

## 两歧双歧杆菌胞外多糖对胃癌细胞及端粒酶逆转录酶的影响

陈旭<sup>1</sup>, 江虹锐<sup>1</sup>, 杨艳梅<sup>2</sup>, 刘宁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>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)

(<sup>2</sup>哈尔滨医科大学肿瘤研究所, 哈尔滨 150040)

**摘要** 【目的】研究从双歧杆菌属两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)提取的细胞表面成分胞外多糖(Exopolysaccharide, B. EPS)对人胃癌细胞 BGC-823 的生长抑制作用及对端粒酶限速因子 hTERT 活性的影响。【方法】将 3 种不同浓度 B. EPS 体外作用于胃癌细胞 BGC-823, MTT 法检测细胞生长抑制率并辅以形态学观察; 异硫氰酸盐(FITC)联合 PI 染色, 通过流式细胞术检测肿瘤细胞初期调亡情况; 肿瘤细胞端粒酶限速因子 hTERT mRNA 经 RT-PCR 检测 B. EPS 对端粒酶活性抑制作用; 通过荧光分光光度计显示 B. EPS 对胃癌细胞作用后胞内  $Ca^{2+}$  含量变化。【结果】经过检测发现, B. EPS 对人胃癌细胞 BGC823 的生长显著抑制( $P < 0.05$ )呈剂量时间反应关系; 细胞中 hTERT mRNA 在 B. EPS 的作用下表达降低( $P < 0.05$ ), 有一定剂量效应关系; 随着 B. EPS 对肿瘤细胞的抑制, 细胞内  $Ca^{2+}$  含量显著增加( $P < 0.05$ )。【结论】B. EPS 诱导人胃癌细胞 BGC-823 调亡的机制可能与改变肿瘤细胞端粒酶限速因子 hTERT mRNA 表达量和细胞内钙离子浓度有关。

**关键词:** 两歧双歧杆菌; 胞外多糖; 胃癌; 细胞调亡; hTERT

**中图分类号:** 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0117-06

双歧杆菌胞外多糖(*Bifido bacterium*. Exopolysaccharide, B. EPS)是双歧杆菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏液或荚膜多糖。自 20 世纪 40 年代成功开发出由肠明串珠菌发酵产生右旋糖酐(dextran)以来, 胞外多糖的研究与开发在全世界范围内已成为研究的热点。B. EPS 所具有生物活性如免疫活性、抗肿瘤和抗溃疡等, 也可应用于医药领域。正是因为乳酸菌的这些有益的保健作用, 才会掀起广大学者对其生理功能, 尤其是抗肿瘤活性研究的浓厚兴趣。研究发现双歧杆菌胞外多糖在体内具有的抗肿瘤作用机制可能与提高宿主免疫力有关, 在体外可以抑制人肿瘤细胞的生长<sup>[1]</sup>。

细胞调亡是维持个体正常生理过程的自主性细

胞死亡形式, 贯穿生命活动的始终。它对细胞生物体的成长、发育和生理稳定具有重要作用<sup>[2]</sup>。细胞调亡与肿瘤的发生、发展与转移有密切的关系。双歧杆菌胞外多糖能诱导肿瘤细胞发生调亡, 但其诱导细胞调亡的机制目前研究较少, 尤其是双歧杆菌胞外多糖直接诱导肿瘤细胞调亡的研究更少。端粒酶(telomerase)的活化被认为是肿瘤进展的关键因素, 大多数恶性肿瘤端粒酶活性高表达, 而正常组织端粒酶活性无表达或低表达, 端粒酶的这种肿瘤特异性是恶性肿瘤诊断的一个有效的生物学指标<sup>[3]</sup>。人端粒酶是由人端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR) 端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)和端粒酶相关蛋白(telomerase

基金项目: 国家自然科学基金(30371055)

\* 通信作者。Tel: +86-451-55191827, Fax: +86-451-55190340, E-mail: ningliu6666@yahoo.com.cn

作者简介: 陈旭(1980-), 女, 硕士研究生, 黑龙江肇东人, 研究方向为营养学与乳品加工。E-mail: chenxu19800203@126.com

收稿日期: 2008-06-04; 修回日期: 2008-10-13

protein 1, TP1)组成的复合物。其中 hTERT 是影响端粒酶活性重要因子,细胞的 hTERT 表达水平增高,则端粒酶的活性也升高,故 hTERT 表达水平增高与肿瘤的发生密切相关。本文研究双歧杆菌属两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)胞外多糖(Exopolysaccharide, B. EPS)对人胃癌细胞 BGC-823 的生长抑制作用,从而深入了解双歧杆菌胞外多糖抑制肿瘤细胞生长的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和病毒细胞**:B. EPS 是按 Sekine 等报道的方法从两歧双歧杆菌[菌种编号:219502,由乳品科学教育部重点实验室(东北农业大学)自行分离鉴定]中提取而成。人胃癌 BGC-823 细胞株为人胃低分化腺癌,由中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库提供(TCHu11)。

**1.1.2 主要试剂和仪器**:小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品;青链霉素是山东鲁抗医药股份有限公司产品(批号:20000628);培养基由 RPMI1640 培养粉(美国 GIBCO 公司)制成;3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT)购自美国 sigma 公司;TritonX-100 购自美国 Amresco 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司;Fura-2/AM 购 ANASPEC 公司;乙二醇二胺四乙酸(EGTA)购自 Solarbio 公司;超绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;RT-PCR kit 购自日本 TaKaRa 公司;hTERT(含 hTERT 启动子核心序列 GeneBankAccession NO. AF015950)由广州市达晖生物技术有限公司。PCR 扩增仪为美国 PE 公司产品;酶标检测仪为美国 Gene 公司 BioTech 产品;低温冷冻高速离心机为日本 HITACH 公司产品。

### 1.2 细胞培养

以  $10^5$  个/mL 密度接种 BGC-823 细胞在含 10% 新鲜小牛血清,100 U/mL 青霉素及 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度下培养,实验时取对数生长期细胞。实验分 4 个组,实验组分别为加入 10、100 和 1000  $\mu$ g/mL 终浓度的 EPS 和对照组,对照组为仅加入 RPMI-1640 培养液,分别于 24、48 和 72 h 时,收集细胞待用。

### 1.3 细胞形态学观察

对呈生长于对数生长期的 BGC-823 细胞体外分别加入 B. EPS 10、100 和 1000  $\mu$ g/mL,24 h 后,与对

照组细胞相比,用 Nikon 荧光倒置显微镜 200 $\times$  观察细胞形态变化。

### 1.4 B. EPS 对 BGC-823 细胞生长的抑制作用

将处于对数生长期 BGC-823 细胞用 0.25% 的胰酶消化制成  $5 \times 10^4$ /mL 细胞悬液,100  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育过夜。给予 10、100 和 1000  $\mu$ g/mL B. EPS,终体积为 200  $\mu$ L/孔,对照组加入相同体积的培养基。给药后分别孵育 24、48 和 72 h 后,加入 20  $\mu$ L/孔 MTT(Sigma),37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后加入 100  $\mu$ L/孔 DMSO。BioTech 酶标仪 490 nm 处检测 OD 值。抑制率计算如下<sup>[4]</sup>:

抑制率(%) = (1 - 加药组细胞平均吸光值/对照组细胞平均吸光值)  $\times$  100%

Logit 法计算 IC<sub>50</sub>。实验重复 3 次。

### 1.5 B. EPS 对体外人胃癌 BGC-823 细胞凋亡作用

取上述浓度 B. EPS 作用 24 h 后的细胞,使用吖啶橙(PI)染液联合 FITC 对细胞染色,染色步骤按北京宝赛生物技术有限公司的 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行。

### 1.6 B. EPS 对人胃癌 BGC-823 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的影响

取上述浓度 B. EPS 作用 48 h 后的细胞,0.25% 的胰酶将细胞分离成为单个细胞悬液,用 D-Hanks 洗涤 2 次,再加入 D-Hanks 重新悬浮细胞,168  $\times$  g 离心去上清,重悬于 D-Hanks 溶液中,并加入 Fura-2/AM 至终浓度为 5  $\mu$ mol/L,37 $^{\circ}$ C 恒温振荡 30 min,以一定量 HEPES 缓冲液终止反应,168  $\times$  g 离心 5 min 去上清,再用 HEPES 缓冲液洗涤 2 次,最后重悬于 HEPES 缓冲液中(细胞浓度为  $10^6$ /mL)。设荧光分光光度计发射光波长为 510 nm,激发光波长为 340 nm 及 380 nm,连续测定荧光强度。在上述细胞悬液中加入 TritonX-100(终浓度为 0.1%)测量最大荧光强度比值,为 F<sub>max</sub>。在上述液体中再加入 EGTA(终浓度为 0.01 mol/L)将所有的 Ca<sup>2+</sup> 螯合,荧光值将最低,为 F<sub>min</sub>。根据公式:

$$[Ca^{2+}] = K_d \left[ \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \right] \left[ \frac{F_{min}}{F_{max}} \right]$$

进行计算,其中, K<sub>d</sub> 为 Fura-2 与 Ca<sup>2+</sup> 反应的解离常数,为 224 nM;R 为各测定点 F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub> 荧光强度比值;R<sub>max</sub>、R<sub>min</sub> 分别为上述测定的最大和最小荧光比值;F<sub>min</sub>、F<sub>max</sub> 分别代表 Ca<sup>2+</sup> 为零及饱和时,在 380 nm 激发光下测得的 Fura-2 荧光强度(F<sub>380</sub>)。

### 1.7 B. EPS 对 BGC-823 细胞 hTERT mRNA 表达水平的影响

取上述浓度 B. EPS 作用 24 h 后的细胞,按照超

绝 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒操作流程提取 BGC-823 总 RNA。利用 RNA 反转录试剂盒对总 RNA 样品进行逆转录,得到相应的 cDNA。逆转录体系:取灭菌 0.5 mL 离心管,加入反应液 I 6.5  $\mu$ L; 逆转录酶 1  $\mu$ L; DEPC-H<sub>2</sub>O 7.5  $\mu$ L; RNA 2  $\mu$ g, 总反应体积 20  $\mu$ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C 水浴 60 min。RT-PCR 检测 hTERTmRNA 所用的引物:F 5'-AGAGCACCGTCTGCGTGAGG-3' R 5'-AACTTGTCCAGACACTCTT-3';  $\beta$ -actin: F 5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCCT-3'; R 5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'。

实时荧光定量 PCR 反应体系,第一步 PCR 扩增:取灭菌 0.2 mL 离心管,加入反应液 II 6.5  $\mu$ L, 逆转录酶 0.5  $\mu$ L; DEPC-H<sub>2</sub>O 13  $\mu$ L; cDNA 5  $\mu$ L, 总反应体积 25  $\mu$ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 20 个循环。第二步 PCR 扩增:取灭

菌 0.2 mL 离心管,加入反应液 III 13.5  $\mu$ L, 逆转录酶 1  $\mu$ L; DEPC-H<sub>2</sub>O 30.5  $\mu$ L; PCR 产物 5  $\mu$ L, 总反应体积 50  $\mu$ L。反应条件:93 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s 40 个循环。

### 1.8 统计学处理

试验重复 3 次平行,使用 SPSS13.0 统计软件对样品进行方差分析,所有数据用平均值和标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  表示有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学观察及 B. EPS 对 BGC-823 细胞生长抑制作用的研究

加药 B. EPS 10、100 和 1000  $\mu$ g/mL, 24 h 后,与对照组细胞相比,细胞体积变小、形态逐渐变圆,细胞间接触松散。随浓度增加变化减弱,如图 1 所示。

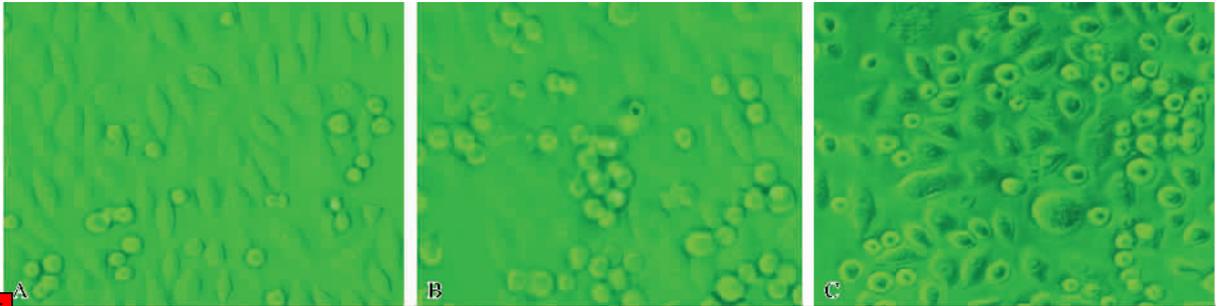


图 1 24 h 后荧光显微镜下观察细胞形态变化(200 $\times$ )

Fig. 1 Morphology changes detected under fluorescence microscope effected by *B. EPS* after 24 h (200 $\times$ ). A: 1000  $\mu$ g/mL; B: 100  $\mu$ g/mL; C: 10  $\mu$ g/mL.

终浓度分别为 10、100 和 1000  $\mu$ g/mL 的 *B. EPS* 作用于 BGC-823 人胃癌细胞后,随浓度变化和时间

的延长对细胞的生长均产生抑制,其 OD 值和抑制率如表 1 所示。

表 1 不同作用时间 *B. EPS* 对人 BGC-823 胃癌细胞的抑制作用( $\bar{x} \pm s$ ) [抑制率(%)]

Table 1 Inhibitory effects of *B. EPS* on BGC-823 cell in extend time ( $\bar{x} \pm s$ ) [Ratio of Inhibitory(%)]

t/h	Control	<i>B. EPS</i> concentration( $\mu$ g/mL)		
		10	100	1000
24	0.25 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.04 (40.01)*	0.19 $\pm$ 0.08 (25.66)*	0.20 $\pm$ 0.07 (20.92)*
48	0.43 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.01 (28.15)*	0.35 $\pm$ 0.04 (16.75)*	0.38 $\pm$ 0.09 (10.22)
72	0.64 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.02 (15.60)*	0.58 $\pm$ 0.06 (9.35)	0.60 $\pm$ 0.05 (6.64)*

\* is compared to control group  $P < 0.05$ .

可以看出,*B. EPS* 为 10~1000  $\mu$ g/mL 浓度范围内,对人胃癌 BGC-823 细胞的生长均有的抑制作用( $P < 0.05$ ),并且随着浓度的降低,其对癌细胞生长的抑制率有逐渐增高的趋势。其中 *B. EPS* 为 10  $\mu$ g/mL 作用组抑制率比其他各组都高为 40.01( $P < 0.05$ ) 随作用时间延长其抑制率下降,由 24 h 的

40.01% 下降到 72h 的 15.60%。

### 2.2 EPS 诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡作用的研究

流式细胞仪检测不同浓度 *B. EPS* 对人胃癌 BGC-823 细胞作用 24 h 后细胞凋亡结果见表 2。

表2 *B. EPS* 对人胃癌 BGC-823 细胞凋亡作用的影响( $\bar{x} \pm s$ )Table 2 Effect of *B. EPS* on BGC-823 cell apoptosis *in vitro* ( $\bar{x} \pm s$ )

Concentration/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Apoptosis ratio/%	Cycle disposition/%		
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
control	0.73 ± 1.06	42.25 ± 7.379	21.12 ± 4.59	36.64 ± 3.01
10	30.27 ± 3.18*	78.73 ± 4.37*	8.21 ± 2.16*	14.06 ± 3.71*
100	23.37 ± 2.22	73.80 ± 2.27*	9.45 ± 2.15	18.64 ± 4.17
1000	14.55 ± 2.54*	54.24 ± 3.40	17.93 ± 3.80*	27.67 ± 6.18*

\* is compared to control group  $P < 0.05$ .

由表 2 结果可以看出, *B. EPS* 对人胃癌 BGC-823 细胞凋亡具有一定的促进作用, 其对人胃癌 BGC-823 细胞凋亡率均显著高于对照组。在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期随 *B. EPS* 浓度增加, 细胞周期分布比例减少 ( $P < 0.05$ ) S 和 G<sub>2</sub>/M 期则随 *B. EPS* 浓度增加, 细胞周期分布比例增加 ( $P < 0.05$ ) 在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期周期分布比例均显著高于对照组, S 和 G<sub>2</sub>/M 期周期分布比例均显

著低于对照组。

### 2.3 *B. EPS* 对人胃癌 BGC-823 细胞 Ca<sup>2+</sup> 浓度的影响

以荧光分光光度计检测经 Ca<sup>2+</sup> 荧光指示剂 Fura-2/AM 染色的人胃癌 BGC-823 细胞的吸光度, 通过公式得到钙离子浓度, 结果见表 3。

表3 *B. EPS* 对人胃癌 BGC-823 细胞钙离子浓度的影响( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Effect of *B. EPS* on calcium concentration in BGC-823 cell ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Control	<i>B. EPS</i> concentration( $\mu\text{g/mL}$ )		
		10	100	1000
c(Ca <sup>2+</sup> ) (nmol/L)	20.58 ± 6.07	112.35 ± 20.19*	70.32 ± 13.31*	35.90 ± 17.72

\* is compared to control group  $P < 0.05$ .

由表 3 结果看出, *B. EPS* 刺激人胃癌 BGC-823 细胞钙离子浓度升高, 当 *B. EPS* 浓度分别为 100 和 1000  $\mu\text{g/mL}$  时, 细胞内钙离子浓度均明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。钙离子浓度的升高使细胞钙稳态失调, 可诱导细胞凋亡, 这与流式细胞术检测 *B. EPS* 促进细胞凋亡结果相一致。

### 2.4 RT-PCR 法检测 *B. EPS* 对细胞端粒酶限速因子 hTERT mRNA 的表达的影响

将  $\beta$ -actin 基因含量作为 hTERT mRNA 的标准对照, 以经浓度是 10、100 和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 *B. EPS* 作用后的细胞中 RNA 经反转录 PCT 获得的 cDNA 为模板, 进行实时 RT-PCR 反应。根据公式  $2^{-\Delta\text{Ct}(\beta\text{-actin} - \text{Ct hTERT mRNA})}$ , 计算出 *B. EPS* 作用前后 hTERT mRNA 基因的相对表达倍数。结果如图 4 所示。经浓度是 10、100 和 1000  $\mu\text{g/mL}$  的 *B. EPS* 作用后,  $\Delta\text{Ct}$  随浓度增加逐渐减小, 而基因的模板倍数增大, 从 *B. EPS* 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时的 0.25 到 1000  $\mu\text{g/mL}$  时的 0.69。这说明随着 *B. EPS* 对胃癌细胞 BGC-823 作用浓度与端粒酶限速因子 hTERT mRNA 的表达量呈正相关。

通过上述研究, *B. EPS* 作用细胞 BGC-823 后, 对其端粒酶限速因子 hTERT mRNA 的表达有抑制作用, 即间接抑制其端粒酶活性, 从而表明其对胃癌细胞 BGC-823 具有抑制作用。

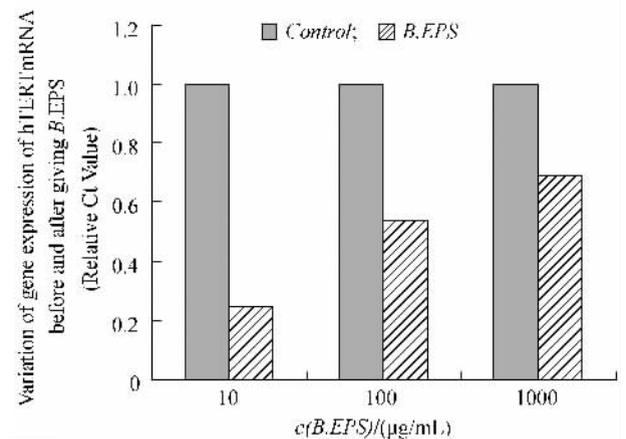


图2 不同浓度 *B. EPS* 作用下 hTERT mRNA 基因与对照组 hTERT mRNA 基因相对表达量

Fig.2 The hTERT mRNA gene expression relatively to normal control after treated by different concentrations of *B. EPS*.

## 3 讨论

经 MTT 法测定与形态学观察证明 *B. EPS* 能抑制人胃癌 BGC-823 细胞生长, 对人胃 BGC-823 细胞凋亡具有一定的诱导作用, 其对人胃癌 BGC-823 细胞凋亡率均显著高于对照组。通过流式细胞仪对 *B. EPS* 作用浓度的变化与人胃癌 BGC-823 细胞生长周期的研究表明, 与对照组相比, 虽然 *B. EPS* 缩短了肿瘤细胞的 DNA 合成期(S)到进行有丝分裂阶段

( $G_2/M$ )的时间,但是低浓度 *B. EPS* ( $10 \mu\text{g/mL}$ )大大延长了细胞在静止期( $G_0$ )到下一个生长期开始( $G_1$ )的间隔。此外,从肿瘤细胞凋亡率这一方面看,低浓度 *B. EPS* ( $10 \mu\text{g/mL}$ )对人胃癌 BGC-823 细胞的凋亡作用显著( $30.27 \pm 3.18$ )%, ( $P < 0.05$ )。  $G_1$  期是一个细胞周期的第一个阶段,也是细胞可以继续分裂所要经过的特定时期,该时期的限制点(restriction point, R 点)控制着新一轮细胞周期的运转。绝大多数细胞若在限制点前进行无生长因子培养(growth factor starvation)细胞会很快进入休眠期,不能复制 DNA,也不能进行细胞分裂。本研究的结果表明,*B. EPS* 显著的延长人胃癌 BGC-823 细胞  $G_0/G_1$  期的时间,并且细胞在 *B. EPS* 的作用下凋亡率显著增加( $P < 0.05$ )。邢承忠观察了胃癌细胞凋亡过程中  $[\text{Ca}^{2+}]$  的变化特点,发现胃癌细胞凋亡早期胞浆游离的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显升高( $244.00 \pm 10 \text{ nmol/L}$ ) ,对照组( $127 \pm 3 \text{ nmol/L}$ ) ,差异有显著性。随后胞浆游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下降较明显( $188 \pm 5 \text{ nmol/L}$ ) ,仍高于对照组<sup>[5]</sup>。McConkey 等在早期运用各种凋亡的诱导剂和细胞模型进行了一系列的工作,他们的结果表明核酸内切酶的激活和细胞凋亡依赖于早期持续的细胞质钙离子浓度的升高<sup>[6]</sup>。本研究中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在胃癌细胞凋亡早期胞浆游离的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显升高差异有显著性。说明  $\text{Ca}^{2+}$  参与胃癌细胞凋亡的信号传导过程 [ $\text{Ca}^{2+}$  表现为明显上调趋势,特别是启动阶段,其作用尤为显著。端粒酶是一种特殊的逆转录酶,它以自身的 RNA 为模板逆转录合成端粒,以维持端粒长度的恒定。肿瘤细胞与正常细胞的根本区别在于其无限增殖性,其增殖性的获得与端粒酶的激活有关。大量研究发现,端粒酶在正常人体组织细胞极少表达,而在绝大多数恶性肿瘤中高表达,故已成为肿瘤治疗的理想靶点。人类端粒酶由 3 个主要成分组成:hTR、TP1 和 hTERT。近来的研究表明,hTERT 与端粒酶活性具有密切相关性,它是端粒酶的催化亚基和活性中心,是决定端粒酶活性的关键因素<sup>[7]</sup>。本研究中,经 *B. EPS* 作用后的细胞 hTERT mRNA 的 Ct 值增加,随 *B. EPS* 浓度增加 Ct 值减少,但都低于对照组,在 *B. EPS* 浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$  时表达明显降低,说明 *B. EPS* 能够抑制胃癌细胞 BGC-823 hTERT mRNA 的表达,即间接抑制端粒酶的活性,从而抑制胃癌细胞的生长。

综上所述,本研究证实,*B. EPS* 对胃癌细胞

BGC-823 的自身的增殖有一定抑制作用,能诱导细胞凋亡,引起外钙内流而非内贮钙释放,从而使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增高,产生细胞毒性促进细胞凋亡。并且,*B. EPS* 能够抑制端粒酶限速因子 hTERT mRNA 的表达,即抑制端粒酶活性,从而抑制肿瘤的增殖,这为阐明双歧杆菌胞外多糖抑制胃癌细胞生长的分子机制提供了初步的实验依据,但 *B. EPS* 是否可以通过延长  $G_0/G_1$  期来促进细胞凋亡的确切机制有待于进一步探讨。此外,在  $10 \mu\text{g/mL}$  至  $100 \mu\text{g/mL}$  梯度浓度范围内,*B. EPS* 随着剂量的增加对胃癌细胞的抑制作用减小,特别是在 *B. EPS* 浓度为  $10 \mu\text{g/mL}$  时,其对胃癌细胞生长的抑制、凋亡作用、细胞内钙离子浓度的升高以及端粒酶限速因子 hTERT mRNA 的抑制作用都比高浓度 *B. EPS* 效果强,这种负相关的剂量反应关系是否在其他浓度范围内有相似表达,有待于进一步验证。

## 参考文献

- [ 1 ] Brian JB Wood. The Lactic Acid Bacteria in Human and Disease. London and New York: Elsevier Applied Science, 1992: 235 - 241.
- [ 2 ] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *British Journal Cancer*, 1972, 26( 2 ): 239 - 241.
- [ 3 ] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266: 2011 - 2015.
- [ 4 ] 林辉,钟德,刘细平等. 不同化疗药物及组合对胃癌与大肠癌疗效的研究. *临床和实验医学杂志 (Journal of Clinical and Experimental Medicine)*, 2007, 6( 2 ): 17 - 19.
- [ 5 ] 邢承忠,陈峻青. 细胞内游离钙浓度在胃癌细胞凋亡过程中的动态变化及发生机制. *中华医学杂志 (National Medical Journal of China)*, 1999, 79( 5 ): 377 - 380.
- [ 6 ] McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, et al. Cardiac glycosides stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, 2000, 60( 14 ): 3807 - 3812.
- [ 7 ] Leelawat K, Leelawat S, Ratanachu-Ek T, et al. Circulating hTERT mRNA as a tumor marker in cholangiocarcinoma Patients. *World Gastroenterol*, 2006, 12( 26 ): 4195 - 4198.

# Effect of exopolysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* on cell of gastric cancer and human telomerase reverse transcriptase

Xu Chen<sup>1</sup>, Hongrui Jiang<sup>1</sup>, Yanmei Yang<sup>2</sup>, Ning Liu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education; College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(<sup>2</sup>Institute of Cancer Research, Harbin Medical University, Harbin 150040, China)

**Abstract [ Objective ]** To study the inhibition of human gastric cancer cell line BGC-823 by exopolysaccharide ( *B. EPS* ) extracted from *Bifidobacterium bifidum* and the effect on the activity of telomerase rate-limiting factor human telomerase reverse transcriptase ( hTERT ). **[ Methods ]** *In vitro* human gastric cancer cell line BGC-823 were treated by three concentrations of *B. EPS*. The inhibition rate of gastric cancer cell line BGC-823, the morphology changes of cells and the apoptosis in the initial stage of cell was observed respectively by MTT, inverted fluorescent microscope and the Annexin V-FITC/PI flow cytometry. In addition, the effect of *B. EPS* on cell telomerase rate-limiting factor hTERT mRNA was tested by RT-PCR; the changes in the concentration of calcium ions inside the cytoplasm were detected by spectrofluorometer. **[ Results ]** *B. EPS* inhibited the growth of gastric cancer cell BGC-823 (  $P < 0.05$  ), the inhibition rate increased and the concentration of *B. EPS* showed dose-time response relation. The expression of cell telomerase rate-limiting factor hTERT mRNA decrease after effected by *B. EPS* (  $P < 0.05$  ), and showed dose-effect relation with *B. EPS*. The concentration of calcium ion in cytoplasm was higher than the control apparently (  $P < 0.05$  ). **[ Conclusion ]** The apoptosis mechanism of human gastric cancer cell line BGC-823 induced by *B. EPS* might be relevant with the changes of the hTERT mRNA expression and the calcium ions concentration in cytoplasm.

**Keywords :** *Bifidobacterium*; exopolysaccharide; gastric cancer; apoptosis; human telomerase reverse transcriptase

( 本文责编 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China( 30371055 )

\*Corresponding author. Tel : + 86-451-55191827 ; Fax : + 86-451-55190340 ; E-mail : ningliu6666@ yahoo. com. cn

Received : 4 June 2008 / Revised : 13 October 2008

## 《微生物学报》答作者问——关于投稿

问 投稿时都需要哪些手续?是否还需要纸稿?

答 从 2006 年起,本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供:

- (1) 论文研究内容所属单位的介绍信(请注意:在此强调的是研究内容所属单位,通常是第一单位),介绍信主要应证明该文的作者署名无误,未一稿两投及不涉及保密问题。介绍信模板可从本刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。
- (2) 在接到经过编辑部内审后 E-mail 发出的“稿件受理通知”后,需要及时补寄纸样的 1 份稿件和介绍信,并缴纳 100 元稿件受理费。

问 审稿费需邮局汇款还是转帐?

答 邮局汇款!中科院微生物所共有 4 个期刊编辑部,因此提醒您在办理汇款时一定要注意以下几点,否则在登记汇款、办理发票时会造成混乱!编辑部在收到汇款之后,将以挂号信形式及时寄回发票。

- (1) 切忌在邮寄来的纸样材料中加入 100 元现金!
- (2) 在收款人一栏填写“微生物学报编辑部”;
- (3) 在备注栏中注明“稿件编号”+“第一作者姓名”;
- (4) 通过邮局汇 100 元审稿费,汇款后请登陆本刊网站,填写“汇款时间”、“发票单位”和收“发票地址”等信息。编辑部会在收到后及时登记“收款时间”和“寄发票时间”,作者可随时查询不必打电话来询问。