

双歧杆菌及其表面分子对 MNNG 致小鼠肠粘膜细胞 DNA 损伤的抑制作用

蓝景刚** 胡 宏 康格非

重庆医科大学检验系 重庆 400046

摘要 单细胞凝胶电泳是一种新近发展起来的快速、敏感地检测单个哺乳动物细胞 DNA 断裂的技术。本文用单细胞凝胶电泳法检测了双歧杆菌及其表面分子——脂磷壁酸、细胞壁肽聚糖对 N-甲 基 - N - 硝基 - N - 亚硝基胍 (MNNG) 致小鼠肠粘膜细胞 DNA 损伤的抑制作用。结果双歧杆菌活菌、死菌、脂磷壁酸、细胞壁肽聚糖、双歧杆菌培养乏液在小鼠胃肠反复作用一段时间后,均具有抑制 DNA 损伤的作用,以活菌、死菌作用最强,活菌作用强于死菌,脂磷壁酸和肽聚糖作用次之,二者间无显著性差异,培养乏液也有轻微作用。双歧杆菌及其表面分子的这种抑制 DNA 损伤作用机理,可能是通过结合 MNNG,并提高免疫监视功能清除 MNNG 结合物及 DNA 损伤的细胞。

关键词 双歧杆菌;脂磷壁酸;肽聚糖;抗突变性;亚硝基胍

INHIBITORY EFFECT OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AND ITS SURFACE MOLECULES ON DNA DAMAGE IN MURINE COLON MUCOSA BY MNNG

Lan Jinggang, Hu Hong, Kang Gefei

Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences. Chongqing, Sichuan 630046

Abstract Single cell gel electrophoresis assay (SCGE) has the advantage of being a quick sensitive screening technique to elucidate various aspects of toxic, genotoxic, and antigenotoxic activities by foreign compounds and nutritional components. Inhibitory effect of *Bifidobacterium bifidum* (Bif1101) and its lipoteichoic acid (LTA), whole cell peptidoglycan (WPG), spent culture (SC) on the DNA damage in murine colon mucosa by MNNG was investigated with SCGE. The results indicate that all the tested Bif1101 related materials appeared significant inhibition on the DNA damage by MNNG. The viable and dead Bif1101 whole cells appeared more effective than that of LTA and WPG. SC had slight effect. The mechanism of the inhibitory effect of Bif1101 related materials on the DNA damage is probably mediated by binding the MNNG and potentiating the immune activity so as to eliminate the MNNG complex or damaged cells.

本课题得到国家自然科学基金部资助(批准号 39570010)

** 现地址:北京昌平流字 5 号 中国预防医科学院流行病学微生物学研究所微生物室 102206

Key Words Bifidobacterium bifidum; Lipoteichoic acid; Whole Cell Peptidoglycan; Antimutagenicity; MNNG

体外和动物体内试验研究表明含乳酸菌的发酵制品或细菌培养物具有抗诱变和抗癌特性。Ishibashi 等认为双歧杆菌可通过改善肠内菌群而表现出有益作用和抗癌特性,其全菌或细胞壁提取物均能抑制小鼠 Meth - A 纤维肉瘤的生长。Kulkani 等发现长双歧杆菌培养物能抑制氧化偶氮甲烷诱导的大鼠肠道癌前病变畸变隐窝点的形成。单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE), 也叫彗星试验 (Comet Assay) 是一种新近发展起来的快速、敏感地检测单个哺乳动物细胞 DNA 断裂的技术。目前已用于检测氧化、紫外线和电离辐射引起的损伤以及三氯乙烯、丙烯酰胺等化学物及老化、吸烟等所致 DNA 损伤的研究。本文的目的即在于用 SCGE 检测双歧杆菌及其表现分子 LTA (Lipoteichoic Acid)、细胞壁肽聚糖 WPG (Whole Peptidoglycan) 对亚硝基胍 MNNG (N-methyl-N-Nitro-N-nitrosoguanidine) 所致小鼠肠粘膜细胞 DNA 损伤的抑制作用。

材料和方法

1 主要仪器设备:不锈钢厌氧罐由大连金中微生物器材开发公司生产、培养箱为日本三洋产品、日本久保田高速低温离心机、带水平电泳槽的电泳仪(北京产)、日本荧光显微镜、接目测微器、镜台测微器。

2 主要试剂:如无特指均为国产分析纯试剂
MNNG:购自 Fluka 公司,用生理盐水配成 200 μ g/ml。

蛋白酶 K:购自 Fluka 公司,用生理盐水配成 50 μ g/ml。

制胶板用试剂:常熔点及低熔点琼脂均为 Sigma 产品,分别配成 0.5%。

电泳缓冲液:含 2mmol/L NaOH、1mmol/L EDTA - Na₂。

细胞裂解液:含 2mol/L NaCl、10mmol/L

EDTA - Na₂、10g/L 十二烷基肌氨酸钠, 100mmol/L Tris, pH10.0, 用前加 1% Tritonx - 100。

中和液:0.4mol/L PH7.5。

RPMI1640 培养液:GIBCO 产品,按说明配制。

溴化乙锭:配成 20 μ g/ml

分叉双歧杆菌 Bifidobacterium bifidum (Bif1101) 由本室分离经中国科学院微生物学研究所鉴定。将菌种用 BL 培养液经厌氧、37 培养 48h,收获菌液经 4000rpm \times 30min 离心,上清为培养液 (Spent Culture, SC) 备用。沉淀用生理盐水洗涤 3 次后,干燥定量备用。Bif1101 活菌液 (BiL) 按需要浓度配制; Bif1101 死菌液 (BiD) 配制时,将已调整好浓度的菌液隔水 65 45min 加热处理。LTA、WPG 按本室常规制备。

3 方法

Balb/c 小鼠:健康、雄性、体重 18 ~ 22g, 共 70 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。分两种处理方式各 7 组,每组 5 只动物。第一种方法参照 Pool-Zobel 等将 MNNG 按 5 μ g/g 体重分别与 BiL、BiD、LTA、WPG 等量,SC 等体积同时灌胃相应试验组,设 MNNG 阳性和生理盐水阴性对照;第二种方式先分别用 BiL、BiD、LTA、WPG 按 5 μ g/g 体重每 d 一次灌胃相应试验组共 3WK,最后一次与第一种方式相同处理,并设 MNNG 阳性及生理盐水阴性对照。MNNG 进入小鼠体内 16h 后处死小鼠,分离盲肠附近的一段结肠,用 37 预温的 RPMI1640 液反复冲洗干净后,置蛋白酶 K 溶液 37 消化 45min。然后将消化分离的细胞轻轻摇散,800rpm \times 5min 离心去上清,沉淀用 RPMI1640 悬浮,调浓度至 2 \times 10⁷/ml。用台盼蓝排除法计数活细胞为 80 ~ 90%。

单细胞凝胶电泳基本按 Singh 等方法略加修改。取 1ml 0.5% 常熔点琼脂糖铺于霜化

预冷的载玻片上,2~5min后去掉盖玻片,用蒸馏水洗去多余的溴化乙锭,置湿盒中避光封闭保存。在荧光显微镜下观察,用接目测微器(经镜台测微器校准)测定,每个样品中随机挑选40个细胞在高倍镜下测核DNA直径和移出的DNA(即彗星尾部)总长度。

4 统计学处理:根据Pool-Zobel等测大鼠胃肠道细胞,Betti等测淋巴细胞所得结果彗星尾部长度变异很大,分布中呈正态。我们的结果也如此,故不能用参数统计法,而选用非参数统计多个样本比较的秩和检验分析结果。

结果

以40个细胞核DNA直径与彗星尾总长度的平均值求得各组均值 $\bar{x} \pm s$,见表1。可见第一种方式处理动物(即同时处理),仅双歧杆菌活菌、死菌、阴性对照3组与阳性对照比较有显著性差异,LTA、WPG、SC3组与阳性对照比较无显著性差异。说明双歧杆菌全菌与MNNG同时摄入小鼠体内可抑制MNNG对小鼠肠粘膜细胞DNA的损伤,且活菌与死菌之间结果比较无显著性差异。按第二种方式(先后顺序)处理,则各试验组彗星总长度均显著低于对照阳性组,其中以活菌组最低($P < 0.01$),死菌组次之($P < 0.01$),活菌组低于死菌组($P < 0.05$);LTA、WPG、SC组均低于阳性对照组($P < 0.05$),但高于活菌组及死菌组($P < 0.05$),LTA、WPG、SC3组相互间无显著差异。将两种处理方式的对应组进行比较,在两种处理方式间阳性对照、阴性对照组间均无显著差异;各试验组均为第二种处理方式的彗星总长度显著低于第一种处理方式者。说明双歧杆菌活菌、死菌、LTA、WPG、SC先进入小鼠胃肠道作用一段时间后,其抗MNNG损伤DNA的作用增强。

讨论

SCGE用于检测单个哺乳动物细胞DNA损伤的机理是:通常DNA以组蛋白为核心盘绕成核小体,在核小体中DNA为负超螺旋结

构。如果有去垢剂进入细胞,核蛋白被浓盐提取,DNA便形成残留的类核。若类核中DNA断裂,就会在核外形成一个DNA晕轮,DNA断裂引起超螺旋松散,电泳时DNA断片向阳极伸展,通过溴化乙锭染色可见明亮的荧光头部和尾部,形似彗星,故又名彗星检测法。决定DNA电泳行为的关键因素是DNA超螺旋的释放,DNA损伤越严重,含断裂片段越多,在彗星中出现的DNA就越多,尾中DNA百分含量和尾长就成了DNA断裂的重要定量参数。我们用SCGE通过测彗星尾部长度来反映双歧杆菌及其表面分子对MNNG损伤小鼠肠粘膜细胞DNA的影响。结果表明,双歧杆菌活菌、死菌、LTA、WPG、SC与MNNG一起同时灌胃小鼠,仅双歧杆菌活菌、死菌,即全菌对MNNG损伤DNA有抑制作用,而LTA、WPG、SC未表现出抑制性。这是双歧杆菌与动物肠内菌群共同作用的结果。LTA、WPG、SC可能在短时间内还没能将动物体内拮抗MNNG的因素调动起来。将双歧杆菌全菌、LTA、WPG、SC每天一次灌胃小鼠达3周后,再与MNNG一起灌胃小鼠,结果均表现出对MNNG的抑制作用,双歧杆菌全用更强。这说明双歧杆菌及其表面分子作用于小鼠肠内,通过改善微生态环境、免疫赋活作用等,使综合的抗MNNG损伤DNA的能力提高。

含乳酸性细菌的乳制品对肿瘤发生和生长的抑制作用已有许多报道,Veer等发现摄取发酵乳品可预防乳癌的发生。Reddy等用长双歧杆菌培养物喂饲雄性和雌性大白鼠,可抑制2-氨基-3-甲基咪唑4,5-f喹啉诱发结肠癌、肝癌和乳癌的作用。Rice等最近研究双歧杆菌和嗜酸乳杆菌培养物对7,12-二甲基苯蒽诱发乳癌的作用得到的是阴性结果,这可能是由于双歧杆菌、乳杆菌对致癌剂的作用有一定的选择性,而且两种菌都是肠内菌群的成员,可能对肠道肿瘤发生的抑制作用更为明显。Koo等发现CF₁小鼠长期摄取活的双歧杆菌或通过摄取促双歧杆菌生长的新蔗糖可以减少二甲基胍诱发的结肠癌前病变。Bari-

cault 等证实乳杆菌和双歧杆菌对体外培养的人结肠癌细胞系 HT - 29 有直接的抑制作用并能增强这些细胞的分化。Abdelali 等用双歧杆菌培养物和含双歧杆菌的发酵乳喂饲大白鼠均能减少二甲基胍诱发的结肠畸变隐窝点数目和多重性,以双歧杆菌培养物作用更强。Koo 等认为食入双歧杆菌对小鼠结肠癌的预防作用与肠道内层的酸化和有害菌被替代有关。要达到肠道内层的酸化,进入体内的双歧杆菌必须以存活状态定植到肠内。最近

已证明,活的双歧杆菌能抵抗溶菌酶和胰酶的消化,穿过胃液以存活态进入肠道。Abdelali 等进行的长达 4 周的试验,含双歧杆菌的饮食使大鼠肠道 - 葡萄糖醛酸酶活性显著降低,但未能使肠道 PH 降低。粪便中的细菌酶可以催化前致癌物转化为致癌物,因此这些细菌酶活性的试验结果中活菌比死菌的作用更强,可能是活的双歧杆菌在调整肠道微生态环境,抑制有害菌的作用方面更强。

表 1 双歧杆菌及其表面分子对 MNN G 所致小鼠肠粘膜细胞 SCGE 结果的影响

组别	动物数	SCGE 结果(μm) ($\bar{x} \pm s$)	
		第一种处理	第二种处理
BiL	5	52.67 \pm 3.71 **	46.91 \pm 3.10 **
BiD	5	56.41 \pm 3.73 **	51.94 \pm 3.05 **
LTA	5	75.18 \pm 2.65	68.21 \pm 3.83 *
WPG	5	73.25 \pm 2.65	69.99 \pm 3.69 *
SC	5	77.96 \pm 2.66	70.97 \pm 2.72 *
PC	5	79.24 \pm 6.28	79.28 \pm 4.37
NC	5	40.85 \pm 3.93 **	36.48 \pm 3.33 **

PC: Positive Control; NC: Negative Control; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

参考文献

- Gorbach SL, Goldin BR. The intestinal microflora and the colon cancer connection. *Rev Infect Dis*, 1990; 12 (S2): S252
- Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technol*, 1993; 47: 26
- Pool-Zobel BL, Munzner R, Holzapfel WH. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the S. typhimurium mutagenicity Assay. *Nutr Cancer*, 1993; 20(3): 261
- Kulkani N, Reddy BS. Inhibitory effect of bifidobacterium longum cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial - glucuronidase (43817). *Proc Soc Exp Biol Med*, 1994; 207(3): 278
- Fairbairn DW, Olive PL, Oneill KL. The Comet assay; a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339: 37
- 贺宇江, 田虹. 单细胞碱性微板凝胶电泳——一种应用前景广泛的诱变剂检测技术. *癌变·畸变·突变*, 1996; 8 (1): 60
- Pool-Zobel BL, Bertram B, Knoll M, et al. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in vivo in the gastrointestinal tract of rats. *Nutr Cancer*, 1993; 20: 271
- Singh NP, Tice RR, Stephens RE, et al. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblast cultured on microscope slides. *Mutat Res*, 1991; 252: 289
- Betti C, Davini T, Giannesi L, et al. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res*, 1995; 343: 201
- 秦椿华, 沈建英, 黄仕和, 等. DNA 断裂检测方法——单细胞凝胶电泳法. *生物化学与生物物理进展*, 1995; 22 (6): 5177
- 何道生. 乳酸杆菌和双歧杆菌与人类健康的关系. *中国微生物学杂志*, 1995; 7(6): 57
- Veer P, Dekker JM, Lamars J W J, et al. Consumption of fermented milk products and breast cancer: A case-control study in the Netherlands. *Cancer Res*, 1989; 49: 4020
- Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory effect of bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo 4,5-f quinoline, a food mutagen. *Cancer Res*, 1993; 53: 3914
- Rice LJ, Chai YI, Conti CJ, et al. The effect of dietary fermented milk products and lactic acid bacteria on the initiation and promotion stages of mammary carcinogenesis. *Nutr Cancer*, 1995; 24: 99

双歧杆菌及其表面分子对 MNNG 诱导 SOS 反应的抑制作用

蓝景刚 胡 宏 康格非

重庆医科大学检验系 重庆 400046

摘要 化学物质对细菌的基因毒作用与其对哺乳动物的致突变性和致癌性密切相关。为探讨双歧杆菌抗致癌作用的机理,本文研究了双歧杆菌及其表面分子——酯磷壁酸、细胞壁肽聚糖和双歧杆菌培养乏液对已知致癌剂 N - 甲基 - N - 硝基 - N - 亚硝基胍(MNNG)诱导 E. coli PQ37 菌株 SOS 反应的抑制作用。结果表明,双歧杆菌全菌、脂磷壁酸、细胞壁肽聚糖、培养乏液均能不同程度地抑制 MNNG 的诱变性,其中以脂磷壁酸作用最强,细胞壁肽聚糖与全菌相当,培养乏液也有一定的抗诱变作用,未培养过双歧杆菌的原培养液无抗诱变性。双歧杆菌及其表面分子的这种体外抗诱变作用机理,可能是通过与诱变剂发生结合作用掩盖了诱变剂的活性基团或使诱变剂降解,使之丧失活性。

关键词 双歧杆菌;脂磷壁酸;肽聚糖;抗突变性;亚硝基胍

INHIBITORY EFFECT OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AND ITS SURFACE MOLECULES ON THE SOS REACTION INDUCED BY MNNG

Lan Jinggang, Hu Hong, Kang Gefei

Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences Chongqing, Sichuan 400046

Abstract It has been known that there is a close correlation between the genotoxic effect of chemicals on the bacteria and their mutagenesis or carcinogenesis on mammals. In order to investigate the mechanisms of the anticarcinogenicity effect of Bifidobacteria, the inhibitor effect of Bi-

15. Koo M, Rao AN. Long-term effect of bifidobacteria and neosugar on precursor lesions of colonic cancer in CFI mice. *Nutr Cancer*, 1991;16:249
16. Baricault L, Denariatz G, Darmoul D, et al. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cellline, to study the role of fermented milks on cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* 1995;16:245
17. Abdelali H, Cassand P, Saussotte V, et al. Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer*, 1995;24:121
18. Heine W, Braun OH, Mohr C, et al. Enhancement of lysozyme trypsin-mediated decay of intestinal bifidobacteria and lactobacilli. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995;21(1):54
19. Pochart P, Marteau P, Biuhnik Y, et al. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr*, 1992;55:78
20. Raffer JJ. The Role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol*, 1995;30:497

本课题得到国家自然科学基金部分资助。(批准号 39570010)

现在地址:北京昌平流 5 号,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所微生物室 102206