

重组艰难梭菌毒素 B 对小鼠结肠癌 CT26 细胞的诱导凋亡作用

陈敏 曹延粉 李杉 孙丽华 刘婷婷 王菊芳*

(华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

摘要: 本文探讨了重组艰难梭菌毒素 B(rTcd B)对小鼠结肠癌 CT26 细胞的诱导凋亡作用。采用不同浓度 rTcd B 处理 CT26 细胞,通过 MTT 法检测细胞增殖抑制率;比色法测定 Caspase 3 活性;细胞形态学和流式细胞技术检测细胞凋亡。结果表明,rTcd B 显著抑制了 CT26 细胞的增殖,并呈时间-剂量依赖性;Caspase 3 活性在处理 6 h 后显著升高,至 18 h 达到最大值,与对照组相比差异显著,具有统计学意义($P<0.05$);荧光显微镜观察到典型细胞凋亡形态学变化,细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)异位到了膜外侧,细胞膜呈明亮的绿色荧光;通过流式细胞仪检测结果表明,细胞凋亡率呈时间-剂量依赖性增加。实验结果表明,重组艰难梭菌毒素 B 能够诱导小鼠结肠癌 CT26 细胞凋亡。

关键词: 艰难梭菌,重组毒素 B,细胞凋亡,CT26 细胞

The Apoptosis Induction of CT 26 Cells by Recombinant *Clostridium difficile* Toxin B

CHEN Min CAO Yan-Fen LI Shan SUN Li-Hua LIU Ting-Ting WANG Ju-Fang*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: To investigate the induction of apoptosis of mouse colonic adenocarcinoma CT26 cells by recombinant *Clostridium difficile* toxin B (rTcdB), CT26 cells were exposed to different concentrations of rTcd B. Inhibition of cell proliferation was measured by MTT assay. The activation of Caspase 3 was measured by colorimetric method. Cell morphological analysis and flow cytometry were performed to confirm cell apoptosis. rTcd B inhibited the proliferation of CT26 cells in a time- and dose-dependent manner. Caspase 3 activity in CT26 cells was elevated remarkably after rTcd B exposure for 6 h, 12 h, 18 h or 24 h, as compared with the control group. Morphological changes were observed by fluorescence microscopy. The exposure of rTcd B to CT26 cells induced a time- and dose-dependent apoptotic cell death as determined by flow cytometry analysis. The results showed that recombinant *Clostridium difficile* toxin B induced apoptosis of CT26 cells.

Keywords: *Clostridium difficile*, Recombinant toxin B, Apoptosis, CT26 cells

细菌毒素疗法是一种利用细菌毒素治疗癌症的生物疗法, 一经提出就备受关注^[1]。艰难梭菌(*Clostridium difficile*)是人类肠道中的正常菌群, 抗生素使用不当会诱发其过量繁殖, 进而引发艰难梭菌相关性疾病(*Clostridium difficile*-associated diseases, CDAD), 严重时可导致患者死亡。其主要致病因子是两种大蛋白外毒素: 毒素A(Tcd A, 308 kD)和毒素B(Tcd B, 270 kD)^[2]。Tcd A具有较弱的细胞毒性, 目前国外研究已证实, Tcd A对包括多种恶性肿瘤细胞系在内的24种人类细胞系具有细胞毒性^[3]; 国内, 也有学者分别对其体外抑瘤作用和诱导凋亡作用进行了研究^[4,5]。Tcd B的细胞毒性约为Tcd A的1000倍, 长期以来, Tcd B一直被看作是一种Tcd A依赖性毒素而没有受到重视, 但近年来, 在一些地区爆发的CDAD流行中检测到了Tcd A(-) Tcd B(+)病例^[6-8]。因此, Tcd B的细胞毒性逐渐引起国内外研究人员的关注, 目前已有其引发人类上皮细胞(包括肿瘤细胞)损伤和凋亡的报导^[9-13], 但国内尚无相关报导。本实验对rTcd B的细胞毒性和诱导凋亡作用进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 毒素, 细胞和试剂

1.1.1 毒素: 重组艰难梭菌毒素B, 其表达、分离和纯化等已另文发表^[14], 现简述如下: PCR扩增毒素基因 *tcdB*, 并将其克隆到穿梭载体 pHis1552中; 将这一克隆产物转化到巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)原生质体中; 通过木糖启动子来控制毒素的表达; 经过亲和层析等一系列步骤得到与天然毒素具有相同生物学活性的重组艰难梭菌毒素B。

1.1.2 细胞: CT26 细胞株(ATCC), 细胞培养采用DMEM培养基, 内含10%胎牛血清, 青霉素和链霉素各100 U/mL, 置于37°C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中连续培养。

1.1.3 试剂: 胰酶(Gibco); 二甲基亚砜(DMSO, 分析纯, Sigma公司); 噻唑蓝(MTT, Sigma); Caspase 3分光光度检测试剂盒(南京凯基); Annexin V, Alexa Fluor 488 conjugate(Invitrogen); 碘化吡啶(PI, 分析纯, Sigma公司)。

1.2 接种及对细胞进行毒素处理

取对数期 CT26 细胞, 制成一定浓度的细胞悬

液, 接种, 待细胞贴壁后添加毒素, 使其终浓度为0.001 ng/mL、0.01 ng/mL、0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL, 继续培养6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h。同时设置不含CT26细胞的培养液作为空白对照; 设置含CT26细胞, 但不加毒素处理(用相同体积的PBS来代替毒素)的阴性对照。

1.3 重组毒素B的细胞毒性检测

1.3.1 致细胞变圆作用: 按1.2的方法接种并对细胞进行毒素处理(3×10^4 个/mL, 200 μ L/孔于96孔培养板)。采用倒置显微镜每隔4 h计数变圆细胞数。

1.3.2 细胞增长抑制作用: 采用MTT比色法来检测rTcd B对细胞增殖的抑制作用^[15]。使用前, MTT配制成5 mg/mL的溶液, 0.22 μ m的微孔滤膜过滤除菌, 4°C避光保存。按1.2的方法接种并对细胞进行毒素处理(3×10^4 个/mL, 200 μ L/孔于96孔培养板)。培养6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h后, 加入20 μ L MTT, 继续培养4 h后除去上清液, 添加150 μ L DMSO, 酶标仪检测570 nm处的吸光值。细胞生长抑制率按下列公式计算: 抑制率(%)=(对照组OD₅₇₀值-实验组OD₅₇₀值)/(对照组OD₅₇₀值-空白组OD₅₇₀值)。

1.4 重组毒素B诱导凋亡作用检测

1.4.1 Caspase 3 活化检测: 根据Caspase 3 活性检测试剂盒说明书进行。按1.2的方法接种并对细胞进行毒素处理, 收集毒素处理的细胞(1×10^6 个), 裂解30 min, 离心, 吸取上清液, 加入同体积的2 \times 反应缓冲液及Caspase 3 反应底物, 混匀, 37°C孵育4 h, 酶标仪检测波长405 nm处的吸光值。

1.4.2 凋亡细胞膜的检测: 根据 Annexin V-Alexa Fluor 488 染料说明书进行。无菌操作, 将经过灭菌处理的盖玻片放入无菌培养皿中, 按1.2的方法接种细胞爬片, 毒素处理, 4%甲醛固定15 min, 染料覆盖15 min, 封片, 荧光显微镜观察。

1.4.3 细胞凋亡率的测定: 按1.2的方法接种并对细胞进行毒素处理, 收集毒素处理过的细胞并调整其浓度为 10^6 个/mL, Annexin V-Alexa Fluor 488 和PI双染色, 其过程为: 使用前, PI配制成575 μ g/mL的溶液, 每100 μ L细胞悬液中添加5 μ L Annexin V-Alexa Fluor 488 和10 μ L PI, 暗处反应15 min。添加400 μ L结合缓冲液, 通过流式细胞仪测定细胞凋

亡率。

1.5 数据处理

对数据采用 SAS 应用软件进行统计学分析。

2 实验结果与分析

2.1 毒素的细胞毒性检测结果分析

2.1.1 细胞变圆率测定结果分析: 培养基中添加重组毒素 B, 显著地抑制了小鼠结肠癌细胞 CT26 的增殖, 并使细胞形态明显改变。随着作用时间的延长,

细胞由梭状逐渐收缩变圆, 皱缩, 细胞膜表面出现颗粒状突起, 并最终脱落死亡。在倒置显微镜下计数不同毒素浓度、不同毒素作用时间的细胞变圆率结果见表 1。

2.1.2 细胞增殖抑制率结果分析: 不同浓度 rTcd B 对 CT26 细胞增殖均具有抑制作用, 且呈时间-剂量依赖性, 随毒素浓度增加或作用时间延长, 抑制率增大, 酶标仪测定 570 nm 处的吸光值结果见表 2; 细胞生长抑制率计算结果见图 1。

表 1 CT26 细胞在不同毒素浓度和不同作用时间下的变圆率
Table 1 Cell rounding of CT26 cells treated by rTcd B of different time and concentrations

毒素浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	细胞变圆率 The rate of cell rounding (%)					
	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
0.1	4	10	24	37	76	97
10	15	40	57	73	89	98
500	20	52	72	98	95	96

表 2 MTT 比色法测定 570 nm 处的吸光值
Table 2 The absorbance at 570 nm measured by MTT assay

作用时间 Time (h)	570 nm 处吸光值 The absorbance at 570 nm				
	空白对照 Background control	阴性对照 Negative control	毒素处理组 rTcd B treated group		
			1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
12	0.215	0.660	0.592	0.550	0.538
24	0.221	0.888	0.635	0.498	0.473
36	0.235	1.319	0.555	0.444	0.401
48	0.233	1.579	0.540	0.468	0.386

注: 空白对照=培养液(不含细胞); 阴性对照=含细胞培养液+与毒素体积相同的 PBS; 毒素处理组=含细胞培养液+毒素。

Note: Background control=culture medium; Negative control=CT26 cells in culture medium + PBS (the same volume with rTcd B); rTcd B treated group= CT26 cells in culture medium+rTcd B.

2.2 rTcd B 的诱导凋亡作用检测分析

2.2.1 Caspase 3 活性检测结果分析: Caspase 3 活性在 rTcd B 与 CT26 细胞共同培养 6 h 后显著升高, 其后, 随着作用时间延长或毒素浓度增大其活性不断增大, 至 18 h 后达到最高值, 与对照组差异显著, 具有统计学意义($P < 0.05$)。这一结果表明: rTcd B 可以激活 Caspase 3, 并且这种激活作用呈时间-剂量依赖性。另外, rTcd B 与 CT26 细胞共同培养 24 h 以上, Caspase 3 活性开始降低, 在 48 h 后, 与对照组已经没有显著差异(见图 1)。

2.2.2 荧光显微镜检测结果分析: 在荧光显微镜下观察, 毒素处理过的细胞收缩变圆, 表面可见颗粒状突起, 透过 515 nm 的滤光片可见细胞膜边缘呈绿

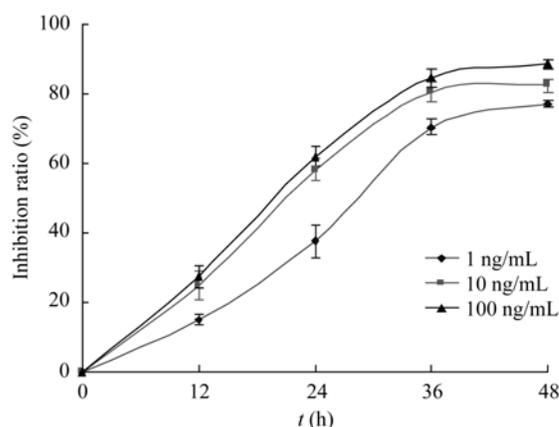


图 1 艰难梭菌重组毒素 B 对 CT26 细胞的增殖抑制作用

Fig. 1 Antiproliferative action of rTcd B on CT26 cells

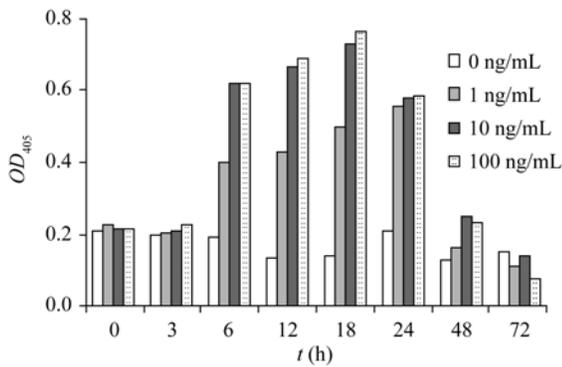


图 2 CT26 细胞在毒素 B 作用下的 Caspase3 活性表达情况

Fig. 2 The activation of Caspase 3 induced by rTcd B treatment

色荧光, 意味着膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)异位到了膜外侧, 这是细胞凋亡的一个指征。而正常细胞贴壁伸展呈梭状, 没有观察到荧光(见图 3)

2.2.3 细胞凋亡率的检测结果分析: 流式细胞仪检测显示, 正常 CT26 细胞的自发凋亡率很低, 约 1.2%, 而 rTcd B 作用于 CT26 细胞不同时间后, 细胞凋亡率明显升高, 并且呈时间-剂量依赖性, 随着作用时间延长或毒素浓度增加, 凋亡率逐渐升高(见

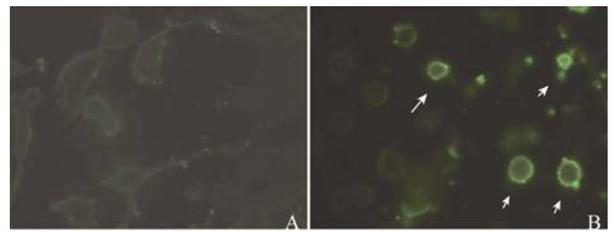


图 3 Alexa Fluor 488 染色的 CT26 细胞荧光显微镜观察结果($\times 1000$)

Fig. 3 Fluorescence micrographs of CT26 cells stained by Alexa Fluor 488($\times 1000$)

注: A: 对照组的正常 CT26 细胞; B: 10 ng/mL rTcd B 作用 36 h 的 CT26 细胞。

Note: A: Normal CT26 cells in control group; B: CT26 cells treated with 10 ng/mL rTcd B for 36 h.

图 4、图 5)。

3 讨论

本实验首先进行了重组艰难梭菌毒素 B 对小鼠结肠癌 CT26 细胞抑制作用的 MTT 检测, 结果表明, 毒素对 CT26 细胞的抑制作用明显, 并且具有时间-剂量依赖性。

其次, 本实验研究了艰难梭菌毒素 B 对 CT26

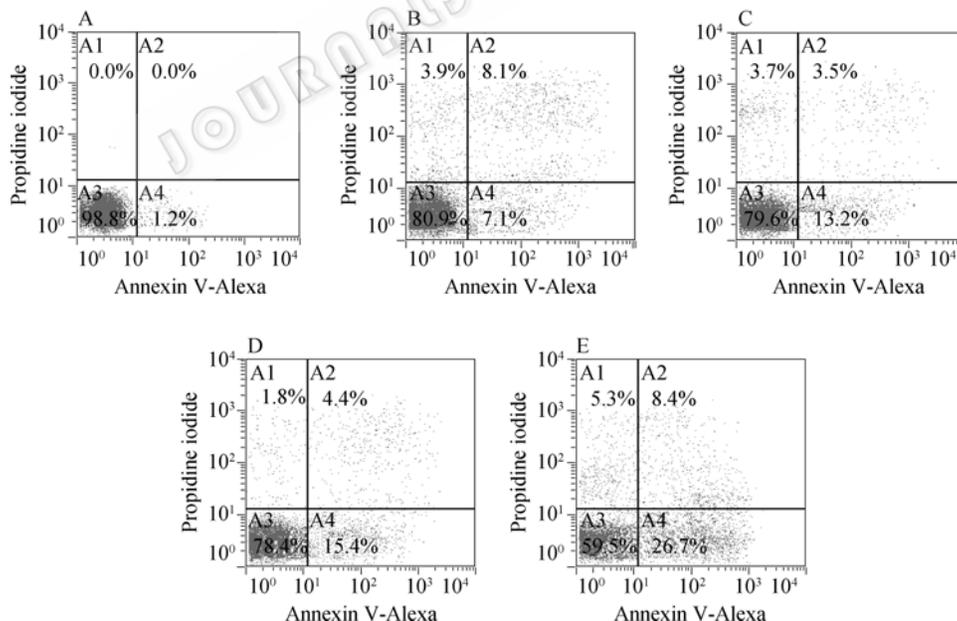


图 4 艰难梭菌重组毒素 B 诱导 CT26 细胞的凋亡率随时间变化关系

Fig. 4 The percentage of apoptotic cells induced by rTcd B treatment changed with time

注: A: 10 ng/mL rTcd B 作用 0 h; B: 10 ng/mL rTcd B 作用 12 h; C: 10 ng/mL rTcd B 作用 24 h; D: 10 ng/mL rTcd B 作用 36 h; E: 10 ng/mL rTcd B 作用 72 h; A1, A2: 死细胞; A3: 活细胞; A4: 凋亡细胞。

Note: A: CT26 cells treated with 10 ng/mL rTcd B for 0 h; B: CT26 cells treated with 10 ng/mL rTcd B for 12 h; C: CT26 cells treated with 10 ng/mL rTcd B for 24 h; D: CT26 cells treated with 10 ng/mL rTcd B for 36 h; E: CT26 cells treated with 10 ng/mL rTcd B for 72 h; A1, A2: dead cells; A3: live cells; A4: apoptotic cells.

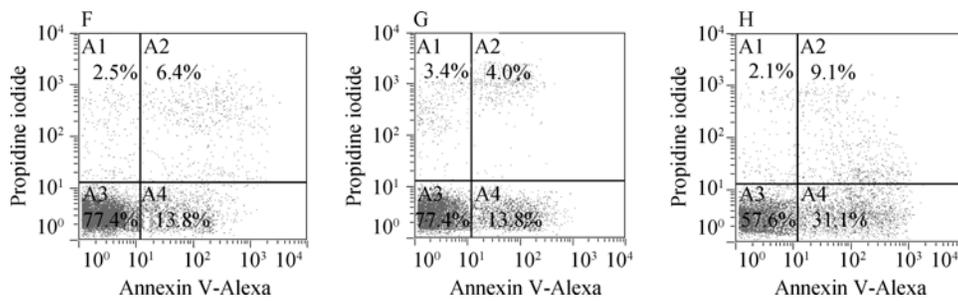


图 5 艰难梭菌重组毒素 B 诱导 CT26 细胞的凋亡率随毒素浓度变化关系

Fig. 5 The percentage of apoptotic cells induced by rTcd B treatment changed with the concentration of rTcd B

注: F: 1 ng/mL rTcd B 作用 48 h; G: 10 ng/mL rTcd B 作用 48 h; H: 100 ng/mL rTcd B 作用 48 h; A1, A2: 死细胞; A3: 活细胞; A4: 凋亡细胞。
Note: F: CT26 cells treated with 1 ng/mL rTcd B for 48 h; G: CT26 cells treated with 10 ng/mL rTcd B for 48 h; H: CT26 cells treated with 100 ng/mL rTcd B for 48 h; A1, A2: Dead cells; A3: Live cells; A4: Apoptotic cells.

细胞的凋亡诱导作用。毒素作用于细胞 6 h 后, 分光光度法检测到 Caspase 3 活性显著升高, 至 18 h 后达到了最高值, 24 h 后 Caspase 3 活性开始降低; 而对照组的 Caspase 3 活性没有明显改变。这是因为: 正常细胞的 Caspase 3 以酶原的形式存在, 没有活性; 而一旦细胞发生凋亡, 其细胞质内的 Caspase 3 就会被线粒体释放出的细胞色素 C 激活。本实验结果表明: 毒素 B 显著激活了 Caspase 3。另外, 实验中随着毒素作用时间的延长, Caspase 3 活性逐渐降低, 这可能是由于 Caspase 3 的消耗或失活所致, 但由于目前关于毒素 B 的作用机制还未深入研究, 这一问题还需进一步探讨。

Annexin V-Alexa Fluor 488 染色后, 毒素处理过的细胞在荧光显微镜下检测到了绿色荧光, 而对照组则没有观察到荧光。这是因为: 毒素处理过的细胞磷脂酰丝氨酸由细胞膜内侧异位到了细胞膜的外侧, 进而与标记了荧光素 Alexa Fluor 488 的磷脂结合蛋白 Annexin V 结合, 被激发出绿色荧光; 而对照组细胞的磷脂酰丝氨酸没有发生这种异位变化, 无法与 Annexin V 结合, 在荧光显微镜下观察不到荧光。磷脂酰丝氨酸异位是细胞凋亡的一个重要标志。

细胞进行 Annexin V -Alexa Fluor 488/PI 双染色后, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。10 ng/mL rTcd B 作用于细胞 24 h、48 h、72 h 后, 细胞凋亡率和坏死率分别为 13.2%、17.6%、26.7%和 3.5%、4.0%、8.4%。1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL rTcd B 作用于细胞 48 h 后, 细胞凋亡率和坏死率分别为 13.8%、17.6%、31.1%和 6.4%、4.0%、9.1%。这一结果表明, 毒素对细胞的作用方式是诱导其凋亡, 而不是直接

毒杀细胞; 毒素对细胞的这种诱导凋亡具有时间-剂量依赖性。

通过以上的实验, 可以得出结论, 重组艰难梭菌毒素 B 可以有效诱导肿瘤细胞凋亡。本实验的研究具有重要意义, 是国内对艰难梭菌毒素 B 的肿瘤细胞抑制作用和诱导凋亡作用的初步探讨, 为艰难梭菌毒素 B 用于癌症治疗提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Thomas Jank, Torsten Giesemann, Klaus Aktories1, *et al.* Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology*, 2007, 17(4): 15–22.
- [2] Charalabos Pothoulakis, J Thomas Lamont. Microbes microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280: 178–183.
- [3] Kushnaryow VM, Redlich PN, Sedmak JJ, *et al.* Cytotoxicity of *Clostridium difficile* toxin A for human colonic pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 1992, 52(18): 5096–5099.
- [4] 马雪瑛, 郑荣梁, 孟筱琦. 艰难梭菌 A 毒素致细胞圆缩化和致死活性的相关性研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(1): 61–62.
- [5] 赵晋, 王 楝, 赵 红, 等. 艰难梭菌 A 毒素诱导 SMMC7721 细胞和 Vero 细胞凋亡的比较研究. *癌症*, 2003, 22(7): 719–724.
- [6] al-Barrak A, Embil J, Dyck B, *et al.* An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. *Can Commun Dis Rep*, 1999, 25(7): 65–69.
- [7] Alfa MJ, Kabani A, Lysterly D, *et al.* Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium*

- difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**: 2706–2714.
- [8] Bo-Moon Shin, Eun Young Kuak, Soo Jin Yoo, *et al.* Emerging toxin A-B+ variant strain of *Clostridium difficile* responsible for pseudo-membranous colitis at a tertiary care hospital in Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, **60**(4): 333–337.
- [9] Geraldine Canny, Denise Drudy, Padraic MacMathuna, *et al.* Toxigenic *C. difficile* induced inflammatory marker expression by human intestinal epithelial cells is asymmetrical. *Life Sciences*, 2006, **78**: 920–925.
- [10] Paola Matarrese, Loredana Falzano, Alessia Fabbri, *et al.* *Clostridium difficile* Toxin B causes apoptosis in epithelial cells by thrilling mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(12): 9029–9041.
- [11] Johannes Huelsenbeck, Stefanie Dreger, Ralf Gerhard, *et al.* Difference in the cytotoxic effects of toxin B from *Clostridium difficile* strain VPI 10463 and toxin B from variant *Clostridium difficile* Strain 1470. *Infection and Immunity*, 2007, **75**(2): 801–809.
- [12] Shoshona S Le, F Alexandra Loucks, Hiroshi Udo, *et al.* Inhibition of Rac CTPase triggers a c-Jun-and Bim-dependent mitochondrial apoptotic cascade in cerebellar granule neurons. *Journal of neurochemistry*, 2005, **94**(4): 1025–1039.
- [13] Carla Fiorentini, Alessia Fabbri, Loredana Falzano, *et al.* *Clostridium difficile* toxin B induces apoptosis in intestinal cultured cells. *Infection and Immunity*, 1998, **66**(6): 2660–2665.
- [14] Guilin Yang, Boping Zhou, Jufang Wang, *et al.* Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A and B in *Bacillus megaterium*. *BMC Microbiology*, 2008, **8**(1): 192–205.
- [15] Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods*, 1993, **160**(1): 89–96.

2009年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	致病菌微进化论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	1月	80	北京	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
2	第十五届国际神经免疫, 病毒及药物学会(SNIP)年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4月	待定	湖北武汉	www.whcdc.org
3	2009国际医学真菌大会北京卫星会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5月 29-31日	400	北京	www.fungalinfection.cn/isham2009 何苗苗 010-65041809
4	第十二届全国微生物学教学科研研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7月	100	湖北武汉	孙明 027-87283455
5	食品微生物监测技术与实验室质量管理	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8月	100	山东青岛	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
6	第八届全国病毒学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	8月 17-19日	150	北京	王健伟 bdhy2009@163.com
7	全国第六届感染与免疫和生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8月	100	吉林延吉	孟繁平
8	第三届病毒学国际学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	9月	200	湖北武汉	刘芳 027-68754592
9	第十五届国际放线菌生物学大会	中国微生物学会	8月 20-25日	600	上海	白林泉 021-62932418