactis* 能够触发 NF- κ B 磷酸化作用, 来进一步诱导 *il6* 的表达^[11]。NF- κ B 易于感应 κ B 结合位点, 并启动和增强靶基因, 如 *il6* 的产生^[12]。为了检测植物乳杆菌 NDC 75017 是否能够诱导 Caco-2 细胞来激活 NF- κ B 信号通路并在 *il6* 基因表达的过程中发挥一定的作用, 我们用植物乳杆菌 NDC 75017 与 Caco-2 细胞共培养 0、0.5、1、2 和 4 h 后, 用 western blot 方法来检测 NF- κ B 的磷酸化结果, 结果见图 2。

由图 2 可以看出, 植物乳杆菌 NDC 75017 能够快速诱导 NF- κ B 蛋白的磷酸化。在作用 0.5 h 后,

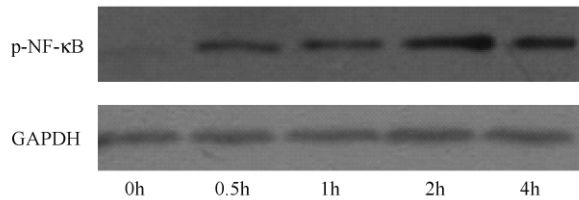


图2 植物乳杆菌 NDC 75017 激活 Caco-2 细胞中 NF- κ B 的磷酸化

Fig.2 *L. plantarum* NDC 75017 triggered NF- κ B phosphorylation in Caco-2 cells. Caco-2 cells were stimulated with *L. plantarum* NDC 75017 (10^8 CFU/mL) at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h. The levels of the phosphorylated form of NF- κ B and internal standard protein, GAPDH, were measured by Western Blot with antibodies against the Ser(p)-NF- κ B p65 and GAPDH.

NF- κ B 的磷酸化蛋白开始被激活并逐渐加强,作用 2 h 时后 NF- κ B 的磷酸化水平达到最强,并从 2 h 开始逐渐减弱,结果也说明尽管持续用植物乳杆菌 NDC 75017 刺激 Caco-2 细胞,但该植物乳杆菌只能暂时性的诱导 NF- κ B 的磷酸化作用即短暂性激活 NF- κ B 信号通路。

2.3 NF- κ B 抑制剂 (PDTC) 对植物乳杆菌 NDC 75017 作用后的 *il6* 和 *tlr2* 基因表达的影响

为了进一步证明 NF- κ B 信号通路的激活对于植物乳杆菌 NDC 75017 诱导的 Caco-2 细胞中的免疫基因和受体表达量的影响, Caco-2 细胞用 NF- κ B 的特异性抑制剂 PDTC 预处理后检测 *il6* 和 *tlr2* 的表达量变化。采用 Real Time PCR 方法,用内参基因 *gapdh* 的扩增曲线 Ct 值来消除本底模板差异,并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因表达量进行分析,来量化 *il6* 基因和 *tlr2* 在 mRNA 表达水平上的变化。用 DMEM 培养基代替植物乳杆菌 NDC 75017 与细胞共培养作为阴性对照。结果见图 3。

由图 3 可以看出, PDTC 对 Caco-2 细胞进行预处理后能够显著的抑制由植物乳杆菌 NDC 75017 诱导的 *il6* 基因的表达以及 *tlr2* 的激活。

通过以上几个结论我们可以得出, *il6* 和 *tlr2* 基因确实参与了植物乳杆菌 NDC 75017 与 Caco-2 细胞共培养的过程,其自身的表达量也发生了相应变化。*Tlr2* 受体能够介导 NF- κ B 信号通路并进一步调控和诱导 *il6* 基因表达, NF- κ B 信号通路在免疫反应的过程中也起到了关键性的作用。

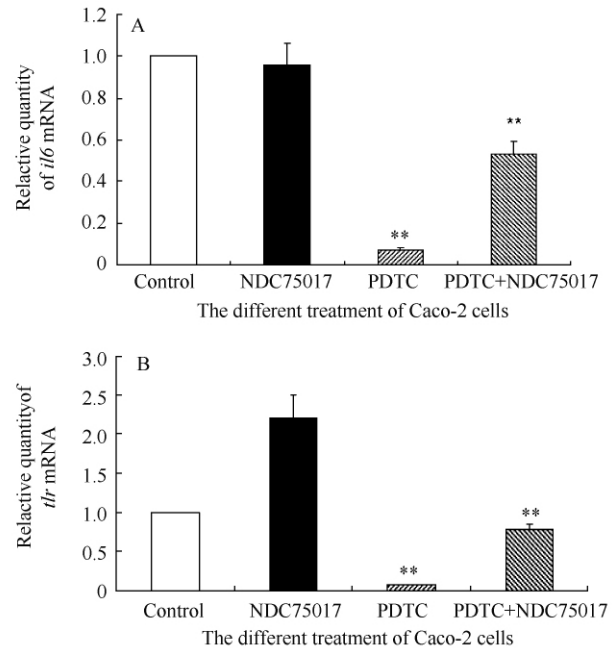


图3 PDTC 对植物乳杆菌 NDC 75017 作用后 *il6* 和 *tlr2* 表达的抑制

Fig.3 Caco-2 cells were pre-treated with 40 μ mol/L inhibitor of NF- κ B pathways (PDTC) for 30 min, followed by stimulation with *L. plantarum* NDC 75017 (10^8 CFU/mL) for 2 h. A: *il6*; B: *tlr2*. Total RNA were extracted; reverse transcribed and real time PCR was performed for determining the genes encoding *il6* and *tlr2*. The messenger RNA levels were normalized to the relative expression of *gapdh*. Results were expressed as mean fold increase \pm SD with $n=3$ in each group. ** $P < 0.01$ compared to the groups treated with NDC75017.

3 讨论

目前关于益生菌对 *il6* 的调控机制已有初步的了解,本研究首次利用内蒙古传统发酵乳中分离出的植物乳杆菌 NDC 75017 与 Caco-2 细胞共培养来检测免疫相关的 *il6* 细胞因子以及 *tlr2* 表达量的变化趋势,发现该菌能够通过 *tlr2* 介导 NF- κ B 信号通路的激活来诱导免疫细胞因子的产生从而促进机体的免疫作用,揭示了该益生菌的免疫调控机制,拓宽了益生菌的研究视角。

植物乳杆菌 NDC 75017 与 Caco-2 细胞共同孵育后能刺激 NF- κ B 蛋白的磷酸化,即 NF- κ B 信号通路被激活,同时该益生菌能够短暂性的诱导 *il6* 基因的表达。有文献证实,肠道上皮细胞能够表达 Toll

样受体^[18]。Tlr2 主要能够识别脂蛋白和革兰氏阳性菌的细胞肽聚糖 (PGN) 成分, 进一步激活核内转录因子 NF- κ B^[19], 进而控制免疫相关基因的翻译表达并释放出大量的细胞因子。本实验得出随着该益生菌与细胞共培养时间的延长, *tlr2* 被持续诱导表达, 在 10 h 内 *tlr2* 的表达一直上调 (图 1-B)。然而, 在 NF- κ B 特异性抑制剂 PDTC 预处理 Caco-2 细胞后, *il6* 和 *tlr2* 的表达量有明显的下降。由此能够证明植物乳杆菌 NDC 75017 作用于 Caco-2 细胞后, 可以通过激活 *tlr2* 介导的 NF- κ B 途径来短暂性调控 *il6* 的表达水平。抑制剂 PDTC 能够显著性的抑制 *tlr2* 在 mRNA 水平上的表达, 也就是抑制上游通路中受体的表达, 可能是由于下游的信号通路和上游的 *tlr2* 之间也存在着像信号通路和免疫细胞因子之间的一种反馈回路调节机制, 并且也有文献证实 PDTC 可以抑制 *tlr2* 在 mRNA 水平上的表达^[20-21]。

il6 能够在机体的固有免疫反应期间产生^[12], 并且也有文献证实 *il6* 在肠粘膜层的抗炎性以及保护效应。植物乳杆菌 NDC 75017 只能短暂性诱导 *il6* 的表达, 这可能与植物乳杆菌 NDC 75017 能够增强机体免疫调控功能, 但不会由于过度免疫反应而引起机体组织的损伤有关。还有一些研究表明, *il6* 能够防御过热引起的肠细胞的凋亡^[22], 并且在患有内毒素血症和败血症的小鼠体内 *il6* 的表达也相应的上调, 这些都说明了 *il6* 的有益作用以及它具有的保护效应^[10]。植物乳杆菌 NDC 75017 能够诱导 *tlr1-9* 的产生 (除 *tlr2* 数据均未给出), 然而只有 *tlr2* 能够持续并稳定的上调, 并且与对照组相比能够持续 10 h 上调, 在 12 h 时表达量下降的也不是很明显, 这也是我们使用 *tlr2* 作为识别益生菌的模式受体的主要原因。

综上所述, 通过 NF- κ B 途径可以进一步转录调节前炎性细胞因子 *il6*, 植物乳杆菌 NDC 75017 作用于 Caco-2 细胞后能通过激活 *tlr2* 介导的 NF- κ B 信号通路来短暂性调控 *il6* 基因的表达, 也表明该信号通路的激活在植物乳杆菌 NDC 75017 上调 *il6* 基因表达的过程中起到关键性的作用。益生菌对肠上皮细胞的免疫调节作用是一个复杂的过程, 还需要更系统深入的研究并从体内实验来进行验证。本研究中揭示的免疫调节机制为今后在体内的研究方向提

供了重要线索和理论依据, 同时对益生菌的开发应用有着重要的意义, 为开发出更为科学健康的功能性食品提供了理论基础, 也为微生态制剂的研发与生产提供了深层次的理论依据。

参考文献

- [1] Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 1965, 147: 747-748.
- [2] Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, 83: 1256-1264.
- [3] Teitelbaum JE, Walker WA. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Reviews Nutrition*, 2002, 22: 107-138.
- [4] Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition*, 2000, 83: 167-176.
- [5] Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical and Experimental Allergy*, 2000, 30: 1804-1808.
- [6] van Baarlen P, Troost FJ, van Hemert S, van der Meer C, de Vos WM, de Groot PJ, Hooiveld GJEJ, Brummer RJM, Kleerebezem M. Differential NF- κ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Microbiology*, 2009, 106: 2371-2376.
- [7] Lim YD, Narasimhan S, Michaylira CZ, Wang ML. TLR3-mediated NF- κ B signaling in human esophageal epithelial cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009, 297: 1172-1180.
- [8] Papanicolaou DA, Wilder RL, Monolapas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. NIH conference. *Annals of Internal Medicine*, 1998, 128: 127-137.
- [9] Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei

- XF, Achong MK. IL6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998, 101: 311-320.
- [10] Reilly N, Poylin V, Menconi M, Onderdonk A, Bengmark S, Hasselgren PO. Probiotics potentiate IL6 production in IL-1 α treated Caco-2 cells through a heat shock-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 293: 1169-1179.
- [11] Pedro AR, Hoffmann M, Szcesny S, Blaut M, Haller D. Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology*, 2005, 115: 441-450.
- [12] Miettinen M, Lehtonen A, Julkunen I, Matikainen S. Lactobacillus and Streptococci activate NF- κ B and STAT signaling pathways in human macrophages. *Journal of Immunology*, 2000, 164: 3733-3740.
- [13] Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science*, 2006, 90: 519-531.
- [14] Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infection and Immunity*, 2004, 72: 5308-5314.
- [15] Reid G, Howard J, Gan BS. Can bacterial interference prevent infection? *Trends in Microbiology*, 2001, 9: 424-428.
- [16] 杨玉荣, 余锐萍, 梁宏德. Toll-NF- κ B 信号途径及其介导的功能. 细胞生物学杂志 (*The Journal of Cell Biology*), 2007, 29: 483-486.
- [17] 金晶. NF- κ B 的研究进展. 国外医学药学分册 (*Foreign Medical Sciences Section of Pharmacy*), 2000, 27(3): 133-137.
- [18] Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 2004, 126: 1054-1070.
- [19] Furrie E, Macfarlane S, Thomson G, George T. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, 2005, 115: 565-574.
- [20] Kammanadiminti SJ, Mann BJ, Dutil L, Chadee K. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gallectin of *Entamoeba histolytica*. *The FASEB Journal*, 2004, 18: 155-157.
- [21] Huazhang An, Yizhi Yu, Minghui Zhang, Hongmei Xu, Runzi Qi, Xiaoyi Yan, Shuxun Liu, Wenya Wang, Zhenghong Guo, Jun Guo, Zhihai Qin, Xuetao Cao. Involvement of ERK, p38 and NF- κ B signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology*, 2002, 106: 38-45.
- [22] Hershko DD, Robb BW, Luo GJ, Paxton JH, Hasselgren PO. Interleukin-6 induces thermotolerance in cultured Caco-2 cells independent of the heat shock response. *Cytokine*, 2003, 21: 1-9.

Lactobacillus plantarum NDC 75017 affects *il-6* gene expression in Caco-2 cells

Ying Liu¹, Chaoxin Man², Xuena Lv¹, Linlin Han¹, Yuqing Xue¹, Xiangyi Yang¹, Yi Shan², Yinghua Zhang¹, Yujun Jiang^{1,2*}

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

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

Abstract: [Objective] We tested the expression of immune-related gene interleukin 6 (*il-6*) *in vitro* to understand the influence from *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 on host cells and further to reveal the regulatory mechanism. [Methods] Caco-2 cells were cocultured with *L. plantarum* NDC 75017 for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h, the total RNA were extracted; then the expressions of *il-6* and *tlr2* genes were analyzed by Real Time RT-PCR. The phosphorylation level of NF- κ B was analyzed by Western Blot after the Caco-2 cells stimulation with *L. plantarum* NDC 75017 at 0, 0.5, 1, 2 and 4 h. Caco-2 cells were pretreated with pyrrolidine dithiocarbamate for 30 min before being treated with *L. plantarum* NDC 75017 for 2 h, then the total RNA was extracted and the expressions of *il-6* and *tlr2* genes were analyzed by Real Time RT-PCR. [Results] *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 could induce the expressions of *il-6* and *tlr2* in Caco-2 cells, the *il-6* and *tlr2* expressions peaked at 8 h and 6 h after cocultured with *L. plantarum* NDC 75017. *L. plantarum* NDC 75017 could rapidly activate the phosphorylation of NF- κ B, and the expressions of *il-6* and *tlr2* were decreased notably after pretreated with pyrrolidine dithiocarbamate. [Conclusion] *L. plantarum* NDC 75017 could up-regulate and then down-regulate the expression of *il6* through rapidly activating *tlr2*-mediated NF- κ B signaling pathway in Caco-2 cells. **Keywords:** *Lactobacillus plantarum* NDC 75017, Caco-2 cells, interleukin 6 (*il6*), toll-like receptor2 (*tlr2*), NF- κ B signaling pathway

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171718), by the Ministry of Education Key Project of Science and Technology of Heilongjiang Province (12511z005), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA100902), by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT-0959-203) and by the Heilongjiang Province Science Foundation for Youths (QC2009C55)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-86632508; E-mail: yujun_jiang@163.com

Received: 31 January 2012/Revised: 26 June 2012