



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.007
China Journal of General Surgery, 2023, 32(4):529-537.

· 基础研究 ·

鼠李糖乳杆菌代谢物吲哚-3-乳酸拮抗 SP3/TNF- α 通路 促进结直肠癌细胞凋亡的机制研究

史惠文¹, 陶雪梅², 朱延朋¹

(中国人民解放军海军第九七一医院 1. 普通外科 2. 军事医学与特种学科, 山东 青岛 266000)

摘要

背景与目的: 众所周知, 肠道系统的微生物群是调节肠道健康与否的重要微环境。拥有平衡的微生物群有助于预防疾病, 特别是与胃肠系统有关的癌症。鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) 具有抗肿瘤作用, 但是具体机制尚不明确, 基于此, 本研究探讨 *L. rhamnosus* 对人结直肠癌 (CRC) 细胞凋亡的影响和潜在机制。

方法: 将人 CRC 细胞 HCT-116、HT-29 以及正常结肠上皮细胞 NCM-460 用 *L. rhamnosus* 的培养上清液 (LRCS) 或大肠埃希菌 (*E. Coli*) 的培养上清液 (ECCS) 处理后, 检测细胞活力、凋亡水平和细胞周期分布。使用 3 kDa 超滤管将细菌培养上清液分为低分子量组分 (<3 kDa) 和高分子量组分 (>3 kDa), 分析这两个组分对细胞凋亡的影响。非靶向 LC-MS/MS 以鉴定 LRCS 有效组分中的抗 CRC 细胞的代谢物, 并使用 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的上述代谢物筛选影响凋亡的关键代谢物。细胞凋亡通路 siRNA 筛选鉴定关键代谢物的作用靶标。分子对接分析关键代谢物与靶标分子的相互作用位点。

结果: LRCS 呈浓度依赖性降低 CRC 细胞的活力, 且明显促进 CRC 细胞的凋亡 (均 $P < 0.05$), 而 ECCS 无上述作用 (均 $P > 0.05$)。进一步分析发现, 仅 LRCS 低分子量能产生上述作用。非靶向 LC-MS/MS 鉴定以及验证实验表明, 吲哚-3-乳酸 (I3L) 影响 CRC 细胞凋亡的 *L. rhamnosus* 关键代谢物。通过 siRNA 筛选, 将 CRC 细胞的特异性蛋白 3 (SP3) 敲除后, I3L 对 CRC 细胞的凋亡水平、TNF- α 的表达与分泌水平均无明显影响 (均 $P > 0.05$)。分子对接发现, I3L 与 SP3 的 K551、E551 和 E552 存在相互作用。将 SP3 敲除 CRC 细胞分别转染 SP3 野生型过表达质粒和 SP3 突变型过表达质粒, I3L 可以促进前者的细胞凋亡水平和 TNF- α 分泌水平 (均 $P < 0.05$), 但对后者无此作用 (均 $P > 0.05$)。

结论: *L. rhamnosus* 能促进 CRC 细胞的凋亡, 作用机制可能与其代谢物 I3L 通过结合 SP3 的 K551、E551 和 E552 位点, 增加 TNF- α 的转录和分泌有关。

关键词

结直肠肿瘤; 鼠李糖乳杆菌; 吲哚-3-乳酸; Sp3 转录因子; 肿瘤坏死因子 α ; 细胞凋亡

中图分类号: R735.3

Mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* metabolite indole-3-lactate promoting colorectal cancer cell apoptosis through antagonizing the SP3/TNF- α pathway

SHI Huiwen¹, TAO Xuemei², ZHU Yanpeng¹

(1. Department of General Surgery 2. Department of Military Medicine and Special Sciences, the 971st Naval Hospital of PLA, Qingdao, Shandong 266000, China)

收稿日期: 2022-08-22; 修订日期: 2023-03-21。

作者简介: 史惠文, 中国人民解放军海军第九七一医院主治医师, 主要从事胃肠甲乳方面的研究。

通信作者: 朱延朋, Email: zhuyanpeng1122@126.com

Abstract

Background and Aims: As is widely known, the microbiota in the gastrointestinal tract plays an important role in regulating intestinal health. Having a balanced microbiota can help prevent diseases, particularly cancer related to the gastrointestinal system. *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) has been found to have anti-tumor effects, but the specific mechanisms are still unclear. Based on this, this study was conducted to investigate the impact and potential mechanisms of *L. rhamnosus* on apoptosis of human colorectal cancer cells (CRC).

Methods: Human CRC cells HCT-116, HT-29, and normal colon epithelial cells NCM-460 were treated with the culture supernatant of *L. rhamnosus* (LRCS) or *Escherichia coli* (*E. coli*) culture supernatant (ECCS), and cell viability, apoptosis level, and cell cycle distribution were measured. The bacterial culture supernatant was divided into low molecular weight (<3 kDa) and high molecular weight (>3 kDa) fractions using a 3 kDa ultrafiltration membrane, and the effects of these fractions on cell apoptosis were analyzed. Untargeted LC-MS/MS was used to identify anti-CRC metabolites in the effective fraction of LRCS, and these metabolites were screened at a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ to identify key metabolites affecting apoptosis. siRNA screening was performed to identify the target of the key metabolites in the apoptotic pathway. Molecular docking analysis was conducted to study the interaction sites between the key metabolites and the target molecules.

Results: LRCS exhibited a concentration-dependent decreasing effect on cell viability of CRC cells and significantly promoted apoptosis in CRC cells (all $P < 0.05$), while ECCS had no such effects (all $P > 0.05$). Further analysis revealed that only the low molecular weight fraction of LRCS was capable of producing these effects. Untargeted LC-MS/MS identification and validation experiments indicated that indole-3-lactic acid (I3L) was a key metabolite of *L. rhamnosus* that influenced CRC apoptosis. Through siRNA screening, I3L showed no significant effect on apoptosis level or TNF- α expression and secretion levels in CRC cells with knockout of the specific protein 3 (SP3) (all $P > 0.05$). Molecular docking revealed that I3L interacted with K551, E551, and E552 of SP3. CRC cells with SP3 knockout were transfected with wild-type SP3 overexpression plasmid and mutant SP3 overexpression plasmid, respectively, and I3L was found to promote cell apoptosis and TNF- α secretion in the former (all $P < 0.05$), but had no effect on those in the latter (all $P > 0.05$).

Conclusions: *L. rhamnosus* can promote apoptosis of CRC cells, and the mechanism of action may be related to its metabolite I3L binding to the K551, E551, and E552 sites of SP3, leading to increased transcription and secretion of TNF- α .

Key words

Colorectal Neoplasms; *Lactobacillus rhamnosus*; Indole-3-Lactic Acid; Sp3 Transcription Factor; Tumor Necrosis Factor α ; Apoptosis

CLC number: R735.3

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界上第三大最常被诊断出的恶性肿瘤, 也是癌症死亡的第二大原因^[1-3]。有许多与CRC致癌相关的风险因素, 包括基因改变、生活方式和环境因素^[4-7]。在过去10年中, 肠道微生物群已被证明在CRC发展中发挥关键作用^[8-10]。某些益生菌, 如嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 和鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. rhamnosus*) 已证明具有

抗癌特性^[11-13]。大多数乳杆菌属物种被归类为乳酸菌^[14]。乳酸菌通常存在于发酵食品中, 例如分解植物和奶制品中, 它们被广泛接受用作人类的益生菌^[15-17]。乳酸菌对疾病的有益作用已被广泛报道, 并且临床前研究表明其能够减少与癌症发展相关的慢性炎症^[18]。然而, 关于 *L. rhamnosus* 抗癌的分子机制尚不清晰。基于此, 本研究旨在探讨 *L. rhamnosus* 调控人CRC细胞凋亡的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Silencer™ Select 人细胞凋亡 siRNA 文库购自赛默飞公司(货号:A30095)。*L. rhamnosus* ATCC 53103 和大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. Coli*) MG1655 (*E.coli*, ATCC 700926) 购自美国典型培养物保藏中心。HCT-116 购自广州速研生物科技有限公司(货号:HCT-116)。HT-29 购自杭州馨然生物科技有限公司(货号:JNO-HT29)。NCM-460 购自广州群贤科技有限公司(货号:H110)。BHI 肉汤购自四川菲尔博思科技有限公司(货号:CM1135B)。特异性蛋白 3 (specificity protein 3, SP3) 和 TNF- α 受体 (TNF receptor superfamily member 1A, TNF-R1) 敲除的 HCT-116 和 HT-29 细胞系由 Abcam 公司设计和实施。SP3 野生型质粒和突变型质粒 (K551A、E551A、E552A) 由北京擎科生物构建。DMEM 培养基购自北京伊诺凯科技有限公司(货号:D917534-500ml)。3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基溴化四唑 (MTT) 购自深圳市益百顺科技有限公司(货号:MTT)。膜联蛋白 V-PE 购自上海群己生物科技有限公司(货号:KA0717)。7-氨基放线菌素 D (7-AAD) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(货号:A131295-25mg)。碘化丙啶购自北京百灵威科技有限公司(货号:279945)。吲哚-3-乳酸 (indole-3-lactic acid, I3L) 购自上海吉至生化科技有限公司(货号:I96470-25mg)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 两种 CRC 细胞 (HCT-116 和 HT-29) 和正常结肠上皮细胞 (NCM-460) 置于与 DMEM 培养基中培养。所有培养基均加入 10% 胎牛血清 (FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素。然后将细胞在 5% CO₂、37 °C 下培养, 在对数生长期用 0.25% 胰蛋白酶消化。*L. rhamnosus* 和 *E. coli* 在 37 °C 有氧条件下的 BHI 肉汤中培养。*E. coli* 是一种非致病性人类肠道共生细菌, 作为阴性对照。收集培养 16 h 后的 *L. rhamnosus* 的上清 (LRCS) 和 *E. coli* 的上清 (ECCS) 用作下游实验。

1.2.2 细胞活力水平的测定 通过 MTT 测定法测量细胞活力。将细胞以每孔 1.0×10^3 个细胞接种在 96 孔板上, 并在处理前孵育 24 h。细胞在 DMEM 培养基中培养, 添加不同浓度 (5%、10%、20%) 的细菌

上清液。通过 MTT 测定连续 72 h 测量细胞增殖。MTT 甲臜产物的量通过用酶标仪测量 570 nm 波长处的吸光度 (OD570) 来确定。

1.2.3 细胞凋亡水平的测定 处理前 24 h 将细胞铺在 6 孔板上, 并在含有 10% LRCS、ECCS 或 BHI 的培养基中培养。对于细胞凋亡测定, 通过用膜联蛋白 V-PE 和 7-AAD 双重染色来评估凋亡细胞的比例。膜联蛋白 V-PE 和 7-AAD 染色的组合区分了早期凋亡细胞 (膜联蛋白 V⁺、7-AAD⁻) 和晚期凋亡细胞 (膜联蛋白 V⁺、7-AAD⁺)。本研究所统计的细胞凋亡水平包含早期凋亡和晚期凋亡。

1.2.4 细胞周期分布的测定 处理前 24 h 将细胞铺在 6 孔板上, 并在含有 10% LRCS、ECCS 或 BHI 的培养基中培养。对于细胞周期分析, 用 10% LRCS、ECCS 或 BHI 处理 1 d 的细胞被固定并用 50 μ g/mL 碘化丙啶染色。使用 FASARIA 细胞分选仪分析所有染色细胞的细胞周期。

1.2.5 非靶向代谢组学和代谢物功能筛选 为了研究 LRCS 中的抗 CRC 细胞代谢物, 将 100 μ L 每个样品 (LRCS、ECCS、BHI) 加入含有内标 (L-2-氯苯丙氨酸, 2 μ g/mL) 的 400 μ L 提取溶液中。离心后, 将 75 μ L 上清液转移至新鲜玻璃小瓶中进行液相色谱质谱 (LC-MS/MS) 分析。使用配备 UPLC BEH Amide 色谱柱的 1290 Infinity 系列 UHPLC 系统进行超高效液相色谱 (UHPLC) 分离。采用如下洗脱梯度进行分析: 0~0.5 min, >95% B; 0.5~7.0 min, 95%~65% B; 7.0~8.0 min, 65%~40% B; 8.0~9.0 min, <40% B; 9.0~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12.0 min, 95% B。TripleTOF 6600 质谱仪用于在 LC-MS/MS 过程中以信息依赖的方式获取串联质谱 (MS/MS) 光谱实验。使用 R 包 XCMS (V.3.2) 实现了 LC-MS/MS 原始数据的处理。峰值注释由 R 语言实现的 CAMERA 包处理。内部 MS2 数据库、人类代谢组数据库和 METLIN 代谢物数据库用于更可靠的代谢物鉴定。通过双尾 Mann-Whitney *U* 检验鉴定出显著富集的代谢物。与 BHI 或 ECCS 相比, 富含 LRCS 且调整后 *P*<0.05 的特定代谢物被认为具有统计学意义。

1.2.6 分子对接 使用 AutoDock Vina Extended 程序进行对接研究。I3L 分子来自 PubChem 数据库 (CID: 802)。SP3 的晶体结构来自 AlphaFold 数据库 (ID: AF-Q02447-F1)。

1.3 统计学处理

使用双边 Student's *t* 检验进行两组之间的比较。

多组之间的差异采用ANOVA分析, 然后进行Tukey的多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *L.rhamnosus*抑制CRC细胞的活力

为了验证 *L.rhamnosus* 的肿瘤抑制作用, 使用两种CRC细胞 (HCT-116和HT-29) 和正常结肠上

皮细胞 (NCM-460) 作为对照进行了体外功能分析。用5%、10%、20%体积占比的LRCS或ECCS处理HCT-116、HT-29、NCM-460细胞, 发现LRCS以浓度依赖性方式明显降低CRC细胞系的活力 (均 $P < 0.05$), 但对正常结肠上皮细胞NCM-460的活力无明显影响 (均 $P > 0.05$) (图1)。这些数据表明, *L.rhamnosus*分泌的分子可以抑制CRC细胞的活力。

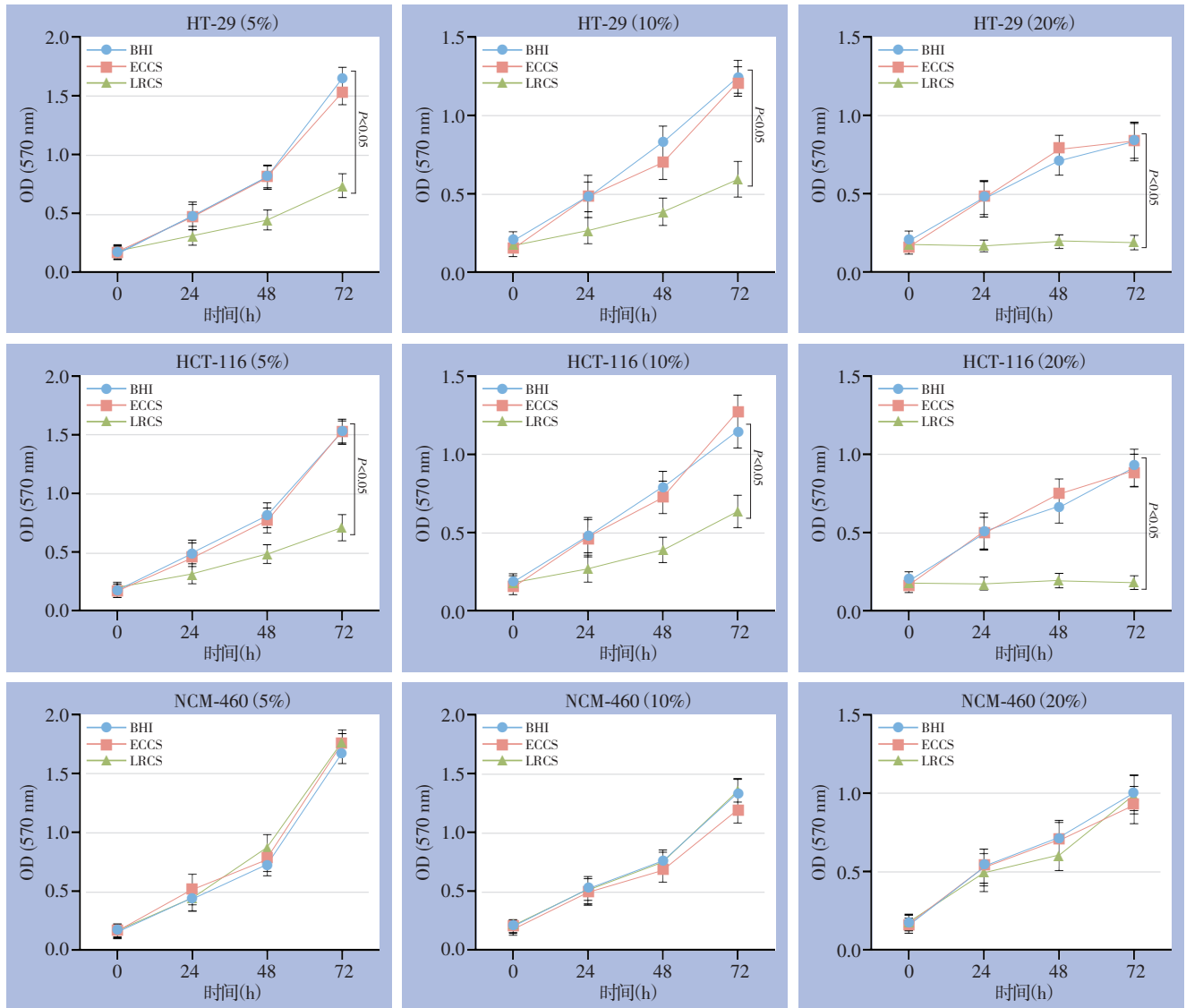


图1 不同体积占比 (5%、10%、20%) 的LRCS或ECCS对CRC细胞及正常结肠上皮细胞活力的影响

Figure 1 The effects of LRCS or ECCS with different volume ratios (5%, 10%, 20%) on the viability of CRC cells and normal colonic epithelial cells

2.2 *L.rhamnosus*促进CRC细胞凋亡

为了确定LRCS抑制CRC细胞活力的机制, 通过流式细胞术和Annexin V-PE和7-AAD染色定量评估LRCS对细胞凋亡和细胞周期分布的影响。结果显示, LRCS明显促进CRC细胞HCT-116和HT-29的凋

亡 (均 $P < 0.05$), 而对正常上皮结肠细胞NCM-460没有影响 ($P > 0.05$) (图2A)。相比之下, LRCS对CRC细胞的细胞周期分布没有影响 (均 $P > 0.05$) (图2B)。

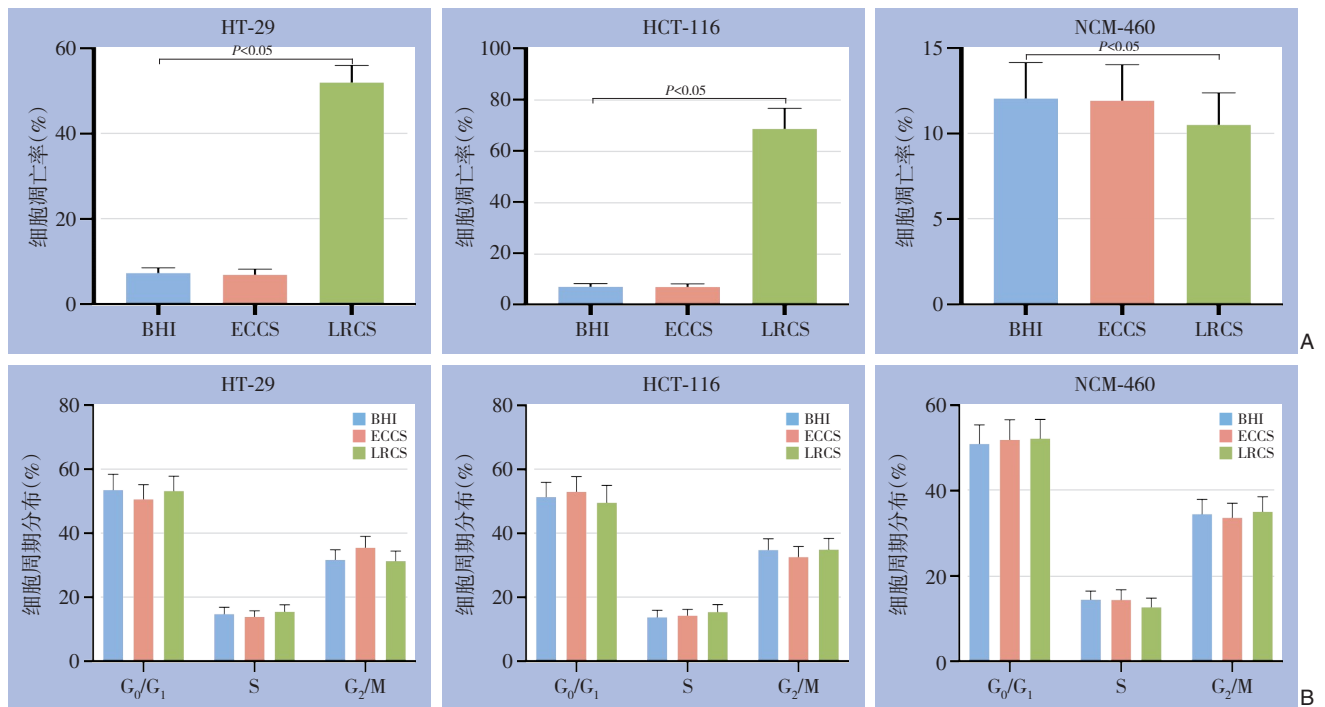


图2 LRCS或ECCS对CRC细胞及正常结肠上皮细胞凋亡和细胞周期分布的影响 A: 细胞凋亡水平; B: 细胞周期分布
 Figure 2 The effects of LRCS or ECCS on apoptosis and cell cycle distribution of CRC cells and normal colonic epithelial cells A: Apoptosis levels; B: Cell cycle distribution

2.3 L. rhamnosus代谢物I3L促进CRC细胞的凋亡

为了研究由 *L. rhamnosus* 产生的抗CRC分子的特征,使用3 kDa超滤管将细菌培养上清液分为低分子量组分 (<3 kDa)和分子量组分 (>3 kDa)。结果显示,仅在用LRCS低分子量组分处理的CRC细胞的活力明显降低 (均 $P < 0.05$),而LRCS高分子量组分对CRC细胞的活力没有抑制作用 (均 $P > 0.05$) (图3A)。此外,热灭活的LRCS和蛋白酶K处理的LRCS都保留了降低CRC细胞活力的能力 (均 $P < 0.05$) (图3B)。同时,LRCS低分子量组分处理的CRC细胞的凋亡水平明显上升 (均 $P < 0.05$),而LRCS高分子量组分对CRC细胞的凋亡水平无明显影响 (均 $P > 0.05$)。此外,热灭活的LRCS和蛋白酶K处理的LRCS都保留了促进CRC细胞凋亡的能力 (均 $P < 0.05$) (图3C)。因此,这些结果表明, *L. rhamnosus* 的抗CRC特性可以由分子量 <3 kDa的非蛋白质分子诱导。接下来进行了非靶向LC-MS/MS以鉴定LRCS低分子量组分中的抗CRC代谢物;使用5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的上述代谢物处理CRC细胞HT-29,发现代谢物I3L能够明显促进CRC细胞的凋亡,并且存在浓度依赖效应 (均 $P < 0.05$) (图3D)。

2.4 I3L拮抗SP3/TNF- α 促进CRC细胞的凋亡

为了研究I3L影响细胞凋亡的靶标,使用商业化的细胞凋亡通路siRNA进行筛选,发现敲低SP3

或肿瘤坏死因子 α (tumor necrotic factor α , TNF- α)或胱天蛋白酶3 (caspase 3, CAPS3)或胱天蛋白酶7 (caspase 7, CAPS7)或胱天蛋白酶8 (caspase 8, CAPS8)或胱天蛋白酶9 (caspase 9, CAPS9)时,I3L处理的CRC细胞HT-29的凋亡水平无明显改变 (图4A)。研究^[19]发现,CASP3、CASP7、CASP8、CASP9为TNF- α 的下游分子促凋亡因子,SP3为TNF- α 的转录因子。因此,SP3为CASP3、CASP7、CASP8、CASP9、TNF- α 的共上游分子,可能为I3L的靶标。为了验证I3L的靶标可能是SP3的猜想,构建SP3敲除的CRC细胞系,发现I3L处理对SP3敲除CRC细胞系的凋亡水平、TNF- α 的表达水平和分泌水平均无明显影响 (均 $P > 0.05$) (图4B-D)。通过分子对接发现,I3L与SP3的K551、E551和E552存在相互作用 (图4E)。构建SP3野生型过表达质粒 (SP3^{WT})和SP3突变型过表达质粒 (SP3^{MT}),并将其转染SP3敲除的CRC细胞系,发现I3L可以促进SP3^{WT}过表达的SP3敲除CRC细胞系的细胞凋亡水平和TNF- α 分泌水平 (均 $P < 0.05$),而无法改变SP3^{MT}过表达的SP3敲除CRC细胞系的细胞凋亡水平和TNF- α 分泌水平 (均 $P > 0.05$) (图4F-G)。同时,敲除TNF-R1或者TNF- α 的抗体封闭后,I3L对CRC细胞系的细胞凋亡水平无影响 (均 $P > 0.05$) (图4H-I)。

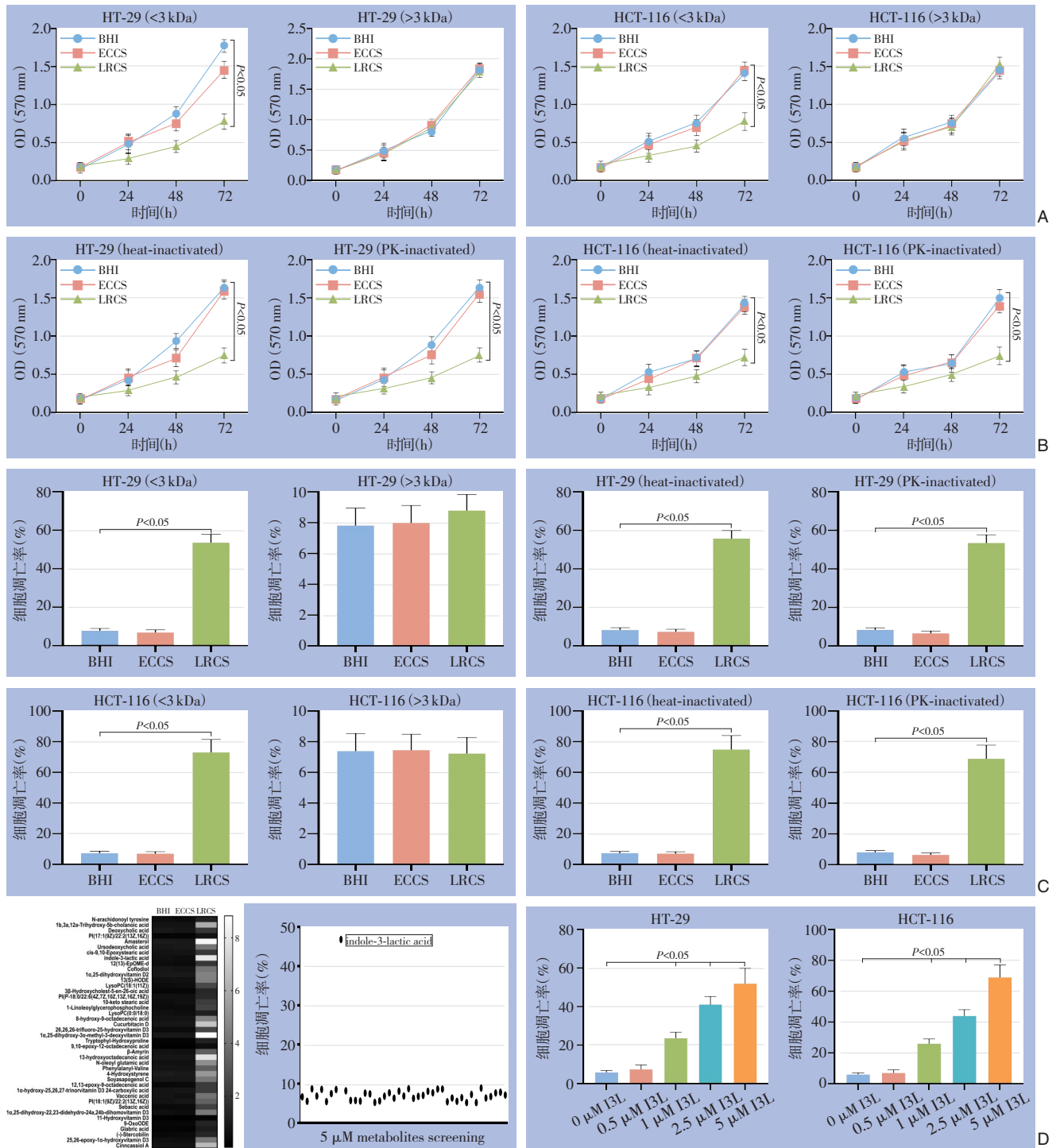


图3 影响凋亡的 *L. rhamnosus* 关键代谢物分析 A: LRCS中低分子量组分或高分子量组分对CRC细胞活力的影响; B: 经热灭活的LRCS或蛋白酶K处理的LRCS对CRC细胞活力的影响; C: LRCS中低分子量组分或高分子量组分以及经热灭活的LRCS或蛋白酶K处理的LRCS对CRC细胞凋亡的影响; D: 非靶向LC-MS/MS鉴定LRCS低分子量组分中的代谢分子, 筛选影响CRC细胞凋亡的代谢物及验证

Figure 3 Analysis of key metabolites from *L. rhamnosus* that affect apoptosis A: Effects of low molecular weight or high molecular weight components in LRCS on CRC cell viability; B: Effects of heat-inactivated LRCS or proteinase K-treated LRCS on CRC cell viability; C: Effects of low molecular weight or high molecular weight components in LRCS, as well as heat-inactivated LRCS or proteinase K-treated LRCS, on CRC cell apoptosis; D: Untargeted LC-MS/MS identification of metabolites in low molecular weight components of LRCS, screening and validation of metabolites that affect CRC cell apoptosis

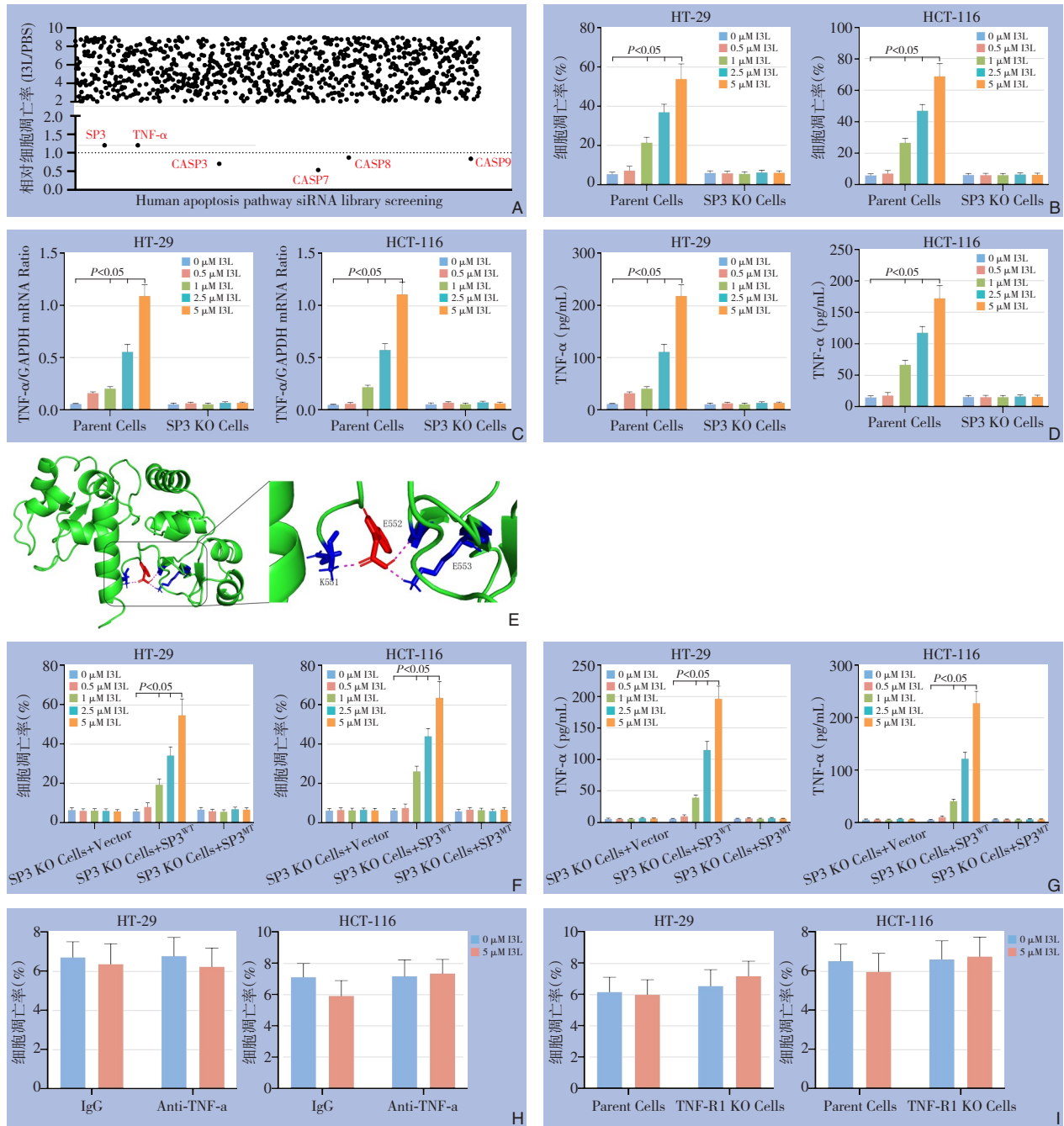


图 4 I3L 的靶标分子筛选及鉴定 A: 细胞凋亡通路 siRNA 筛选 I3L 影响细胞凋亡的靶标; B: 不同浓度 I3L 对 SP3 敲除的 CRC 细胞凋亡的影响; C: 不同浓度 I3L 对 SP3 敲除的 CRC 细胞的 TNF- α mRNA 表达的影响; D: 不同浓度 I3L 对 SP3 敲除的 CRC 细胞的 TNF- α 分泌水平的影响; E: 分子对接鉴定 I3L 与 SP3 的相互作用位点; F: 不同浓度 I3L 对过表达 SP3^{WT} 或 SP3^{MT} 且 SP3 敲除的 CRC 细胞凋亡的影响; G: 不同浓度 I3L 对过表达 SP3^{WT} 或 SP3^{MT} 且 SP3 敲除的 CRC 细胞 TNF- α 分泌水平的影响; H: 不同浓度 I3L 对 TNF- α 抗体处理或不处理的 CRC 细胞凋亡的影响; I: 不同浓度 I3L 对 TNF-R1 敲除或不敲除的 CRC 细胞凋亡的影响

Figure 4 Identification and characterization of target molecules of I3L A: SiRNA screening of apoptosis pathway to identify targets of I3L that affect apoptosis; B: Effects of different concentrations of I3L on apoptosis of CRC cells with SP3 knockout; C: Effects of different concentrations of I3L on TNF- α mRNA expression in CRC cells with SP3 knockout; D: Effects of different concentrations of I3L on TNF- α secretion levels in CRC cells with SP3 knockout; E: Molecular docking to identify the interaction sites between I3L and SP3; F: Effects of different concentrations of I3L on apoptosis of CRC cells overexpressing SP3^{WT} or SP3^{MT} and with SP3 knockout; G: Effects of different concentrations of I3L on TNF- α secretion levels in CRC cells overexpressing SP3^{WT} or SP3^{MT} and with SP3 knockout; H: Effects of different concentrations of I3L on apoptosis of CRC cells treated or not treated with TNF- α antibody; I: Effects of different concentrations of I3L on apoptosis of CRC cells with or without TNF-R1 knockout

3 讨论

在临床前实验中,某些益生菌可以抑制CRC的进展。例如,活的热灭活的 *L. rhamnosus* 通过促进人类CRC细胞的凋亡而具有抗CRC作用^[20-23]。在动物模型中, *L. rhamnosus* 可以通过增加各种促凋亡蛋白的表达来抑制CRC的发展^[24]。一些研究^[25-26]表明,经常食用益生菌可以改善肠道微生物群的不平衡,从而减少慢性炎症和致癌物质产生的机会肠道菌群失调过程中的化合物。但是,关于如何发挥其抗CRC作用并未有人解析。本研究发现 *L. rhamnosus* 分泌的I3L的促凋亡作用是其抗CRC作用的关键分子。

研究^[27]发现,免疫治疗无反应患者的微生物组缺乏乳酸杆菌,而有反应患者的微生物组中存在乳酸杆菌。此外,其他 *L. rhamnosus* 对肠道健康和疾病影响的研究报告称, *L. rhamnosus* 和其他乳杆菌通过调节白细胞介素-10水平和促进调节性T细胞活性来促进肠道中的抗炎反应^[28]。因此, *L. rhamnosus* 除了分泌I3L的直接促凋亡作用外,还可以通过其他途径发挥其抗CRC功能,是一种潜在定植后发挥抗癌功能的微生物。

在本研究中,敲低SP3或TNF- α 或CASP3或CASP7或CASP8或CASP9时,I3L处理的CRC细胞HT-29的凋亡水平无显著改变。研究^[8]发现,CASP3、CASP7、CASP8、CASP9为TNF- α 的下游分子促凋亡因子,SP3为TNF- α 的转录因子。因此,SP3为CASP3、CASP7、CASP8、CASP9、TNF- α 的共上游分子。I3L处理的SP3敲除CRC细胞系的凋亡水平、TNF- α 的表达水平和分泌水平均没有显著变化。因此,SP3是I3L的靶标。分子对接发现I3L与SP3的K551、E551和E552存在相互作用。I3L可以促进SP3^{WT}过表达的SP3敲除CRC细胞系的细胞凋亡水平和TNF- α 分泌水平,而无法改变SP3^{MT}过表达的SP3敲除CRC细胞系的细胞凋亡水平和TNF- α 分泌水平。TNF- α 诱导的经典NF- κ B通路激活或触发癌细胞程序性细胞死亡的信号成分和通路,通过CASP3、CASP7、CASP8、CASP9介导的细胞凋亡^[29]。研究发现SP3的K551、E551和E552位点是SP3活性的关键^[30]。因此,I3L通过K551、E551和E552位点与SP3相互作用,增强了SP3的转录活性,提升了TNF- α 的转录和分泌水平,促进了CRC发生细胞凋亡。

然而,本研究仍然有不足之处。本研究仅是在体外细胞环境下进行了 *L. rhamnosus* 上清液以及

其代谢物I3L的促CRC细胞的凋亡实验,其在体内环境中是否仍然具有促凋亡功能和抑制肿瘤形成是本课题组的下一步研究方向。

综上所述, *L. rhamnosus* 的代谢物I3L通过结合SP3的K551、E551和E552位点,增加了TNF- α 的转录和分泌,从而促进了CRC细胞凋亡。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:史惠文、朱延朋负责实验设计与实施及论文撰写、数据整合;陶雪梅负责技术、材料、统计学分析。

参考文献

- [1] Mohamed A, Menon H, Chulkina M, et al. Drug-microbiota interaction in colon cancer therapy: impact of antibiotics[J]. *Biomedicine*, 2021, 9(3):259. doi: 10.3390/biomedicine9030259.
- [2] Molfetta R, Paolini R. The controversial role of intestinal mast cells in colon cancer[J]. *Cells*, 2023, 12(3): 459. doi: 10.3390/cells12030459.
- [3] Bostanci E, Kocak E, Unal M, et al. Machine learning analysis of RNA-seq data for diagnostic and prognostic prediction of colon cancer[J]. *Sensors (Basel)*, 2023, 23(6): 3080. doi: 10.3390/s23063080.
- [4] Butler DSC, Cafaro C, Putze J, et al. A bacterial protease depletes c-MYC and increases survival in mouse models of bladder and colon cancer[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(6): 754-764. doi: 10.1038/s41587-020-00805-3.
- [5] Chattopadhyay I, Dhar R, Pethusamy K, et al. Exploring the role of gut microbiome in colon cancer[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021, 193(6):1780-1799. doi: 10.1007/s12010-021-03498-9.
- [6] 裴雷, 谭风波, 裴谦, 等. WAVE2与替代型结直肠癌肝转移生长模式的相关性研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(11):1493-1500. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.011.
- Pei L, Tan FB, Pei Q, et al. Correlation of WAVE2 expression with replacement histopathological growth pattern of colorectal liver metastases[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(11): 1493-1500. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.11.011.
- [7] 贾光辉, 丁一冰, 赵永强, 等. RUNX3在结直肠癌中的表达与作用及其与TGF- β /SMAD4信号通路的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(8): 1064-1070. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.009.
- Jia GH, Ding YB, Zhao YQ, et al. Expression and action of RUNX3 in colorectal cancer and its association with TGF- β /SMAD4 signaling pathway[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(8): 1064-1070. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.009.
- [8] 王立军, 王宏伟, 金克敏, 等. 结直肠癌肝转移合并同时性肺转移患者手术治疗疗效分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(8): 1071-1079. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.010.

- Wang LJ, Wang HW, Jin KM, et al. Efficacy analysis of surgical treatment for patients with colorectal cancer and simultaneous liver and lung metastases[J]. *China Journal of General Surgery*, 2022, 31(8):1071-1079. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.08.010.
- [9] Rai DB, Medicherla K, Pooja D, et al. Dendrimer-mediated delivery of anticancer drugs for colon cancer treatment[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 801. doi: 10.3390/pharmaceutics15030801.
- [10] Brown JC, Ma C, Shi Q, et al. Physical activity in stage III colon cancer: CALGB/SWOG 80702 (alliance)[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(2):243-254. doi: 10.1200/JCO.22.00171.
- [11] Sugimura N, Li Q, Chu ESH, et al. Lactobacillus gallinarum modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumorigenesis[J]. *Gut*, 2021, 71(10): 2011-2021. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323951.
- [12] Salemi R, Vivarelli S, Ricci D, et al. Lactobacillus rhamnosus GG cell-free supernatant as a novel anti-cancer adjuvant[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1):195. doi: 10.1186/s12967-023-04036-3.
- [13] Zhao XM, Liu ZX, Chen TT. Potential role of vaginal microbiota in ovarian cancer carcinogenesis, progression and treatment[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 948. doi: 10.3390/pharmaceutics15030948.
- [14] Luca L, Oroian M. Influence of different prebiotics on viability of Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rhamnosus encapsulated in alginate microcapsules[J]. *Foods*, 2021, 10(4):710. doi: 10.3390/foods10040710.
- [15] Jhun J, Cho KH, Lee DH, et al. Oral administration of Lactobacillus rhamnosus ameliorates the progression of osteoarthritis by inhibiting joint pain and inflammation[J]. *Cells*, 2021, 10(5):1057. doi: 10.3390/cells10051057.
- [16] Ju Z, Pan HJ, Qu C, et al. Lactobacillus rhamnosus GG ameliorates radiation-induced lung fibrosis via lncRNASNHG17/PTBP1/NICD axis modulation[J]. *Biol Direct*, 2023, 18(1): 2. doi: 10.1186/s13062-023-00357-x.
- [17] Bessa C, Loureiro JB, Barros M, et al. Counteracting colon cancer by inhibiting mitochondrial respiration and glycolysis with a selective PKC δ activator[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6):5710. doi: 10.3390/ijms24065710.
- [18] Alemneh ST, Emire SA, Hitzmann B. Teff-based probiotic functional beverage fermented with Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus plantarum[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2333. doi: 10.3390/foods10102333.
- [19] Beug ST, Cheung HH, Sanda, et al. The transcription factor SP3 drives TNF- α expression in response to Smac mimetics[J]. *Sci Signal*, 2019, 12(566):eaat9563. doi: 10.1126/scisignal.aat9563.
- [20] Petrova MI, Reid G, Ter Haar JA. Lactobacillus rhamnosus GR-1, a.k.a. Lactobacillus rhamnosus GR-1: past and future perspectives[J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29(8): 747-761. doi: 10.1016/j.tim.2021.03.010.
- [21] Li JZ, Li QK, Wu QH, et al. Exopolysaccharides of Lactobacillus rhamnosus GG ameliorate Salmonella typhimurium-induced intestinal inflammation via the TLR4/NF- κ B/MAPK pathway[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2023, 14(1):23. doi: 10.1186/s40104-023-00830-7.
- [22] Gholipour F, Amini M, Baradaran B, et al. Anticancer properties of curcumin-treated Lactobacillus plantarum against the HT-29 colorectal adenocarcinoma cells[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):2860. doi: 10.1038/s41598-023-29462-7.
- [23] Niu ZH, Zou MJ, Bei TT, et al. Effect of fructooligosaccharides on the colonization of Lactobacillus rhamnosus AS 1.2466T in the gut of mice[J]. *Food Sci Hum Wellness*, 2023, 12(2): 607-613. doi: 10.1016/j.fshw.2022.07.063.
- [24] Si W, Liang H, Bugno J, et al. Lactobacillus rhamnosus GG induces cGAS/STING-dependent type I interferon and improves response to immune checkpoint blockade[J]. *Gut*, 2022, 71(3):521-533. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323426.
- [25] Han SK, Shin YJ, Lee DY, et al. Lactobacillus rhamnosus HDB1258 modulates gut microbiota-mediated immune response in mice with or without lipopolysaccharide-induced systemic inflammation[J]. *BMC Microbiol*, 2021, 21(1):146. doi: 10.1186/s12866-021-02192-4.
- [26] Lippolis T, Cofano M, Caponio GR, et al. Bioaccessibility and bioavailability of diet polyphenols and their modulation of gut microbiota[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3813. doi: 10.3390/ijms24043813.
- [27] Nie PH, Wang MQ, Zhao Y, et al. Protective effect of Lactobacillus rhamnosus GG on TiO₂ nanoparticles-induced oxidative stress damage in the liver of young rats[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, 11(3):803. doi: 10.3390/nano11030803.
- [28] Zheng FL, Wang Z, Stanton C, et al. Lactobacillus rhamnosus FJSYC4-1 and Lactobacillus reuteri FGSZY33L6 alleviate metabolic syndrome via gut microbiota regulation[J]. *Food Funct*, 2021, 12(9):3919-3930. doi: 10.1039/d0fo02879g.
- [29] Wang ZY, Liang XH, Xiong AZ, et al. Helichrysetin and TNF- α synergistically promote apoptosis by inhibiting overactivation of the NF- κ B and EGFR signaling pathways in HeLa and T98G cells[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(4): 49. doi: 10.3892/ijmm.2021.4882.
- [30] Spengler ML, Kennett SB, Moorefield KS, et al. Sumoylation of internally initiated Sp3 isoforms regulates transcriptional repression via a Trichostatin A-insensitive mechanism[J]. *Cell Signal*, 2005, 17(2):153-166. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.06.007.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:史惠文,陶雪梅,朱延朋.鼠李糖乳杆菌代谢物吡啶-3-乳酸拮抗 SP3/TNF- α 通路促进结直肠癌细胞凋亡的机制研究[J].中国普通外科杂志,2023,32(4):529-537. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.007

Cite this article as: Shi HW, Tao XM, Zhu YP. Mechanism of Lactobacillus rhamnosus metabolite indole-3-lactate promoting colorectal cancer cell apoptosis through antagonizing the SP3/TNF- α pathway[J]. *Chin J Gen Surg*, 2023, 32(4): 529-537. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2023.04.007