

# 海洋细菌 SSQ500 的鉴定及其发酵产物

## 抗肿瘤作用机制研究

邢桂兰 田树红 符健\*

(海南医学院 海南 海口 571199)

**摘要:** 【目的】对具有抗肿瘤活性的海洋细菌 SSQ500 进行分类鉴定, 初步探讨其发酵产物的抗肿瘤作用机制。【方法】通过菌株的形态学观察、生理生化特征检测和 16S rDNA 序列分析及系统发育分析, 以确定菌株的分类。不同浓度的活性物质作用于肿瘤细胞不同时间后收集细胞, 流式细胞术分析人肝癌细胞(SMMC-7721)凋亡比例, 检测 Caspase3、Caspase8 蛋白的表达。【结果】初步鉴定菌株 SSQ500 属于粘球菌属(*Myxococcaceae* sp.)。该菌株发酵产物能诱导 SMMC-7721 凋亡, 上调 Caspase3、Caspase8 蛋白的表达。【结论】SSQ500 属于粘球菌属, 其发酵产物的抗肿瘤作用机制为诱导肿瘤细胞凋亡, 可能与上调 Caspase3、Caspase8 蛋白的表达有关。

**关键词:** 海洋细菌, 粘球菌属, 分类鉴定, 抗肿瘤, 细胞凋亡

## Identification of marine bacteria SSQ500 and the antitumor mechanism of fermentation products

XING Gui-Lan TIAN Shu-Hong FU Jian\*

(Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199, China)

**Abstract:** [Objective] To identify the marine bacteria SSQ500 with antitumor activity, and to

\*通讯作者: Tel: 86-898-66982118; ✉: Fujian.hnmc@163.com

收稿日期: 2012-07-26; 接受日期: 2013-01-11

study the antitumor mechanism of fermentation products. **[Methods]** The strain SSQ500 was identified using its morphological characteristics, physiological, biochemical properties and 16S rDNA gene sequence. The tumor cell was collected after different concentration activity compounds acted on difference time. The inverse proportion of apoptosis of the liver cancer cell SMMC-7721 was analyzed by flow cytometry. To study the protein expression by examine Caspase3, Caspase8. **[Results]** The strain SSQ500 was identified belong to *Myxococcaceae* sp.. The activity compound SSQ produced by this bacteria can induce SMMC-7721 cell to apoptosis by up-regulate the expressions of Caspase3, Caspase8. **[Conclusion]** The SSQ500 belongs to *Myxococcaceae* sp., and the fermentation product of this bacteria can induce tumor cell to apoptosis. That may be related to up-regulate the expressions of Caspase3, Caspase8.

**Keywords:** Marine bacteria, *Myxococcaceae* sp., Identification, Antitumor, Cell apoptosis

随着诸多环境因素的改变, 癌症已日趋成为一种可怕的人类疾病。约占海洋生物总量 90% 以上的海洋细菌、放线菌、蓝细菌、真菌、微藻类、海藻、红树林和其它盐生植物等海洋资源为发现新的抗肿瘤药物提供了重要的机会<sup>[1]</sup>。海洋水藻和细菌为人类提供了取之不尽的化合物资源, 包括许多具有生物活性的次级代谢产物<sup>[2]</sup>。Caspase 是一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶, 共有 14 个成员, 其中 Caspase3 和 Caspase8 与细胞凋亡密切相关。我们从海洋细菌 SSQ500 发酵液中获得了初步纯化的抗肿瘤活性物质 SSQ, SSQ 能诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 发生凋亡, 并观察 SSQ 在诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 发生凋亡时 Caspase3 和 Caspase8 蛋白的变化, 以进一步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** SSQ500, 是本实验室分离自海洋沉积物的一株海洋细菌。摇瓶发酵培养基为: 葡萄糖 1.5%、燕麦 3.0%、酵母粉 0.4% 和牛肉膏 0.8%; 最佳发酵条件为: pH 7, 培养温度 24 °C–28 °C, 种龄 24 h, 接种量 0.5%–1.0%, 转速 150–180 r/min

和发酵时间 72 h。

**1.1.2 细胞株:** SMMC-7721, 购自中国科学院上海细胞库。

**1.1.3 主要试剂:** RPMI1640 细胞培养基、碘化丙啶(Propidium iodide, PI)和 MTT 均购于 Sigma 公司; 胎牛血清购于杭州四季青生物材料工程公司; Caspase3 和 Caspase8 活性检测试剂盒购于上海经科化学科技有限公司。

**1.1.4 主要仪器:** FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司; MK3 酶标仪购于热电(上海)仪器有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株的分类鉴定:** 通过菌株的形态学观察、生理生化特征检测和 16S rDNA 序列分析及系统发育分析, 以确定菌株的分类地位。

**1.2.2 肿瘤细胞的培养:** 人肝癌细胞 SMMC-7721 常规培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 培养箱 CO<sub>2</sub> 浓度为 5%, 培养温度为 37 °C。

**1.2.3 样品的制备:** 将菌株 SSQ5007 在优化发酵培养基中发酵 20 L, 离心后的上清液, 用等体积的氯仿萃取 3 次, 所得萃取液经减压蒸干后, 得到类白色浸膏。先将浸膏与 200–300 目的硅胶拌

样上柱(60 cm×7 cm), 分别用 90:10 (V:V)、50:50 (V:V)和 10:90 (V:V)的石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 分段收集。将各组分减压浓缩后, 进行细胞毒活性检测, 找出具有抗肿瘤活性的组分, 然后对活性组分进行薄层层析分析。层析板先用紫外显色后, 再分别用碘和硫酸显色, 展开剂为 1:1 (V/V)石油醚和乙酸乙酯, 合并层析带型相同及相似的组分。

**1.2.4 流式细胞术测定 SSQ 诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的情况:** 收集细胞(约  $5 \times 10^6$  个/mL), 1 000 r/min 离心 3 min, 弃去培养液; 3 mL PBS 洗涤 1 次, 离心去 PBS; 加入冰预冷的 70%的乙醇 4 °C 固定 1 h, 离心弃去固定液; 3 mL PBS 重悬 5 min, 400 目的筛网过滤 1 次, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃去 PBS, 用 1 mL PI 染液染色, 4 °C 避光 30 min; 流式细胞仪检测: PI 用氩离子激发荧光, 激光光波波长为 488 nm, 发射光波波长大于 630 nm, 用流式细胞仪自带分析软件细胞凋亡百分率。用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基配制 SSQ 浓度分别为 200 mg/L 和 100 mg/L, 作用时间为 24 h, 另设阴性对照(加入等量的培养基)。

**1.2.5 Caspase3 和 Caspase8 活性检测:** 采用免疫细胞化学法检测 Caspase3 和 Caspase8 蛋白的表达情况。选择 SSQ 浓度分别为 200 mg/L 和 100 mg/L, 另设阴性对照(加入等量的培养基)。处理 0、4、12 和 24 h, 每个处理设 3 个重复, 取其平均值对结果判断。按 Caspase3 和 Caspase8 蛋白试剂盒要求进行操作。

## 2 结果

### 2.1 菌株的分类鉴定

菌株 SSQ500 在海洋细菌固体培养基上培养 3 d 后, 菌落呈类白色, 不透明, 圆形, 无光泽, 直径 3 mm–6 mm, 低突起, 边缘整齐。革兰氏染

色为阴性, 菌体呈球状, 可运动, 直径约为 0.3  $\mu\text{m}$ –0.5  $\mu\text{m}$ 。能利用 D-半乳糖、D-棉籽糖、D-果糖、葡萄糖、蔗糖和甘露醇等, 淀粉酶反应为阳性, 氧化酶反应为阴性。通过对菌株 SSQ500 的 16S rDNA 扩增和测序, 并与 GenBank 中相关数据进行 BLAST 相似性分析, 结果表明, 与 SSQ500 16S rDNA 同源性较高的菌株主要为粘细菌, 其同源性最高的 *Myxococcaceae bacterium* HB01078, 同源性为 99%。系统发育树见图 1。

### 2.2 活性组分 SSQ 的初步分离纯化

收集发酵液离心后的上清液, 用等体积的氯仿萃取 3 次, 所得萃取液经减压蒸干后, 得到类白色浸膏。浸膏经 200–300 目的硅胶柱, 用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 分段收集后, 共得到 48 个组分。将各组分分别减压浓缩后, 进行细胞毒活性检测, 将具有抗肿瘤活性的组分进行薄层层析分析, 层析板先用紫外显色后, 再分别用碘和硫酸显色, 合并层析带型相同及相似的组分, 得到初步纯化的活性组分 SSQ。

### 2.3 SSQ 诱导 SMMC-7721 凋亡的作用

SSQ 诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡的结果见图 2 和表 1。结果表明, SSQ 作用后细胞凋亡率明显增高, 且凋亡率随着 SSQ 浓度的增加而上升。从图 2 中可以看出, B 和 C 中“P1”的数量较对照组 A 少, 且经过 200 mg/L SSQ 处理后“P1”比 100 mg/L SSQ 处理后的“P1”明显减少。

表 1 SSQ 对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响  
Table 1 Effect of SSQ on apoptosis rate of SMMC-7721

组别 Group	药物浓度 Drug concentration (mg/L)	细胞凋亡率 Apoptosis rate (%)
Negative	–	15.1
SSQ	100	59.7
	200	82.4

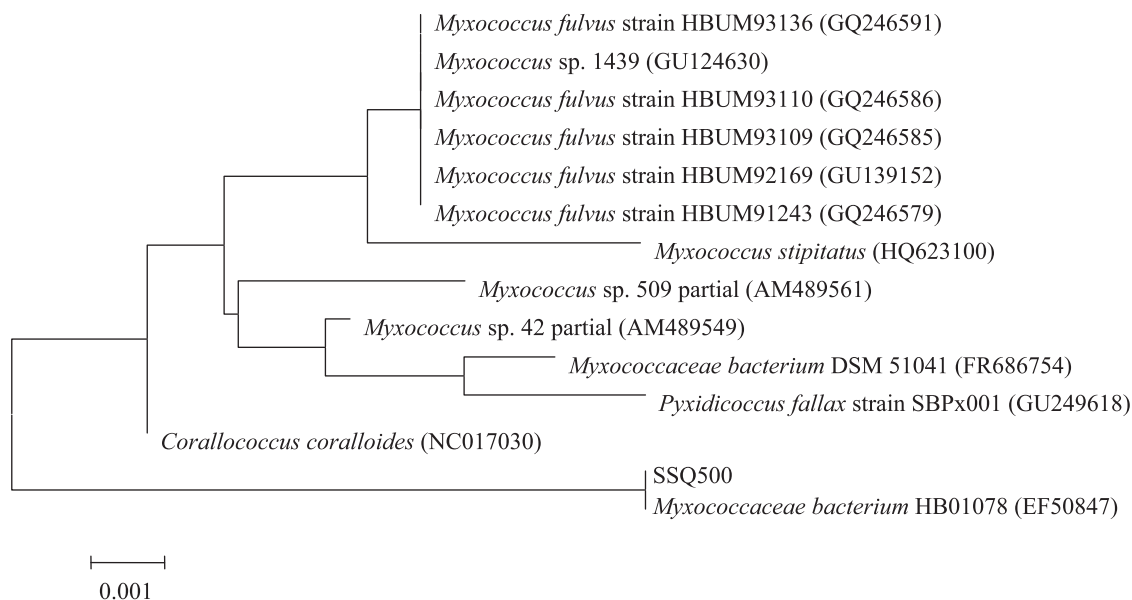


图 1 菌株 SSQ500 的 16S rRNA 基因系统发育树图

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strain SSQ500 based on 16S rRNA gene sequences

## 2.4 SSQ 对 Caspase3 和 Caspase8 蛋白的影响

Caspase3 和 Caspase8 蛋白主要定位在细胞质和细胞核上, 呈棕黄色颗粒。根据阳性细胞占计数细胞的百分比, 将免疫细胞化学法检测结果分级如下<sup>[3]</sup>: 阴性(-), 0; 弱阳性(±), 1%–5%; 阳性(+), 6%–25%; 阳性(++), 26%–50%; 阳性(+++), 51%–75%; 阳性(+++), >75%。结果表明(表 2), SSQ 作用后 SMMC-7721 细胞 Caspase3 和 Caspase8 蛋白表达增强, 阴性对照 Caspase3 和

Caspase8 蛋白表达均为阴性。

## 3 讨论

目前粘细菌分类上已确定的仅有 12 个属, 约 40 个种, 粘细菌产生的生物活性物质种类多, 包括芳香族、杂环类、醌类、大环类、聚醚类、多烯类、肽类化合物。这些产物具有多种生物活性和作用机理, 部分次级代谢产物有很高的抗肿瘤活性, 对多种肿瘤细胞有抑制作用。目前, 从粘细

表 2 SSQ 对 Caspase3 和 Caspase8 蛋白的影响  
Table 2 Effect of SSQ on protein Caspase3 and Caspase8

组别 Group	药物浓度 Drug concentration (mg/L)	作用时间 Acting time (h)	Caspase3	Caspase8
SSQ	100	0	-	-
		4	+	-
		12	+	+
		24	++	+
	200	0	-	-
		4	+	+
		12	+++	++
		24	+++	++

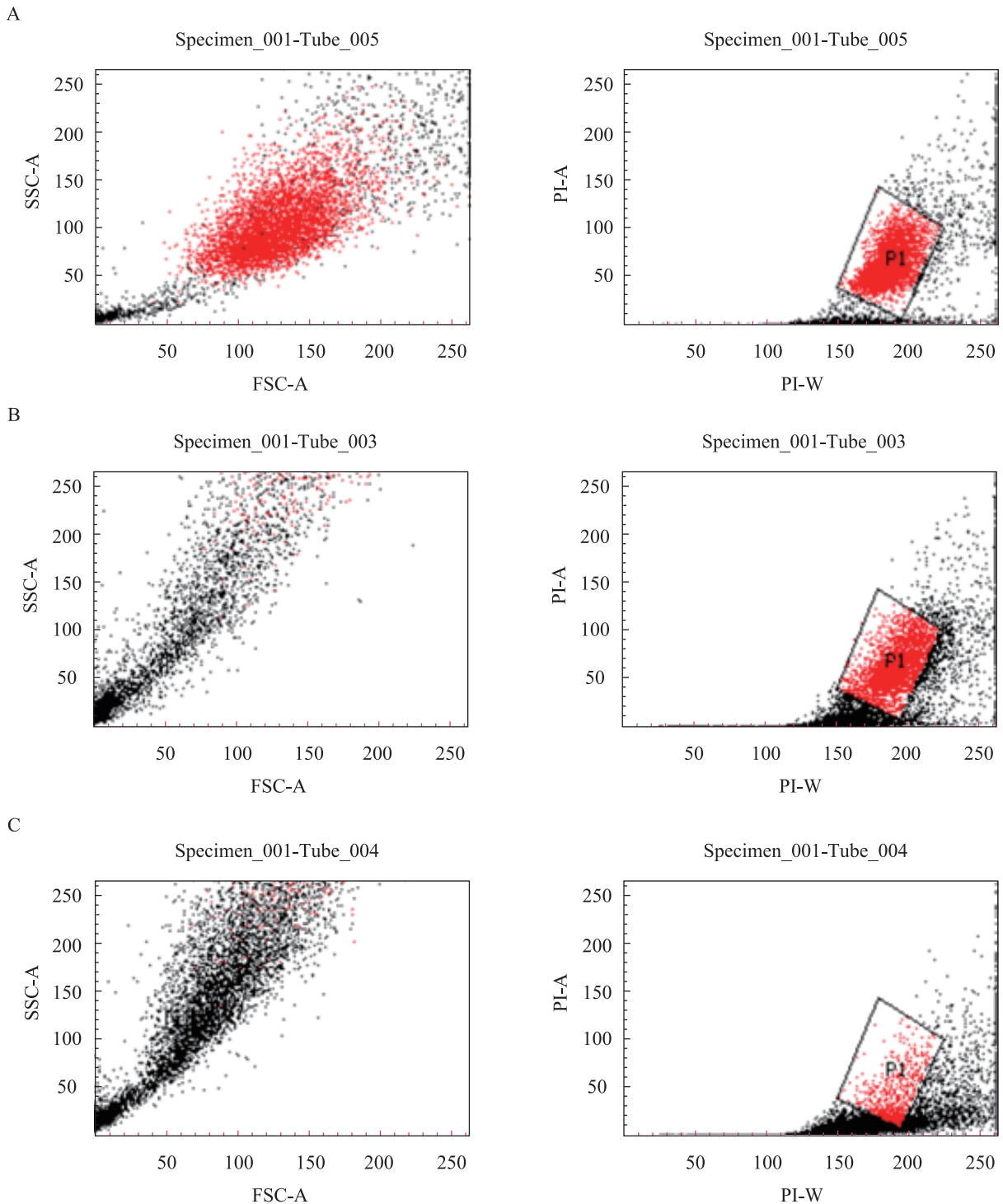


图2 SSQ对SMMC-7721细胞凋亡的影响(1 000×)

Fig. 2 Effect of SSQ on Apoptosis of SMMC-7721 (1 000×)

注: A: 阴性对照组; B: 给药组, 给药浓度为 100 mg/L; C: 给药组, 给药浓度为 200  $\mu$ g/mL. 图中的“P1”为阴性对照中任意选定的一个细胞群, 只有正常活细胞核被 PI 着色呈红色, 能被流式细胞仪检测到。

Note: A: Group of negative; B: Groups of SSQ with concentrations of 100 mg/L; C: Groups of SSQ with concentrations of 200  $\mu$ g/mL. “P1” are cells of the group of negative which were choosed arbitrarily. Only the normal living cell nucleus can be stained red by PI, and detected by flow cytometer.

菌中已发现 100 多种次级代谢产物的基本结构和 600 多种结构类似物<sup>[4]</sup>。经形态学、生理生化和 16S rDNA 序列等综合分析, 确定海洋细菌 SSQ500 为粘球菌属(*Myxococcaceae* sp.), 其发酵产物 SSQ 还有待进一步鉴定。

含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase), 已经鉴定了 14 种不同的 Caspase。在哺乳动物细胞<sup>[5-6]</sup>, Caspase 以依赖线粒体和非依赖线粒体两条途径促进细胞凋亡, 其中 Caspase3 和 Caspase8 起重要作用<sup>[7-8]</sup>, 前者是细胞凋亡的主要效应因子, 后者是细胞凋亡的启动者<sup>[9]</sup>。Caspase3 以无活性前体存在于细胞中, 当细胞进入凋亡时才被激活, 进入细胞核中产生凋亡效应<sup>[10]</sup>。Caspase8 活化后能够引发 Caspase 蛋白酶的解级联反应, 并进一步链式解激活其下游的 Caspase6、Caspase7 等同源酶, 进而激活 Caspase3<sup>[11]</sup>。本研究表明, 海洋细菌 SSQ500 的发酵产物 SSQ 的体外抗肿瘤活性可能是通过上调 Caspase3 和 Caspase8, 进而诱导肿瘤细胞凋亡, 其中 Caspase3 蛋白的表达量高于 Caspase8。然而, 黄倩等研究表明<sup>[12]</sup>: 细胞凋亡相关蛋白级联反应的终结者 Caspase3, 不仅能够直接影响细胞凋亡, 而且能够通过切割与其结合的蛋白并使其活化, 从而刺激肿瘤再增殖。Caspase3 首先活化不依赖钙的磷脂酶(iPLA), 活化的 iPLA 可刺激花生四烯酸(AA)产生, AA是前列腺素 E2 (PGE2)的前体, 通过 PGE2 实现促进肿瘤细胞生长的作用。这对于肿瘤复发的深入研究具有重要意义, 为肿瘤临床治疗提供了新的靶标。因此, 在进行 SSQ 的体内抗肿瘤活性研究时, 应注意观察, 在停药一段时间后, 肿瘤是否复发, 以充分评价其抗肿瘤疗效。

## 参 考 文 献

- [1] Sithranga Boopathy N, Kathiresan K. Anticancer drugs from Marine flora: an overview[J]. *Journal of Oncology*, 2010(10): 214186-214204.
- [2] 牛荣丽, 范晓, 韩丽君, 等. 海藻抗 A-549 和 HL-60 肿瘤细胞及抗菌活性研究[J]. *中国海洋药物*, 2003, 4: 1-4.
- [3] Reichenbach H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 27(3): 149-156.
- [4] 鞠培殿, 徐诺, 王婷, 等. 粘细菌抗肿瘤活性次级代谢产物研究进展[J]. *齐鲁药事*, 2010, 29(1): 38-43.
- [5] Nagata S. Apoptosis by death factor[J]. *Cell*, 1997, 88(3): 355-365.
- [6] Li H, Zhu H, Xu CJ, et al. Cleavage of BID by Caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis[J]. *Cell*, 1998, 94(4): 491-501.
- [7] Zhuge J, Cederbaum AI. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A prevents pyrazole plus lipopolysaccharide-induced liver injury in mice[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2009, 46(3): 406-413.
- [8] Degterew A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspase [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8543-8567.
- [9] 陈楠楠, 王伟, 张励, 等. PUVA 诱导 HL-60 细胞凋亡对 Caspase8 和 Caspase3 蛋白的影响[J]. *中国中医急症*, 2008, 17(7): 952-953.
- [10] Mouratidis PX, Colston KW, Dalgleish AG. Doxycycline induces caspase-dependent apoptosis in human pancreatic Cancer cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 120(4): 743-752.
- [11] 吴文秀, 崔利娟, 陈煜, 等. 截断逆转方对慢加急性肝衰竭大鼠肝细胞凋亡指数及 Caspase8、Caspase3 表达的影响[J]. *北京中医药*, 2012, 31(1): 62-64.
- [12] Huang Q, Li F, Liu X, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during Cancer radiotherapy[J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(7): 860-866.

[1] Sithranga Boopathy N, Kathiresan K. Anticancer