



## 研究报告

## 植物乳杆菌 CGMCC8198 干预脂代谢紊乱发挥肝癌防治作用

王畅<sup>1,2</sup> 张丽艳<sup>1,2</sup> 张同存<sup>1,2</sup> 罗学刚<sup>\*1,2</sup>1 天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室  
天津 300457

2 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心 天津 300457

**摘要:**【背景】脂代谢异常是肝癌发生发展过程中重要的代谢事件,研究发现多种乳酸菌在调节糖脂代谢过程中发挥重要作用。【目的】探究植物乳杆菌 CGMCC8198 (TCCC11824)是否会通过调节 HMGCR/SMYD3 脂代谢通路,进而对肝癌细胞的发生发展产生影响。【方法】采用不同浓度的 (5、10、15  $\mu\text{g/mL}$ ) 植物乳杆菌 CGMCC8198 破碎上清液 (*Lactobacillus plantarum* CGMCC 8198 Crushed Supernatant, LpS) 处理 HepG2 细胞不同时间。利用蛋白免疫印迹 (Western Blot)、油红染色以及实时定量荧光 PCR (Real Time Quantitative PCR, RT-qPCR) 等方法检测 LpS 对肝癌细胞脂肪变性、HMGCR/SMYD3 脂代谢关键通路的影响;通过 MTT 法、细胞划痕实验、流式细胞术检测 LpS 对脂代谢紊乱过程中 HepG2 细胞增殖、迁移和凋亡的影响。【结果】LpS 可以抑制脂代谢紊乱肝癌细胞中 HMGCR、SMYD3、SREBP-2 等基因的表达,同时也可以剂量依赖地抑制细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡。【结论】LpS 可以通过抑制脂代谢关键转录调控因子 SREBP-2 和 HMGCR 的表达来抑制肝癌细胞的脂代谢,进而促进肝癌细胞的内源性凋亡。

**关键词:** 植物乳杆菌, 肝癌, 细胞增殖, 细胞迁移, 细胞凋亡

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2017YFD0400303); Tianjin Natural Science Foundation (18JCZDJC33800); Public Service Platform Project of Industrial Microorganisms Fine Strain Breeding and Fermentation Technology (17PTGCCX00190); Young Teachers' Innovation Fund of Tianjin University of Science and Technology (2016LG06); Innovative Team Training Program of Tianjin Colleges and Universities (TD13-5015)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-22-60601104; E-mail: luoxuegang@hotmail.com

**Received:** 06-12-2020; **Accepted:** 05-03-2021; **Published online:** 26-03-2021

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2017YFD0400303); 天津市自然科学基金重点项目 (18JCZDJC33800); 工业微生物优良菌种选育与发酵技术公共服务平台项目 (17PTGCCX00190); 天津科技大学青年教师创新基金 (2016LG06); 天津市高等学校创新团队培养计划资助项目 (TD13-5015)

**\*通信作者:** Tel: 022-60601104; E-mail: luoxuegang@hotmail.com

**收稿日期:** 2020-12-06; **接受日期:** 2021-03-05; **网络首发日期:** 2021-03-26

## *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 exerts prevention and treatment of liver cancer effects by intervening in lipid metabolism disorders

WANG Chang<sup>1,2</sup> ZHANG Liyan<sup>1,2</sup> ZHANG Tongcun<sup>1,2</sup> LUO Xuegang<sup>\*1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Engineering Research Center of Microbial Metabolism and Fermentation Process Control, Tianjin 300457, China

**Abstract: [Background]** Abnormal lipid metabolism is an important metabolic event in the development of liver cancer. Role of lactic acid bacteria in regulating glucose and lipid metabolism has been widely reported. **[Objective]** To investigate whether *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 (TCCC11824) could regulate the HMGCR/SMYD3 lipid metabolism pathway, thereby affecting the occurrence and development of liver cancer cells. **[Methods]** HepG2 cells were treated with different concentrations (5, 10, 15 µg/mL) of *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 crushed supernatant (LpS) for different times. Western Blot, oil red staining and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were used to detect the effects of LpS on fatty degeneration of liver cancer cells and the key pathway of HMGCR/SMYD3 lipid metabolism; MTT, cell scratch test and flow cytometry were used to detect the effect of LpS on the proliferation, migration and apoptosis of HepG2 cells in the process of lipid metabolism disorders. **[Results]** The expression of key lipid metabolism genes such as HMGCR, SMYD3, SREBP-2 could be inhibited by LpS in lipid metabolism disorders liver cancer cells, while the proliferation and migration could be inhibited and the cell apoptosis could be promoted of liver cells in the process of lipid metabolism disorders. **[Conclusion]** LpS could inhibit the lipid metabolism of liver cancer cells by inhibiting the expression of key transcriptional regulators of lipid metabolism SREBP-2 and HMGCR, thereby promoting endogenous apoptosis of liver cancer cells.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, liver cancer, cell proliferation, cell migration, cell apoptosis

肝细胞癌是原发性肝癌中最常见的形式<sup>[1-2]</sup>, 其发病率和死亡率在我国癌症发病率和死亡率中分别排名为第四和第二。目前主要采用放疗、化疗、手术治疗、介入治疗等手段进行肝癌防治<sup>[3-6]</sup>, 但其局限性较大且患者预后较差<sup>[7-8]</sup>。因此, 探索开发新型食源性肝癌治疗药物并阐明其分子机制, 对肝癌的防控具有十分重要的意义。

代谢重编程被认为是癌症的标志之一<sup>[9]</sup>, 其中脂质代谢异常是肝癌发生发展过程中重要的代谢事件<sup>[10-11]</sup>, 主要包括脂肪酸摄取与从头合成增强、胆固醇合成增加以及脂肪酸氧化减弱等<sup>[12]</sup>。研究发现, 多个转录因子及信号通路在调控肝癌细胞脂代谢中发挥重要作用, 其中参与胆固醇合成的 HMG-CoA 还原酶(3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA

Reductase, HMGCR)、甾醇调节元件结合蛋白 2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein, SREBP-2) 在肝癌细胞中的表达水平明显升高<sup>[12-13]</sup>。近年来, HMGCR 已被认为是一个重要的新型抗肿瘤药物靶点, 抑制 HMGCR 的他汀类降脂药也因而被视为一类富有潜力的抗肿瘤药物<sup>[14]</sup>。组蛋白甲基化酶(SET and MYND Domain Containing 3, SMYD3) 与肝癌、乳腺癌等癌症的发生发展密切相关, 在最近的研究中, 我们也在国内外率先证实 SMYD3 可在糖脂代谢紊乱过程中调节 HMGCR 的转录表达<sup>[15]</sup>。

近年来, 益生菌已被广泛应用于抗菌<sup>[16]</sup>、抗氧化<sup>[17]</sup>、降脂<sup>[18]</sup>、降血糖<sup>[19]</sup>及抗肿瘤<sup>[20]</sup>等方面。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*)

是一种乳杆菌科乳杆菌属的革兰氏阳性菌,广泛存在于香肠、腌菜、青贮饲料等发酵食品中,在口腔、胃肠道等生理系统中也有分布;植物乳杆菌在10–45 °C 能够生长,最适生长温度为30–35 °C,兼性厌氧菌,能够在 pH 值 4.5–9.5 范围内生长,最适 pH 值 6.5 左右,菌种形态呈短杆状,不产芽胞。作为一种益生菌,植物乳杆菌频繁出现在大众视野,其应用也被广泛报道,例如:植物乳杆菌 LB818 可缓解高脂饮食诱导的小鼠肥胖和高脂血症<sup>[21]</sup>;植物乳杆菌 LS/07 可通过抑制细胞增殖,同时发挥免疫调节作用,进而抑制 NMU 诱导的大鼠乳腺癌的发生<sup>[22]</sup>;植物乳杆菌 L-14 无细胞提取物可通过抑制细胞增殖迁移、促进细胞凋亡进而抑制黑色素瘤的发生发展<sup>[23]</sup>。研究表明,乳酸菌发挥抗肿瘤作用的主要机制包括抑制致癌酶活性、产生抗诱变化合物、降解癌细胞中致癌物、诱导细胞凋亡等<sup>[24–25]</sup>。植物乳杆菌 CGMCC8198 (TCCC11824) 是在我们前期实验中发现的一株益生菌新菌株,研究已发现其具有降血脂、降血糖等功效<sup>[26]</sup>,而且其对黑色素瘤细胞具有一定的抑制作用<sup>[27]</sup>,但其是否可通过抑制 HMGCR/SMYD3 信号通路从而干扰肝癌细胞脂代谢及其增殖、迁移等过程,目前尚不得而知。本研究通过体外培养 HepG2 细胞,采用 MTT 法、细胞划痕实验、流式细胞术、蛋白免疫印迹和实时定量荧光 PCR 等技术对此展开研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与细胞

*L. plantarum* CGMCC8198 (TCCC11824)、人肝癌细胞 HepG2 均由本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

总胆固醇(Total Cholesterol, T-CHO)测定试剂盒、甘油三酯(Triglyceride, TG)测定试剂盒、油红染色试剂盒,南京建成生物工程研究所;Bcl-2、Bax、SMYD3、HMGCR 一抗,Abcam 公司;β-Actin 一抗,优抗生物技术(天津)有限公司;荧光二抗,

LI-COR Biosciences 公司;细胞凋亡检测试剂盒,美伦生物技术(大连)有限公司;Trizol 试剂、M-MLV 逆转录试剂盒,Invitrogen 公司。多功能微孔板检测仪,TECAN 公司;多功能细胞分析仪,Accuri 公司;实时荧光定量 PCR 仪,Applied Biosystems 公司;红外激光成像系统,LI-COR Biosciences 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养与处理

HepG2 细胞接种在含胎牛血清 10%、青霉素 100 U/mL、链霉素 0.1 mg/mL 的 DMEM-高糖培养基中,于 37 °C 恒温培养箱(CO<sub>2</sub> 含量为 5%,含饱和水蒸气)静置培养,取对数生长期细胞 1×10<sup>6</sup>/mL 接种于 6 孔板,待细胞密度达到 60%–70%,分别用 5、10、15 μg/mL 的 LpS 处理 24 h 和 48 h。

### 1.2.2 样品制备

*L. plantarum* CGMCC8198 按照 1%接种量接种于 MRS 培养基,37 °C 厌氧培养至 10<sup>8</sup> CFU/mL。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 收集菌体,将得到的菌体用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,加入与原始培养基相同体积的 PBS 重悬。根据文献[28]所述方法进行完善,于 300 W 工作 3 s、停止 4 s,超声 30 min 进行破碎。于 12 000 r/min 离心 15 min 收集破碎上清液(LpS),用 0.22 μm 滤膜过滤,–20 °C 保存备用。

### 1.2.3 MTT 法检测细胞增殖

HepG2 细胞以 3 000 个/孔的量接种于 96 孔板,用含不同浓度 LpS 的完全培养基培养 24 h 和 48 h,向每孔添加浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL,避光继续培养 4 h。4 h 后弃掉细胞培养液,每孔加入 150 μL 的 DMSO 使结晶物完全溶解。在多功能微孔板检测仪 OD<sub>490</sub> 处测量各孔的吸光度。细胞存活率使用以下公式进行计算:

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白对照组}}}{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白对照组}}} \times 100。$$

### 1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取各组培养 24、48 h 的细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,于 800 r/min 常温离心 5 min 收集细胞。

加入预冷的 PBS 清洗, 在细胞沉淀中加入 1×Bingding Buffer 使细胞密度达到  $1\times 10^6/\text{mL}$ 。取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液至新的 EP 管中, 加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5–10  $\mu\text{L}$  PI 混匀, 室温避光孵育 15 min。然后每管加入 400  $\mu\text{L}$  1×Bingding Buffer, 混匀后用流式细胞仪进行检测。

1.2.5 细胞划痕实验

HepG2 细胞以  $1\times 10^6/\text{mL}$  接种于含 2 mL 无抗生素培养基的 6 孔板中, 置于培养箱中培养至融合度达 70%–80%, 在超净台中用 10  $\mu\text{L}$  枪头在孔板中划十字或井字, 用 PBS 清洗 3–4 次, 加入 2 mL 含有不同剂量 LpS 的基础培养基, 倒置显微镜下观察拍照, 此时记为 0 h, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养并在相应时间划痕拍照, 观察划痕愈合情况。

1.2.6 实时定量荧光 PCR (Real Time Quantitative PCR, RT-qPCR)

取各组培养 24 h 的细胞, 用 Trizol 提取细胞中的总 RNA, 然后取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA 用 M-MLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环; 融解曲线, 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算最终结果。PCR 引物序列见表 1。

1.2.7 蛋白免疫印迹(Western Blot)

取各组培养 48 h 的细胞, 加入适量的蛋白裂解液收集细胞中的蛋白。用 8% 的蛋白胶进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移到硝酸纤维素膜上。将膜与相应的 HMGCR (兔抗人单克隆抗体, 稀释比为 1:1 000)、SMYD3 (兔抗人单克隆抗体, 稀释比为 1:1 000)、Bcl-2 (兔抗人单克隆抗体, 稀释比为

1:500)、Bax (鼠抗人单克隆抗体, 稀释比为 1:500)、 $\beta$ -Actin (鼠抗人单克隆抗体, 稀释比为 1:5 000) 一抗进行孵育(4  $^{\circ}\text{C}$  过夜), 之后用对应的荧光二抗室温孵育 2 h 再使用 Odyssey 红外激光成像系统进行分析。

1.2.8 荧光素酶活性检测

HepG2 细胞以  $1\times 10^5/\text{mL}$  接种于 24 孔板中, 加入含不同剂量 LpS 的完全培养基处理 24 h。弃掉培养液, 用 PBS 清洗 2–3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  蛋白裂解液, 4  $^{\circ}\text{C}$  裂解 30 min, 刮取细胞。在含 200  $\mu\text{L}$  考马斯亮蓝 G-250 的透明孔板中加入 5  $\mu\text{L}$  蛋白裂解液, 同时在白板中分别加入 50  $\mu\text{L}$  蛋白裂解液以及 100  $\mu\text{L}$  荧光底物, 置于酶标仪下进行检测。

1.2.9 统计学分析

实验数据均采用平均值±标准差的方式表示, 并通过 SPSS 17.0 使用单样本  $t$  检验或单因素 ANOVA 进行分析。 $P<0.05$  表示具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 LpS 可以抑制油酸诱导的肝细胞脂肪变性

先前的研究表明 *L. plantarum* CGMCC8198 可抑制胆盐耐受性的同时增加胆盐水解酶活性, 从而抑制高脂血症小鼠血清胆固醇的合成<sup>[26]</sup>。此外, 研究表明在肝癌发生过程中常伴随脂代谢紊乱<sup>[10]</sup>, 为进一步验证这种影响是否可在人肝癌细胞中发生, 用 0.5 mmol/L 油酸和 5、10、15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LpS 处理 HepG2 细胞 24 h。结果显示, LpS 可明显降低高脂细胞胆固醇(图 1A)和甘油三酯(图 1B)的含量, 抑制肝癌细胞脂肪变性(图 1C)。

表 1 Real Time Quantitative PCR 引物序列  
Table 1 The primer of real time quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product length (bp)
18S	F: CAGCCACCCGAGATTGAGCA R: TAGTAGCGACGGGCGGTGTG	252
SMYD3	F: AAGTTCGCAACCGCCAAGAG R: AAGGCAGCGGTCGCAGACGA	138
HMGCR	F: TGATTGACCTTCCAGAGCAAG R: CTAAAATTGCCATTCCACGAGC	102
SREBP-2	F: CCTGGGAGACATCGACGAGAT R: TGAATGACCGTTGCACTGAAG	206



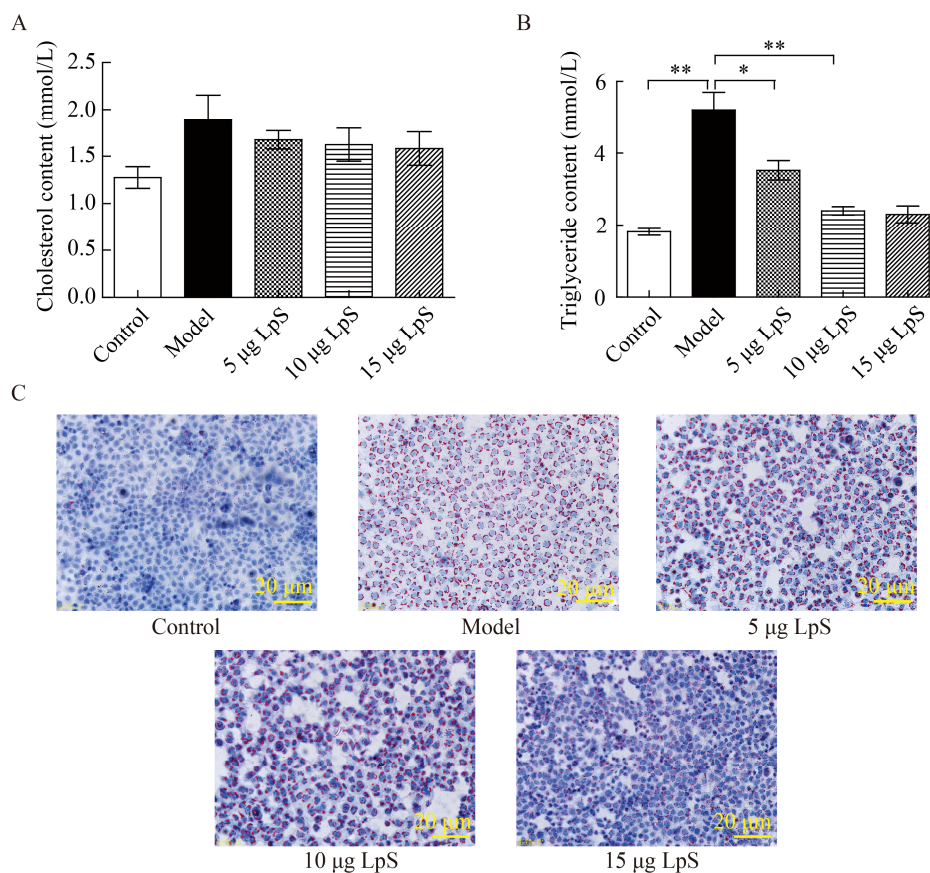


图1 *L. plantarum* CGMCC8198 破碎上清液(LpS)对肝癌细胞脂肪变性的影响

Figure 1 Effect of *L. plantarum* CGMCC8198 crushed supernatant (LpS) on fatty degeneration of liver cancer cells

注: A: 胆固醇含量变化; B: 甘油三酯含量变化; C: 脂质变化情况。Control: HepG2 细胞以 30 µL 的 PBS 处理的对照组; Model: HepG2 细胞以 30 µL 的 PBS 及 0.5 mmol/L 油酸处理的模型组。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; 下同

Note: A: Changes of cholesterol levels; B: Changes of triglyceride content; C: Changes of lipid. Control: HepG2 cells treated with 30 µL PBS; Model: HepG2 cells treated with 30 µL PBS and 0.5 mmol/L oleic acid. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; The same as below

## 2.2 LpS 可抑制 HMGCR/SMYD3 信号通路中关键基因的表达

HMGCR 作为胆固醇合成的限速酶,在胆固醇生物合成中发挥关键作用,抑制 HMGCR 的活性能减少体内胆固醇的合成,从而调节脂代谢紊乱; SREBP-2 作为 HMGCR 的上游调控因子可介导胆固醇生物合成的反馈调节,其异常表达可引起游离胆固醇、脂肪酸代谢紊乱<sup>[29]</sup>。此外,在我们先前的研究中首次证实 SMYD3 在 HMGCR 基因转录及糖脂代谢紊乱方面具有重要调节作用<sup>[15]</sup>,因此,为证明 LpS 对脂代谢紊乱的肝癌细胞中脂代谢关键基因 HMGCR、SREBP-2、SMYD3 的影响,采

用 RT-qPCR 和 Western Blot 对这 3 种基因的 mRNA 和蛋白水平进行检测,结果显示, LpS 可明显抑制油酸诱导的脂代谢紊乱肝癌细胞中 HMGCR、SREBP-2、SMYD3 的表达(图 2A、2B),同时 HMGCR 启动子荧光素酶报告基因活性实验显示, LpS 可剂量依赖性地抑制 HMGCR 的启动子活性(图 2C)。为进一步探讨 LpS 对这些基因的作用是由于直接对基因的转录表达产生影响,还是在通过干扰油酸对脂肪变性的诱导效果从而产生影响,我们直接给予 HepG2 细胞不同浓度的 LpS, RT-qPCR 和 Western Blot 结果显示, LpS 可直接下调 HMGCR、SMYD3、SREBP-2 基因的表达(图 2D、2E)。

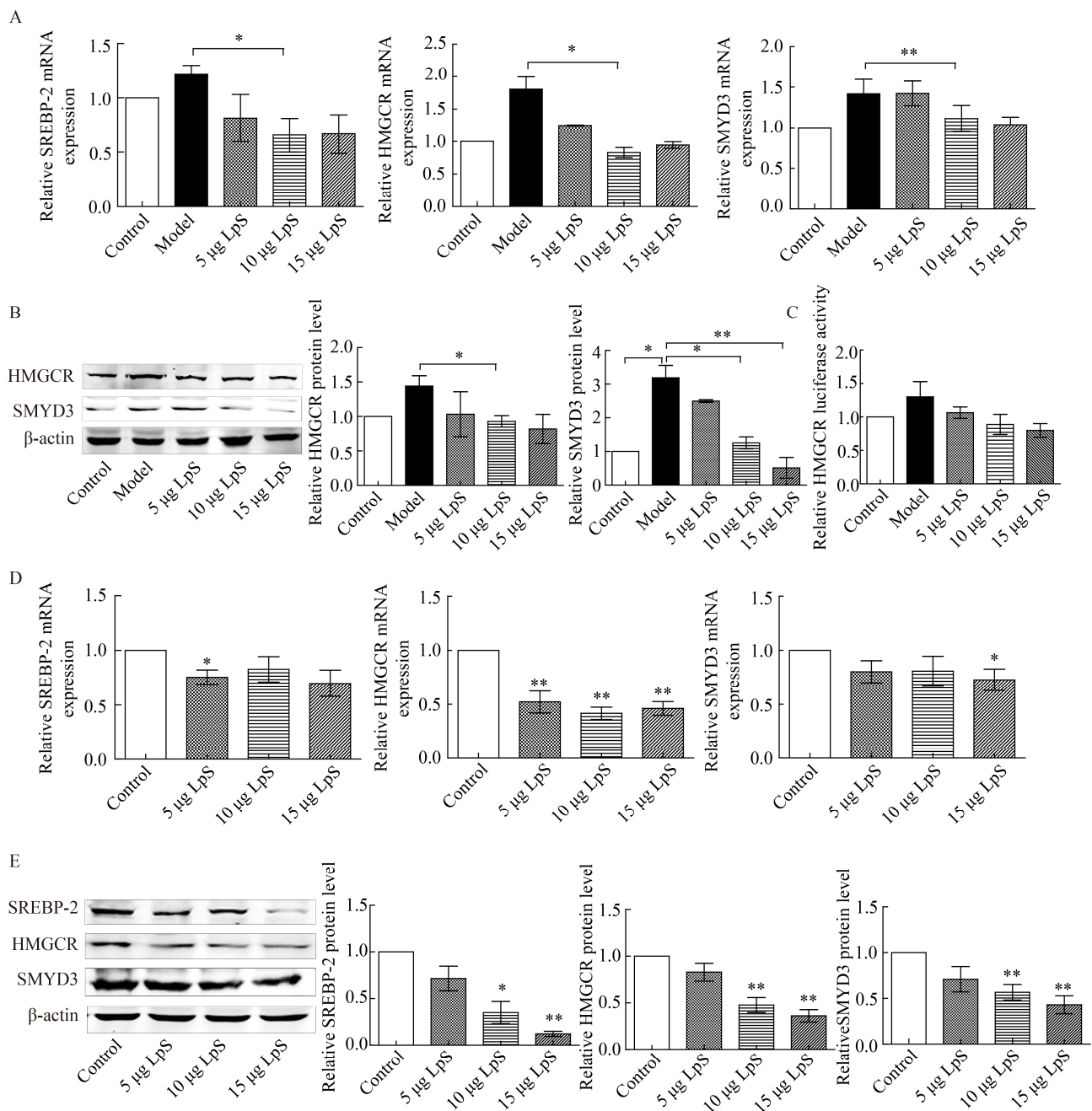


图2 *L. plantarum* CGMCC8198 破碎上清液(LpS)对 HMGCR/SMYD3 信号通路中关键基因表达的影响

Figure 2 Effect of *L. plantarum* CGMCC8198 crushed supernatant (LpS) on the expression of key genes in the HMGCR/SMYD3 signaling pathway

注: A、B: 脂代谢紊乱 HepG2 细胞中 SREBP-2、HMGCR、SMYD3 的表达情况; C: HMGCR 启动子的活性变化情况; D、E: HepG2 细胞中 SREBP-2、HMGCR、SMYD3 的表达情况。Control: HepG2 细胞以 30  $\mu$ L 的 PBS 处理的对照组; Model: HepG2 细胞以 30  $\mu$ L 的 PBS 及 0.5 mmol/L 油酸处理的模型组

Note: A, B: The expression of SREBP-2, HMGCR and SMYD3 in HepG2 cells with lipid metabolism disorders; C: Changes of the activity of the HMGCR promoter; D, E: The expression of SREBP-2, HMGCR and SMYD3 in HepG2 cells. Control: HepG2 cells treated with 30  $\mu$ L PBS; Model: HepG2 cells treated with 30  $\mu$ L PBS and 0.5 mmol/L oleic acid

### 2.3 LpS 可抑制 HepG2 细胞的增殖和迁移

研究表明,胆固醇生物合成失调是在肝癌中常见的一种代谢活动<sup>[30-33]</sup>。HMGCR 是胆固醇生物合成中的限速酶,是降低胆固醇他汀类药物的靶标。研究表明人类肝癌样品中 HMGCR 的表达明显上调,同时流行病学研究显示,他汀类药物的使用与降低肝细胞癌发生的风险有关;此外,当 SREBP-2 缺失时肝癌细胞生长和生存能力受到抑制,表明胆固醇的生物合成途径可能在这种疾病中起到了潜在的肿瘤诱导作用<sup>[34]</sup>。另外,SMYD3 在肝癌中的表达明显高于正常组织<sup>[35]</sup>,而且 SMYD3 通过调控组蛋白的甲基化可促进肝癌细胞增殖和迁移<sup>[36]</sup>。

基于上述研究,我们推测 LpS 在抑制肝癌细胞脂肪变性的同时可能存在一定的抗肿瘤作用,为进一步探究 LpS 在直接抑制胆固醇合成相关基因 HMGCR、SREBP-2、SMYD3 表达时是否可通过抑制肝癌细胞的增殖、迁移从而直接抑制肝癌的发生发展,分别给予细胞不同浓度的 LpS。MTT 结果表明, LpS 可时间和剂量依赖性地抑制 HepG2 细胞的活力(图 3A)。伤口愈合实验结果显示(图 3B、3C),与对照组相比,给予 LpS 处理可抑制 HepG2 细胞的迁移,而且随着浓度的升高,抑制作用更加明显,说明 LpS 在抑制 HMGCR、SMYD3、SREBP-2 等基因的表达时,还可直接抑制肝癌细胞的增殖和

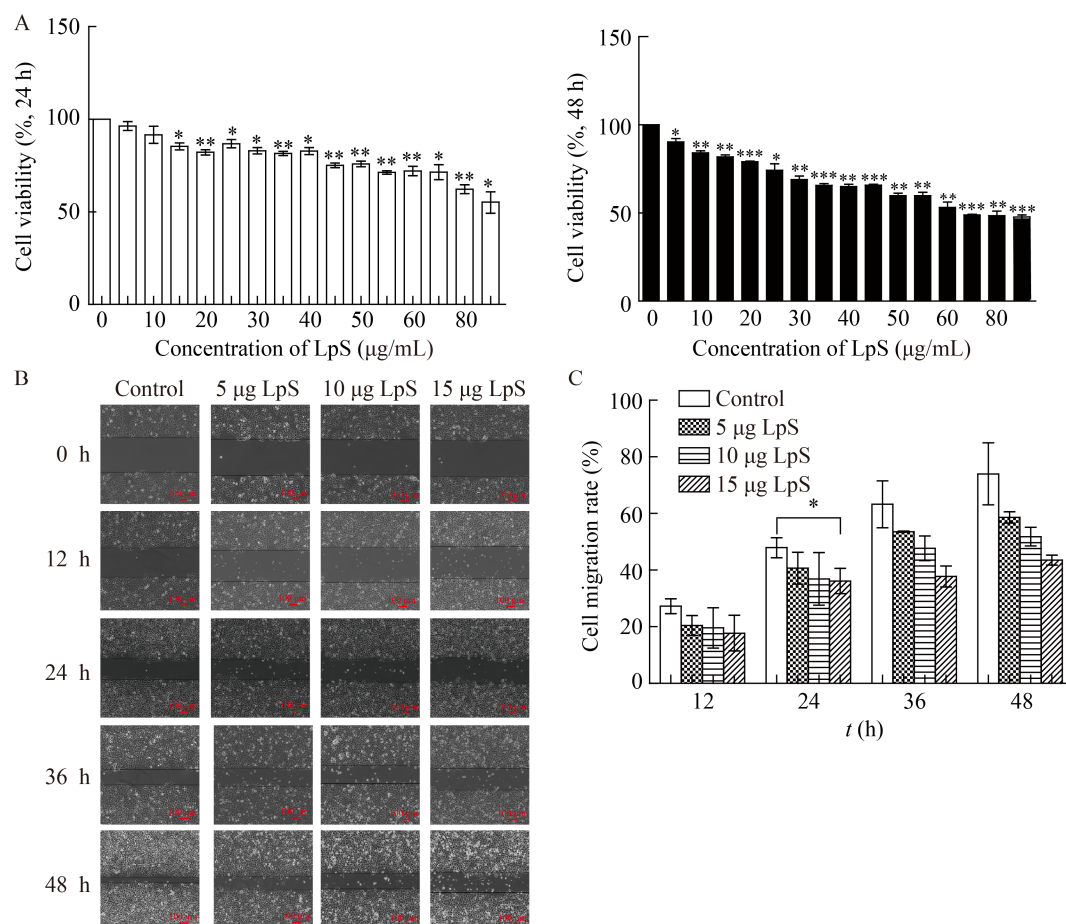


图 3 *L. plantarum* CGMCC8198 破碎上清液(LpS)对肝癌细胞增殖及迁移的影响

Figure 3 Effect of *L. plantarum* CGMCC8198 crushed supernatant (LpS) on the proliferation and migration of liver cancer cells

注: A: HepG2 细胞增殖情况; B、C: HepG2 细胞迁移情况, Control: HepG2 细胞以 30 μL 的 PBS 处理的对照组

Note: A: Proliferation of HepG2 cells; B, C: Migration of HepG2 cells, Control: HepG2 cells treated with 30 μL PBS



迁移,从而抑制肝癌细胞的发生发展。

## 2.4 LpS 可促进 HepG2 细胞的凋亡

研究发现,诱导肿瘤细胞凋亡可阻止肿瘤的发生发展,在抗肿瘤药物的筛选中已经成为新晋靶点之一;此外,采用 siRNA 干扰 SMYD3 表达后可使肝癌细胞发生明显凋亡<sup>[37]</sup>,基于上述实验结果,

我们推测 LpS 抑制 HMGCR、SREBP-2、SMYD3 表达时可能会导致肝癌细胞发生凋亡。为了验证这一假设,分别给予细胞不同浓度的 LpS。形态学观察发现,随着 LpS 处理浓度和时间的增加,不同浓度 LpS 处理组单位视野中的细胞形态逐渐变圆变亮,与对照组相比细胞密度变小(图 4A);

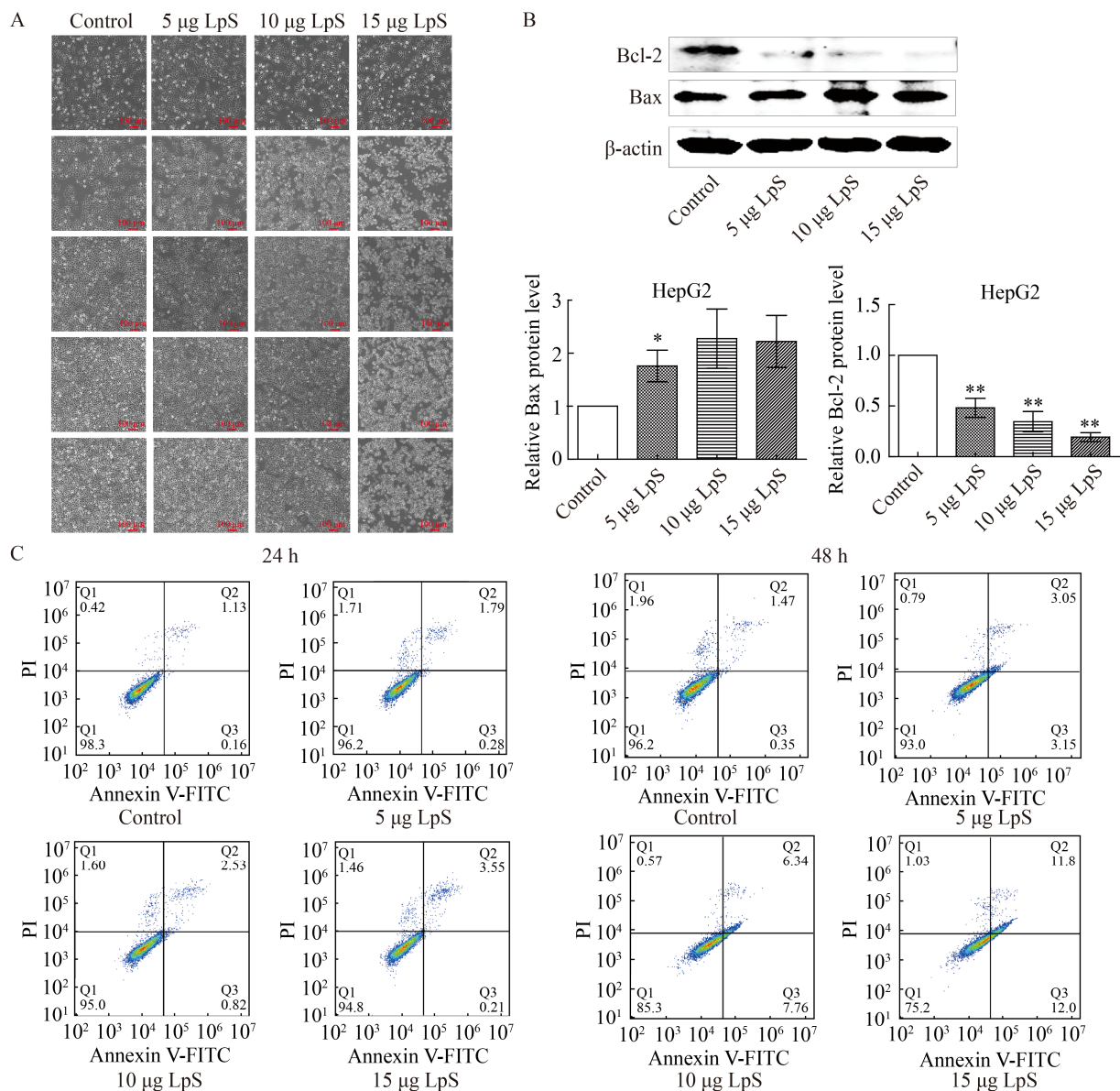


图 4 *L. plantarum* CGMCC8198 破碎上清液(LpS)对 HepG2 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of *L. plantarum* CGMCC8198 crushed supernatant (LpS) on apoptosis of HepG2 cells

注: A: HepG2 细胞形态变化; B: 凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 的蛋白表达水平, Control 为 HepG2 细胞以 30 µL 的 PBS 处理的对照组; C: HepG2 细胞细胞凋亡情况

Note: A: Morphological changes of HepG2 cells; B: The protein expression level of apoptosis-related genes Bax and Bcl-2, Control represents HepG2 cells treated with 30 µL PBS; C: Apoptosis of HepG2 cells

Western Blot 结果表明, LpS 可促进促凋亡基因 Bax, 同时抑制抗凋亡基因 Bcl-2 的表达(图 4B); 流式细胞仪分析结果显示, 与对照组相比, 不同浓度的 LpS 均可诱导 HepG2 细胞凋亡且呈现时间和剂量依赖性(图 4C)。以上结果说明 LpS 在抑制 HMGCR、SMYD3、SREBP-2 等基因的表达时, 还可直接促进肝癌细胞凋亡, 进而产生肝癌抑制作用。

### 3 结论

本研究结果证实, 植物乳杆菌 CGMCC8198 破碎上清液可抑制肝癌细胞增殖、迁移, 促进肝癌细胞凋亡, 其作用可能与其下调 HMGCR、SREBP-2、SMYD3 从而通过下调胆固醇生物合成及脂代谢紊乱有关。目前, 有关益生菌通过调节脂代谢紊乱发挥抗肿瘤作用的报道尚不多见, 研究发现部分存在降脂作用的乳酸菌同时存在一定的抗肿瘤作用, 如鼠李糖乳杆菌 LGG<sup>[38-39]</sup>、植物乳杆菌 06CC2<sup>[40-41]</sup>、干酪乳杆菌 CRL431<sup>[42-43]</sup>等; 但也有部分乳酸菌仅有降脂<sup>[44]</sup>或抗肿瘤<sup>[45]</sup>作用, 这提示不同菌株之间可能存在一定的差异性。为探究其活性物质, 我们已通过超滤、热灭活、蛋白酶处理等综合分析探索了植物乳杆菌 CGMCC8198 发挥活性的关键物质, 初步判断可能为肽类物质(数据暂未给出), 但有待于进一步深入验证。总之, 本研究为益生菌产品及肝癌治疗药物的研发提供了新的方向。

### REFERENCES

- [1] Gingold JA, Zhu DD, Lee DF, Kaseb A, Chen J. Genomic profiling and metabolic homeostasis in primary liver cancers[J]. Trends in Molecular Medicine, 2018, 24(4): 395-411
- [2] An L, Zeng HM, Ran XH, Bi XY, Qu CF, Cai JQ, Wei WQ. Progress on epidemiology of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. China Cancer, 2020, 29(11): 879-884 (in Chinese)  
安澜, 曾红梅, 冉显会, 毕新宇, 曲春枫, 蔡建强, 魏文强. 肝细胞癌和肝内胆管细胞癌流行病学研究进展[J]. 中国肿瘤, 2020, 29(11): 879-884
- [3] Donadon M, Solbiati L, Dawson L, Barry A, Sapisochin G, Greig PD, Shiina S, Fontana A, Torzilli G. Hepatocellular carcinoma: the role of interventional oncology[J]. Liver Cancer, 2016, 6(1): 34-43
- [4] Jiang J, Hu ZQ, Chen G, Xu YT, Chu G. Research advances in conversion therapy for primary liver cancer[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2020, 36(8): 1870-1873 (in Chinese)  
江杰, 胡宗强, 陈刚, 徐源通, 褚光. 原发性肝癌转化治疗研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(8): 1870-1873
- [5] Li WF, Zhou R, Pang ZD. Current status and progress of minimally invasive treatment of primary liver cancer[J]. Journal of Minimally Invasive Medicine, 2020, 15(4): 512-514 (in Chinese)  
李文锋, 周任, 庞志东. 原发性肝癌的微创治疗现状及进展[J]. 微创医学, 2020, 15(4): 512-514
- [6] Ren DD, Liu N, Zhou LL, Zhang N, Li CX, Dong B, Xu GH. Selection of treatment regimens for early-stage hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2020, 36(9): 2087-2091 (in Chinese)  
任丹丹, 刘娜, 周路路, 张楠, 李春霞, 东冰, 徐光华. 早期肝细胞癌治疗方案的选择[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(9): 2087-2091
- [7] Liu PH, Hsu CY, Hsia CY, Lee YH, Su CW, Huang YH, Lee FY, Lin HC, Huo TI. Prognosis of hepatocellular carcinoma: assessment of eleven staging systems[J]. Journal of Hepatology, 2016, 64(3): 601-608
- [8] Liu BJ, Ning Q, Zhong RL, Xia Z, Jiang ZY, Song J, Wei YJ. Effect of lupeol on invasion and metastasis of human hepatoma HepG2 and SK-HEP-1 cells and its mechanism[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(24): 6028-6035 (in Chinese)  
刘博佳, 宁青, 钟荣玲, 夏智, 姜子瑜, 宋捷, 韦英杰. 羽扇豆醇对人肝癌细胞 HepG2 和 SK-HEP-1 侵袭、转移的影响及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(24): 6028-6035
- [9] Luo JT, Li Q. Metabolic reprogramming of the *de novo* fatty acid synthesis pathway in cancer development and progression[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2017, 44(18): 939-943 (in Chinese)  
骆惊涛, 李强. 脂肪酸从头合成代谢重编程与肿瘤的发生发展[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(18): 939-943
- [10] Patterson AD, Maurhofer O, Beyoglu D, Lanz C, Krausz KW, Pabst T, Gonzalez FJ, Dufour JF, Idle JR. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling[J]. Cancer Research, 2011, 71(21): 6590-6600
- [11] Li Z, Guan M, Lin Y, Cui X, Zhang YY, Zhao ZW, Zhu JY. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by liver lipidomics[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(12): 2550
- [12] Hou YR, Li BL, Xing JL, Li JB. Metabolic reprogramming

- in liver cancer and its potential clinical implications[J]. Electronic Journal of Metabolism and Nutrition of Cancer, 2019, 6(3): 295-300 (in Chinese)
- 侯怡然, 李宝莉, 邢金良, 李积彬. 肝癌代谢重编程研究及其临床应用进展[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2019, 6(3): 295-300
- [13] Li XF, Liu ZH. Relationship between expression of SREBP2 in primary liver cancer and clinicopathological features and prognosis[J]. Journal of Tropical Medicine, 2019, 19(10): 1201-1204,1212,1328 (in Chinese)
- 李晓枫, 刘展华. SREBP2 在原发性肝癌中的表达水平与临床病理特征及预后的关系[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(10): 1201-1204,1212,1328
- [14] Longo J, Van Leeuwen JE, Elbaz M, Branchard E, Penn LZ. Statins as anticancer agents in the era of precision medicine[J]. Clinical Cancer Research, 2020, 26(22): 5791-5800
- [15] Wang QT, Jiang YJ, Luo XG, Wang C, Wang N, He HP, Zhang TC, Chen LH. Chitooligosaccharides modulate glucose-lipid metabolism by suppressing SMYD3 pathways and regulating gut microflora[J]. Marine Drugs, 2020, 18(1): 69
- [16] Ray Mohapatra A, Jeevaratnam K. Inhibiting bacterial colonization on catheters: antibacterial and antibiofilm activities of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SJ33[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019, 19: 85-92
- [17] Pourramezan Z, Kasra Kermanshahi R, Oloomi M, Aliahmadi A, Rezadoost H. *In vitro* study of antioxidant and antibacterial activities of *Lactobacillus* probiotic spp.[J]. Folia Microbiologica, 2018, 63(1): 31-42
- [18] Lew LC, Hor YY, Jaafar MH, Lau ASY, Lee BK, Chuah LO, Yap KP, Azlan A, Azzam G, Choi SB, et al. *Lactobacillus* strains alleviated hyperlipidemia and liver steatosis in aging rats via activation of AMPK[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(16): 5872
- [19] Dang FF, Jiang YJ, Pan RL, Zhou YH, Wu S, Wang R, Zhuang KJ, Zhang W, Li TJ, Man CX. Administration of *Lactobacillus paracasei* ameliorates type 2 diabetes in mice[J]. Food & Function, 2018, 9(7): 3630-3639
- [20] Motevaseli E, Khorramizadeh MR, Hadjati J, Bonab SF, Eslami S, Ghafouri-Fard S. Investigation of antitumor effects of *Lactobacillus crispatus* in experimental model of breast cancer in BALB/c mice[J]. Immunotherapy, 2018, 10(2): 119-129
- [21] Hussain A, Kwon MH, Kim HK, Lee HS, Cho JS, Lee YI. Anti-obesity effect of *Lactobacillus plantarum* LB818 is associated with regulation of gut microbiota in high-fat diet-fed obese mice[J]. Journal of Medicinal Food, 2020, 23(7): 750-759
- [22] Kassayová M, Bobrov N, Strojny L, Orendáš P, Demečková V, Jendželovský R, Kubatka P, Kisková T, Kružliak P, Adamkov M, et al. Anticancer and immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* LS/07, inulin and melatonin in NMU-induced rat model of breast cancer[J]. Anticancer Research, 2016, 36(6): 2719-2728
- [23] Park J, Kwon M, Lee J, Park S, Seo J, Roh S. Anti-cancer effects of *Lactobacillus plantarum* L-14 cell-free extract on human malignant melanoma A375 cells[J]. Molecules, 2020, 25(17): 3895
- [24] Sakatani A, Fujiya M, Ueno N, Kashima S, Sasajima J, Moriichi K, Ikuta K, Tanabe H, Kohgo Y. Polyphosphate derived from *Lactobacillus brevis* inhibits colon cancer progression through induction of cell apoptosis[J]. Anticancer Research, 2016, 36(2): 591-598
- [25] Bi KP, Han YF. Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention[J]. Shandong Chemical Industry, 2019, 48(13): 72-73 (in Chinese)
- 毕康平, 韩玉峰. 乳酸菌在免疫增强和癌症预防作用中的研究进展[J]. 山东化工, 2019, 48(13): 72-73
- [26] Gu XC, Luo XG, Wang CX, Ma DY, Wang Y, He YY, Li W, Zhou H, Zhang TC. Cloning and analysis of bile salt hydrolase genes from *Lactobacillus plantarum* CGMCC No. 8198[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(5): 975-983
- [27] Zhang CJ, Yu XT, Pan LJ, Zhou H, Zhang TC, Luo XG. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* CGMCC8198 lysis supernatant on melanogenesis[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2019, 34(3): 15-21 (in Chinese)
- 张彩姣, 俞晓亭, 潘丽娟, 周浩, 张同存, 罗学刚. 植物乳杆菌 CGMCC8198 破碎上清液对黑色素生成的抑制作用[J]. 天津科技大学学报, 2019, 34(3): 15-21
- [28] Pan RR, Wang MP, Li C, Di Y, Rong FJ, Du SW, Zhu YL, Liu LM, Zhu GQ, Jin NY. Comparison research on the cell wall-breaking methods of lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(12): 34-38 (in Chinese)
- 潘荣荣, 王茂鹏, 李昌, 邸洋, 荣凤君, 杜寿文, 朱羿龙, 刘立明, 朱国强, 金宁一. 乳酸菌破壁方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(12): 34-38
- [29] Liao YC, Song BL. Cholesterol metabolism regulation and intracellular transport mechanism[J]. Science & Technology Review, 2016, 34(13): 53-59 (in Chinese)
- 廖雅成, 宋保亮. 胆固醇的代谢调控与细胞内运输机制[J]. 科技导报, 2016, 34(13): 53-59
- [30] Zhang T, Cui G, Feng WM, Shi QL, Cui J, Li XN, Wang QC, Shen H. Correlation analysis between glycolipids metabolism and clinicopathologic features in patients with gastric cancer[J]. National Medical Journal of China, 2016, 96(32): 2545-2547 (in Chinese)
- 张婷, 崔戈, 冯文明, 石麒麟, 崔杰, 李希宁, 王旗春, 沈洪. 胃癌患者糖脂代谢指标与临床病理学特征的相关性分析[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(32): 2545-2547

- [31] Ma JM, Li W, He ZL. Analysis of the correlation between 5 tumor markers and metabolism of glucose and lipid in type 2 diabetic patients[J]. Acta Academiae Medicinae Wannan, 2019, 38(6): 528-531 (in Chinese)  
马军民, 李伟, 何泽来. 5种肿瘤标志物与2型糖尿病患者糖脂代谢的相关性分析[J]. 皖南医学院学报, 2019, 38(6): 528-531
- [32] Li N, Xu ZJ. Interaction of liver glucose and lipid metabolism in liver disease[J]. Chinese Hepatology, 2012, 17(10): 730-731 (in Chinese)  
李楠, 徐正婕. 肝病中肝脏糖脂代谢的相互作用[J]. 肝脏, 2012, 17(10): 730-731
- [33] Feng J. Correlation analysis between glycolipid metabolism and tumor markers in the middle and elderly[D]. Nanjing: Master's Thesis of Southeast University, 2018 (in Chinese)  
冯洁. 中老年人群糖脂代谢水平与肿瘤指标相关性分析[D]. 南京: 东南大学硕士学位论文, 2018
- [34] Che L, Chi WN, Qiao Y, Zhang J, Song XH, Liu Y, Li L, Jia JY, Pilo MG, Wang JX, et al. Cholesterol biosynthesis supports the growth of hepatocarcinoma lesions depleted of fatty acid synthase in mice and humans[J]. Gut, 2020, 69(1): 177-186
- [35] Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li MH, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells[J]. Nature Cell Biology, 2004, 6(8): 731-740
- [36] Jiang YH, Feng WW. Histone methyltransferase SMYD3 and tumor[J]. Tumor, 2017, 37(7): 807-816 (in Chinese)  
姜雅慧, 冯炜炜. 组蛋白甲基化转移酶 SMYD3 与肿瘤[J]. 肿瘤, 2017, 37(7): 807-816
- [37] Dong SW, Zhang P. Advances of histone methyltransferase SMYD3 in tumors[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2014, 17(9): 689-694 (in Chinese)  
董尚文, 张鹏. 组蛋白甲基化酶 SMYD3 在肿瘤中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(9): 689-694
- [38] Kumar M, Rakesh S, Nagpal R, Hemalatha R, Ramakrishna A, Sudarshan V, Ramagoni R, Shujaiddin M, Verma V, Kumar A, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Aloe vera* gel improve lipid profiles in hypercholesterolemic rats[J]. Nutrition, 2013, 29(3): 574-579
- [39] Behzadi E, Hosseini HM, Fooladi AAI. The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 110: 1-6
- [40] Yamasaki M, Minesaki M, Iwakiri A, Miyamoto Y, Ogawa K, Nishiyama K, Tsend-Ayush C, Oyunsuren T, Li YR, Nakano T, et al. *Lactobacillus plantarum* 06CC2 reduces hepatic cholesterol levels and modulates bile acid deconjugation in Balb/c mice fed a high-cholesterol diet[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(11): 6164-6173
- [41] Hiraishi N, Kanmura S, Oda K, Arima S, Kumagai K, Mawatari S, Tanoue S, Sasaki F, Hashimoto S, Ido A. Extract of *Lactobacillus plantarum* strain 06CC2 induces JNK/p38 MAPK pathway-mediated apoptosis through endoplasmic Reticulum stress in Caco2 colorectal cancer cells[J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2019, 20: 100691
- [42] Aragón F, Carino S, Perdígón G, LeBlanc MA. Inhibition of growth and metastasis of breast cancer in mice by milk fermented with *Lactobacillus casei* CRL 431[J]. Journal of Immunotherapy, 2015, 38(5): 185-196
- [43] Riaz Rajoka MS, Zhao HB, Mehwish HM, Li N, Lu Y, Lian ZY, Shao DY, Jin ML, Li Q, Zhao LQ, et al. Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk[J]. Food Research International, 2019, 123: 286-297
- [44] Shao YY, Huo DX, Peng QN, Pan YY, Jiang SM, Liu B, Zhang JC. *Lactobacillus plantarum* HNU082-derived improvements in the intestinal microbiome prevent the development of hyperlipidaemia[J]. Food & Function, 2017, 8(12): 4508-4516
- [45] Matsuzaki T, Kato I, Yokokura T, Mutai M. Augmentation of antitumor activity of *Lactobacillus casei* YIT 8018 (LC 9018) in combination with various antitumor drugs[J]. Gan to Kagaku Ryoho Cancer & Chemotherapy, 1984, 11(3): 445-451