

基于光学表面波技术探究具核梭杆菌介导的自噬与细胞折射率的关系

于丽¹,王弋嘉²,杨勇³,刘学焕²,万雪花⁴,包翠萍²,苗蓓亮⁵,
李斯琪¹,李静¹,刘筠⁶

(1. 天津中医药大学中西医结合学院,天津 301617;2. 南开大学附属人民医院转化医学院,天津 300121;
3. 之江实验室前沿基础研究中心,浙江 杭州 311100;4. 南开大学泰达生物技术研究院,天津 300457;
5. 中国中医科学院望京医院肾病内分泌科,北京 100102;6. 天津市第四中心医院影像科,天津 300142)

摘要:目的 拟利用光学表面波传感技术,探索具核梭杆菌(*fusobacterium nucleatum*, *Fn*)介导的自噬水平与细胞折射率变化的关系,初步探究光学表面波技术对癌细胞自噬水平检测的潜力。**方法** 运用 CCK-8 技术检测 *Fn* 对结直肠癌细胞增殖活力的影响,蛋白免疫印迹法及自噬双标荧光法检测 *Fn* 对自噬水平的影响,同时采用光学表面波技术检测不同 *Fn* 感染状态下细胞折射率的变化,观察其与自噬水平的相关性。**结果** 当感染复数为 100,感染时间为 4 h 时,自噬起始蛋白 1(Beclin-1)、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3(microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3,LC3)蛋白表达水平升高(均 $P<0.05$),整合体 1(sequestome, P62/SQSTM1)蛋白表达水平降低($P<0.01$),自噬水平升高;同时光学检测结果显示,HCT116、HT29 细胞的折射率亦随自噬水平的增高而升高(均 $P<0.01$)。进一步研究表明,细胞折射率的变化主要在于细胞内自噬小体水平的变化,且不受细胞增殖及胞外物质等因素影响。**结论** *Fn* 介导的自噬水平与细胞折射率具有相关性,可实时反映 *Fn* 介导的自噬水平的变化,表明光学表面波技术可作为一种快速、直观且不影响细胞活性的检测自噬水平的技术。

关键词:具核梭杆菌;结直肠癌;自噬;光学表面波技术;细胞折射率

中图分类号:Q28;R735.3

文献标志码:A

Relationship between *fusobacterium nucleatum* mediated autophagy and cell refractive index based on optical surface wave

YU Li¹, WANG Yijia², YANG Yong³, LIU Xuehuan², WAN Xuehua⁴, BAO Cuiping², MIAO Beiliang⁵,
LI Siqui¹, LI Jing¹, LIU Jun⁶

(1. School of Integrative Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;
2. Translational Medicine Research Institute of Nankai University People's Hospital, Tianjin 300121, China;
3. Research Center for Frontier Fundamental Studies, Zhejiang Laboratory, Hangzhou 311100, Zhejiang, China;
4. Teda Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Nankai University, Tianjin 300457, China;
5. Department of Nephrology and Endocrinology, Wangjing Hospital, Beijing 100102, China;
6. Department of Radiology, Tianjin Fourth Center Hospital, Tianjin 300142, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between autophagy levels mediated by *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) and changes in cellular refractive index using optical surface wave sensing technology and to preliminarily investigate the potential of optical surface wave technology for detecting autophagy levels in cancer cells. **Methods** CCK-8 was used to assess the impact of *Fn* on the proliferation activity of colorectal cancer cells. The effects of *Fn* on autoph-

agy levels were examined using both Western blotting and dual-labeling fluorescence microscopy techniques. Additionally, optical surface wave technology was employed to monitor changes in cellular refractive index under different *Fn* infection states, and to observe their correlation with autophagy levels. **Results** When multiplicity of infection was 100 and the infection time was 4 hours, the protein expression levels of Beclin-1 and LC3 were increased ($P < 0.05$), while the expression level of P62 was decreased ($P < 0.01$), indicating elevated autophagy levels. Concurrently, optical surface wave showed that the refractive indices of HCT116 and HT29 cells also increased with the elevation of autophagy levels ($P < 0.01$). Further investigation revealed that changes in cellular refractive index were primarily due to variations in autophagosome levels within the cells, and were not influenced by factors such as cell proliferation or extracellular substances. **Conclusion** The autophagy levels mediated by *Fn* correlate with cellular refractive index, indicating that optical surface wave sensing technology can dynamically reflect changes in *Fn*-mediated autophagy levels. This suggests that optical surface wave technology could serve as a rapid, intuitive, and non-invasive method to assess autophagy levels without affecting cellular viability.

Key words: *Fusobacterium nucleatum*; Colorectal cancer; Autophagy; Optical surface wave technique; Cell refractive index

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)为临床常见的恶性肿瘤,是仅次于肺癌和乳腺癌的全球第三大常见的恶性肿瘤,也是因癌症死亡的第二大主因,严重威胁人类健康^[1-3]。因饮食结构的变化,其发病率仍呈逐年上升趋势,且发病年龄日趋年轻化^[4]。CRC的发病机制复杂,越来越多研究表明,肠道菌群为结直肠癌发病的重要机制之一,肠道菌群可通过代谢产物、毒性作用、损伤肠黏膜屏障、调节免疫等途径参与CRC的发生与发展^[5]。其中,具核梭杆菌(*fusobacterium nucleatum*, *Fn*)丰度的改变与CRC发病高度相关,为CRC的重要危险因素^[6]。研究表明,与其他微生物组成员相比,*Fn*在结直肠中的丰度明显增加,并且可通过激活肿瘤相关信号通路、诱导肿瘤相关炎症反应及抑制宿主免疫应答等途径促进CRC的发展^[7-10]。Chen等^[11]发现,CRC患者中*Fn*的高丰度与肿瘤组织中自噬活性的增加以及预后的恶化相关,提示*Fn*可能通过自噬途径影响CRC疾病的进展和预后。其他研究表明,*Fn*感染能够通过多种机制促进CRC细胞自噬进而直接影响CRC患者的预后^[12-13]。因此,研究*Fn*诱发自噬的实时过程,有助于进一步理解*Fn*等肠道菌群与CRC细胞相互作用的机制。

光学表面波传感技术是指当光从光密介质进入光疏介质发生全内反射时,会有隐矢波进入光疏介质。这种构成倏逝场的隐矢波被称为光学表面波,导致p和s分量的相位发生变化。利用这一原理,倏逝场全内反射式折射率传感技术可以测量作为光疏介质的样本的折射率^[14]。而细胞折射率是表示

细胞内生物物理参数变化的重要指标,其测量有助于许多生物研究,如新陈代谢观察和癌细胞研究^[15]。利用该技术可以对肿瘤细胞进行入射探测,并通过透镜聚焦到光电探测器的感光区域,转换成电压信号进行数字呈现^[16]。利用光学对细胞进行折射率检测可以消除激发荧光检测引起的光毒性和光漂白效应,从而使细胞的活动不受任何污染和损伤,同时避免了胞内pH值及其他蛋白质聚集对标记荧光的影响,具有客观且实时反映细胞自噬水平变化的可能性。

基于此,本研究拟通过光学表面波传感技术,探索细胞折射率变化与*Fn*介导的自噬水平的关系,从*Fn*对自噬水平的影响及光学折射率的变化出发,排除可能影响光学折射率的因素,初步探究了光学表面波技术对癌细胞自噬水平检测的潜力,为光学检测在细胞病理学、抗癌药物筛选及其他生物研究方面提供借鉴参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

人结直肠癌细胞系HCT116及HT29购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.1.2 菌株

Fn ATCC25586购自河南北纳生物;大肠杆菌DH5 α 购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.3 试剂

1640细胞培养基购自美国Gibco公司;优质胎

牛血清购自大连美仑生物科技有限公司;PBS 缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3 (microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3, LC3) 荧光质粒购自北京中源合聚生物科技有限公司;无内毒素质粒小提中量试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;Lipo6000™转染试剂、Kanamycin 购自上海碧云天生物技术有限公司;Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒) 购自大连美仑生物科技有限公司;微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3B (microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B, LC3B) 及自噬起始蛋白苜氯素 1 (Beclin-1) 抗体购自上海 Abcam 贸易有限公司;螯合剂 1 (sequestome, P62/SQSTM1) 抗体购自武汉博士德生物公司;GAPDH 抗体购自武汉爱博泰克生物。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞培养液为含有 10% 血清、1% 双抗的 RPMI-1640 培养基, HCT116 与 HT29 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温细胞培养箱培养, 当细胞生长至 80%~90% 时, PBS 缓冲液洗涤两遍, 胰蛋白酶消化后进行传代, 培养至 3 代进入细胞对数生长期时用于实验。

1.2.2 *Fn* 复苏及培养

Fn 液体培养基 (北京索莱宝) 包含脑心浸出液、酵母粉、磷酸氢二钾、维生素 K1、Hemin (氯化血红素、NaOH) 溶液、刃天青指示剂、L-半胱氨酸; 固体血琼脂培养基在液体培养基基础上添加 2% 琼脂粉 (北京索莱宝科技有限公司) 与 5% 脱纤维羊血 (青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)。将细菌涂布均匀后置于厌氧培养袋内, 放入厌氧产气包及氧气指示剂, 二者均置于 37 ℃ 生化培养箱中静置培养, 待 36~48 h 后长出明显菌落时进行传代或冻存, 培养至 3 代时作为工作菌种进行实验。

1.2.3 大肠杆菌 DH5α 培养

大肠杆菌液体培养使用 LB 肉汤培养基, 固体培养使用 1.5% LB 琼脂平板。将大肠杆菌划线培养于琼脂平板中 37 ℃ 培养 12~18 h, 平板中长出单个菌落时, 挑取单菌落接种于液体培养基, 37 ℃ 摇床 180 r/min 振荡培养 12~18 h。

1.2.4 *Fn* 与结肠直肠癌细胞共培养

挑取血琼脂平板中培养的 *Fn* 单菌落于液体培养基中, 厌氧静置培养 48 h, 离心机 3 500 r/min 离

心 15 min, 弃掉原培养基, 加入 PBS 重悬, 离心 15 min 两次; 细胞贴壁后, 弃掉原培养液, PBS 洗涤 2 遍, 将细胞培养液更换为仅含 10% 血清的 1 640 培养液, 根据感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0 (对照组)/10/100/500/1 000 分别加入 *Fn*, 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温细胞培养箱培养相应时间 (0 h 为对照组) 后, PBS 清洗两遍用于检测。

1.2.5 CCK-8 细胞增殖检测

对数生长期 HCT116、HT29 细胞以 7 000 细胞/孔接种于 96 孔板, 细胞贴壁后加入不同 MOI (MOI=0 为对照组) *Fn*, 与细胞共培养相应时间后, 吸出原培养液, 加入 100 μL PBS 清洗 1 次, 更换为新鲜完全培养基, 继续培养至 24 h, 吸出培养液, 将 100 μL 含 10% CCK-8 液的培养基以换液形式加入每孔, 避光孵育 1~2 h, 酶标仪 450 nm 吸光度检测 A 值。

1.2.6 基于光学表面波技术的细胞折射率检测

光学检测平台由之江实验室前沿基础研究中心构建 (图 1)^[15]。由于多聚 L 赖氨酸可在基质上提供一个阳离子层, 与细胞表面的阴离子相互作用, 增加细胞的黏附力, 因此本文使用该方法在微流槽上培养细胞。微流槽及相关器材灭菌, 将 10 μg 多聚 L 赖氨酸溶于 2 mL 体积水中并通入微流槽, 室温 1 h。之后使用 3 mL 的 Hanks' 平衡盐溶液清洗两次。Hanks' 平衡盐溶液配方为: 137.93 mmol/L NaCl, 5.33 mmol/L KCl, 4.17 mmol/L NaHCO₃, 0.441 mmol/L KH₂PO₄, 0.338 mmol/L Na₂HPO₄, 5.56 mmol/L D-Glucose。将与 *Fn* 共培养的结肠癌细胞系 HCT116、HT29 进行胰酶消化, 消化后悬浮的细胞加入微流槽中, 37 ℃ 培养使其在附有多聚 L 赖氨酸的微流槽上贴壁。将微流槽装入表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 传感系统中, 使用 SPR 传感器实时监测该过程。前期根据 NaCl 浓度计算出了不同浓度 NaCl 溶液与折射率信号的关系, 当 NaCl 溶液浓度升高时, 传感器输出折射率信号下降, 公式为折射率信号 (mV) = -14.43c + 4.412 6^[15], 其中, c 是 NaCl 溶液质量浓度。之后基于 NaCl 溶液质量浓度与折射率关系公式 $n = n_w + 0.001 85c$ 计算传感器输出信号对应的折射率, 其中, n_w 是去离子水的折射率, 取 $n_w = 1.333$ ^[14]。输出折射率信号与折射率的标准曲线见图 2, 折射率 = -0.0129 × 折射率信号 (mV) + 1.3901。

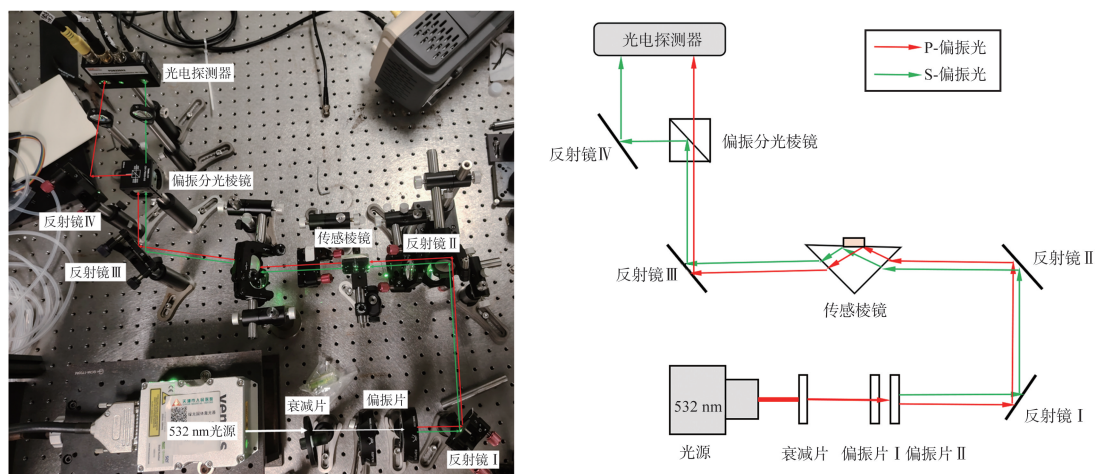


图1 光学检测平台光路图及示意图

Figure 1 Optical detection platform optical path diagram and schematic diagram

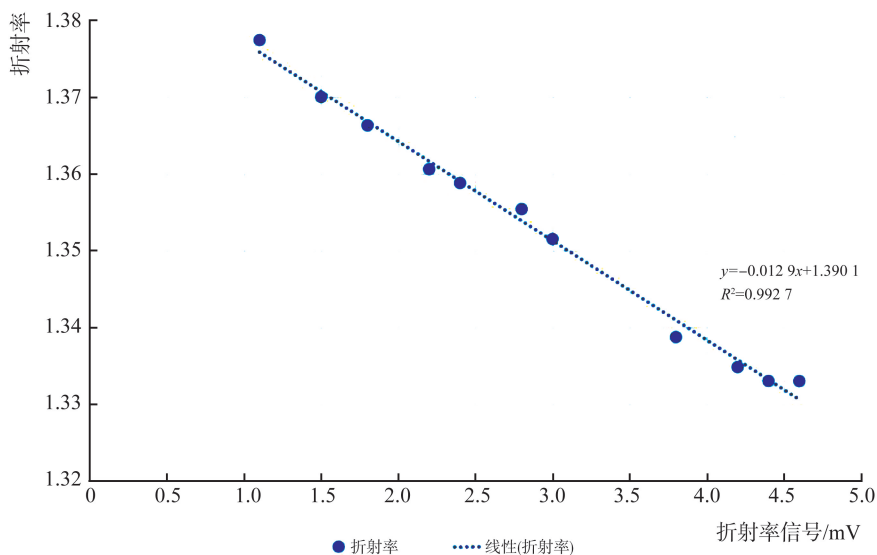


图2 传感器输出折射率信号与折射率标准曲线

Figure 2 Standard curve of the sensor output refractive index signal and refractive index

1.2.7 LC3 荧光双标质粒提取

将带有 LC3 荧光双标质粒的细菌接种于 LB 琼脂平板,挑取单菌落接种于液体 LB 培养基,180 r/min 振荡培养 12~18 h,使用质粒提取试剂盒提取质粒,收集质粒并使用分光光度计测量质粒浓度及 A_{260}/A_{280} 值。

1.2.8 EGFP-mRFP-LC3 双荧光质粒转染

6 孔板内铺入 4×10^5 个 CRC 细胞,待细胞贴壁生长至 60%~70% 时,更换为不含抗生素的 10% 血清培养基,使用 lipo6000 试剂盒对细胞进行 mRFP-GFP-LC3 双荧光质粒转染,6 h 后更换为完全培养基,培养 36 h 后,NC 组更换为不含抗生素的 10% 血清培养基,Fn 组在此基础上加入 MOI=100 的 Fn 菌液与 CRC 细胞共培养,24 h 后 PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛固定后使用荧光显微镜进

行观察拍照。

1.2.9 蛋白免疫印迹实验

收集细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,裂解后细胞提取物使用 BCA 蛋白检测试剂盒(索莱宝)进行定量。30 μ g 蛋白通过 12%/10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶 80~120 V 电泳;然后转移到 PVDF 膜(Millipore, 0.45 μ m)上 0.22 mA 恒流进行转膜;转膜后将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次;将 PVDF 膜置于一抗中 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, TBST 洗涤 3 次;PVDF 膜置于二抗常温摇床孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,发光显影液显影后进行曝光。随后用 ImageJ 1.43 软件对图像进行分析。全细胞裂解液以 GAPDH 抗体作为对照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样

本数据采用 t 检验,多组间数据总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。作图软件使用 Graphpad Prism 8.0.2。

2 结果

2.1 *Fn* 不同感染比例对 HCT116、HT29 细胞系自噬水平及细胞折射率的影响

蛋白免疫印迹结果显示,不同 MOI 干预后,两细胞系 Beclin-1、LC3、P62 表达水平差异均有统计学意义 ($F_{\text{HCT116-Beclin-1}} = 14.26, P_{\text{HCT116-Beclin-1}} < 0.001$ 、 $F_{\text{HT29-Beclin-1}} = 20.83, P_{\text{HT29-Beclin-1}} < 0.001$; $F_{\text{HCT116-LC3}} = 32.61, P_{\text{HCT116-LC3}} < 0.001$ 、 $F_{\text{HT29-LC3}} = 50.83, P_{\text{HT29-LC3}} < 0.001$; $F_{\text{HCT116-P62}} = 41.56, P_{\text{HCT116-P62}} < 0.001$ 、 $F_{\text{HT29-P62}} = 21.94, P_{\text{HT29-P62}} < 0.001$)。与对照组 (MOI=0) 相比,当 MOI = 100/500/1000 时, HCT116、HT29 细胞内 Beclin-1 ($P_{\text{HCT116-100}} = 0.024, P_{\text{HCT116-500}} = 0.004, P_{\text{HCT116-1000}} < 0.001$; $P_{\text{HT29-100}} = 0.006, P_{\text{HT29-500}} = 0.002, P_{\text{HT29-1000}} <$

0.001)、LC3 ($P_{\text{HCT116-100}} = 0.020, P_{\text{HCT116-500}} = 0.006, P_{\text{HCT116-1000}} < 0.001$; $P_{\text{HT29-100}} = 0.027, P_{\text{HT29-500}} < 0.001, P_{\text{HT29-1000}} < 0.001$) 水平明显升高, P62 ($P_{\text{HCT116-100}} = 0.033, P_{\text{HCT116-500}} < 0.001, P_{\text{HCT116-1000}} < 0.001$; $P_{\text{HT29-100}} = 0.004, P_{\text{HT29-500}} = 0.003, P_{\text{HT29-1000}} < 0.001$) 水平明显降低。表明相较于对照组 (MOI = 0), 当 MOI = 100/500/1000 时, HCT116、HT29 细胞自噬水平升高 (图 3A)。

基于光学表面波技术的细胞折射率检测结果显示,不同 MOI 干预后,两细胞系的细胞折射率差异具有统计学意义 ($F_{\text{HCT116}} = 39.59, P_{\text{HCT116}} < 0.001$; $F_{\text{HT29}} = 30.77, P_{\text{HT29}} < 0.001$)。当 MOI = 100/500/1000 时,细胞折射率升高幅度与对照组 (MOI=0) 相比差异有统计学意义 ($P_{\text{HCT116-100}} = 0.002, P_{\text{HCT116-500}} < 0.001, P_{\text{HCT116-1000}} < 0.001$; $P_{\text{HT29-100}} = 0.001, P_{\text{HT29-500}} < 0.001, P_{\text{HT29-1000}} < 0.001$)。表明当 MOI = 100/500/1000 时,细胞折射信号降低,细胞折射率升高 (图 3B)。

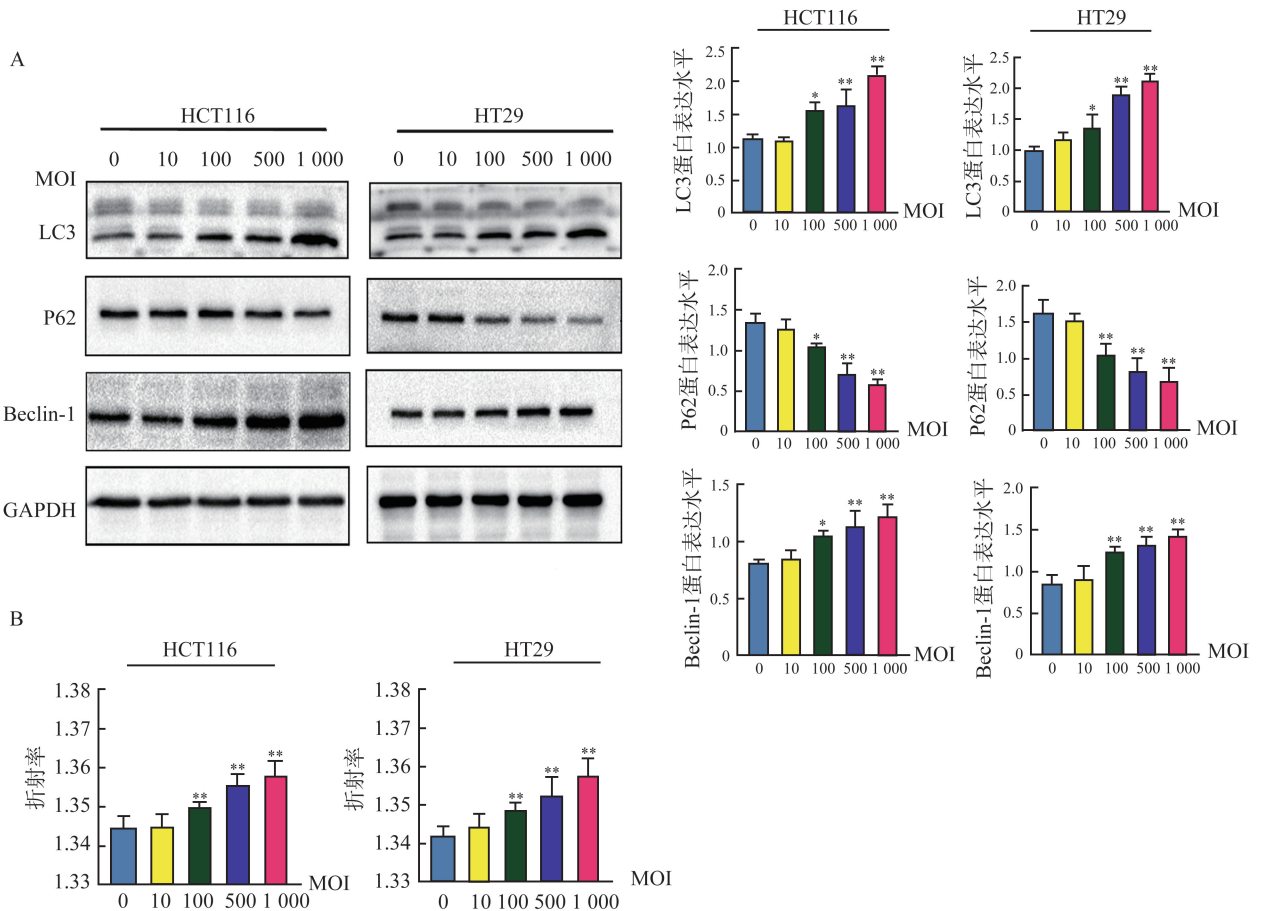


图3 *Fn* 不同感染比例对 HCT116、HT29 细胞系自噬水平 (A) 及细胞折射率 (B) 的影响与对照组 (MOI=0) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 3 Effects of *Fn* with different infection ratio on autophagy level (A) and cell refractive index (B) of HCT116 and HT29 cell lines

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group (MOI=0)。

2.2 *Fn* 不同感染时间对 HCT116、HT29 细胞系自噬水平及细胞折射率的影响

Fn 以 MOI=100 对 HCT116 及 HT29 进行不同时间的干预(0、2、4、6 h)。

蛋白免疫印迹结果显示,不同 *Fn* 感染时间后,两细胞系 Beclin-1、LC3、P62 表达水平差异均有统计学意义($F_{\text{HCT116-Beclin-1}} = 19.05, P_{\text{HCT116-Beclin-1}} < 0.001$ 、 $F_{\text{HT29-Beclin-1}} = 83.28, P_{\text{HT29-Beclin-1}} < 0.001$; $F_{\text{HCT116-LC3}} = 139.1, P_{\text{HCT116-LC3}} < 0.001$ 、 $F_{\text{HT29-LC3}} = 31.99, P_{\text{HT29-LC3}} < 0.001$; $F_{\text{HCT116-P62}} = 58.11, P_{\text{HCT116-P62}} < 0.001$ 、 $F_{\text{HT29-P62}} = 31.96, P_{\text{HT29-P62}} < 0.001$)。与感染时间 0 h 相比,*Fn* 感染时间为 4 h 及 6 h 时,Beclin-1 ($P_{\text{HCT116-4h}} = 0.005$,

$P_{\text{HCT116-6h}} = 0.001$; $P_{\text{HT29-4h}} < 0.001, P_{\text{HT29-6h}} < 0.001$)、LC3 ($P_{\text{HCT116-4h}} < 0.001, P_{\text{HCT116-6h}} < 0.001$; $P_{\text{HT29-4h}} = 0.001, P_{\text{HT29-6h}} < 0.001$) 水平明显升高, P62 ($P_{\text{HCT116-4h}} < 0.001, P_{\text{HCT116-6h}} < 0.001$; $P_{\text{HT29-4h}} = 0.003, P_{\text{HT29-6h}} < 0.001$) 水平明显降低,细胞自噬水平升高(图 4A)。

光学检测结果显示,不同 *Fn* 感染时间后, HCT116 及 HT29 细胞系细胞折射率差异具有统计学意义($F_{\text{HCT116}} = 42.07, P_{\text{HCT116}} < 0.001$; $F_{\text{HT29}} = 98.97, P_{\text{HT29}} < 0.001$),与感染时间为 0 h 相比,*Fn* 感染 4 h 及 6 h 时, HCT116 及 HT29 (均 $P < 0.001$) 细胞折射率降低,细胞折射率升高(图 4B)。

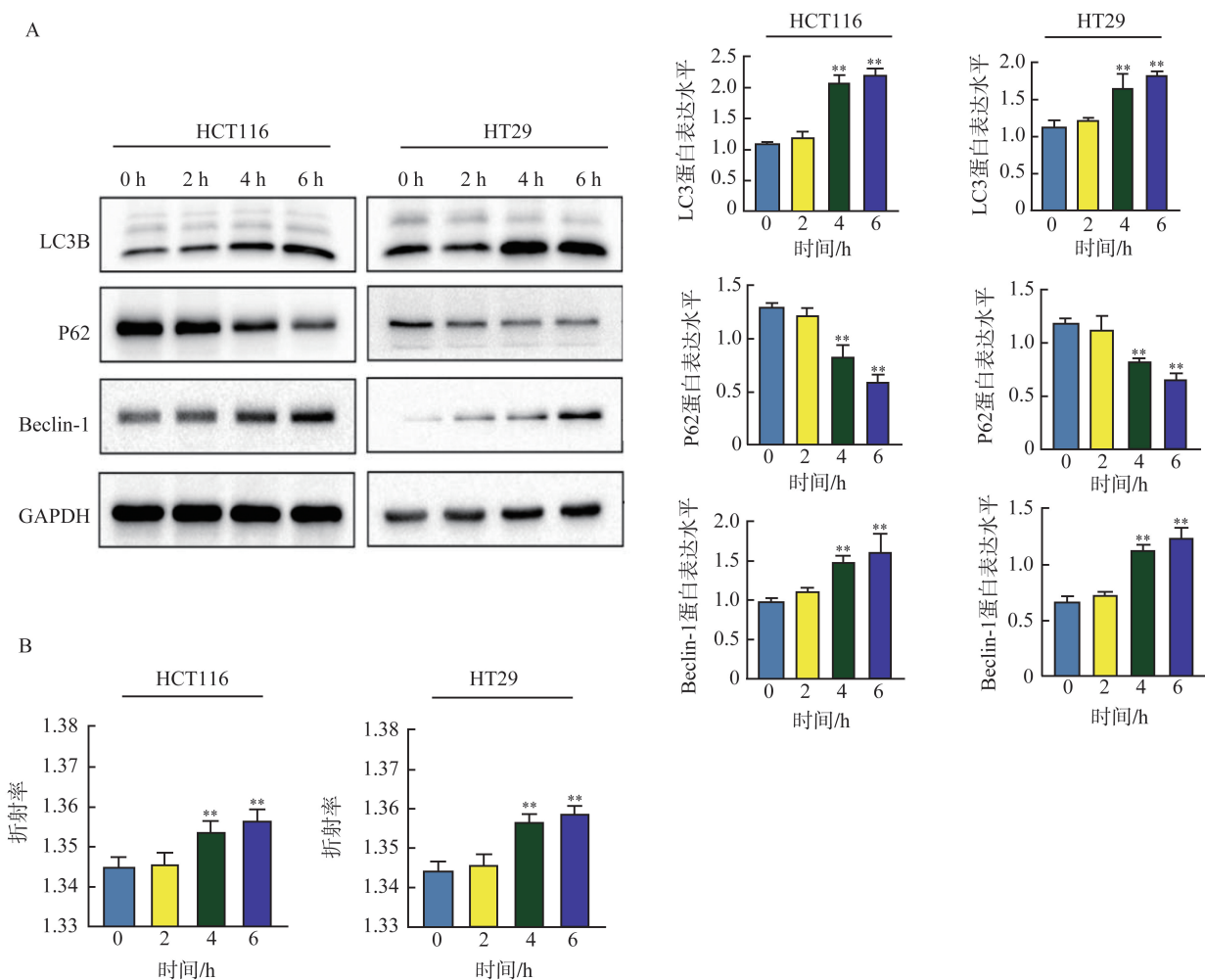


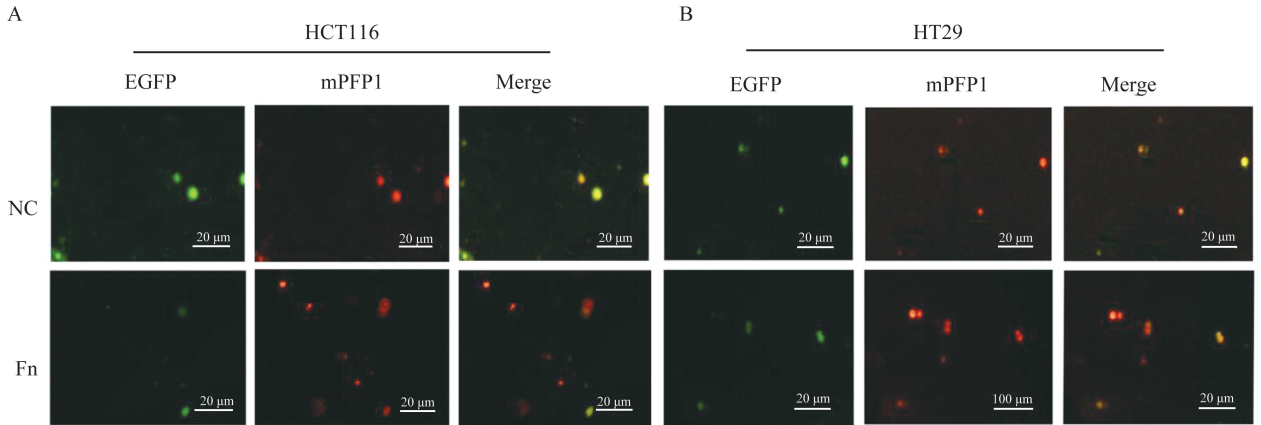
图 4 *Fn* 不同感染时间对 HCT116、HT29 细胞系自噬水平(A)及细胞折射率(B)的影响
与对照组(0 h)相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 4 Effect of *Fn* infection for different time on autophagy level (A) and cell refractive index (B) in HCT116 and HT29 cell lines
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group (0 h).

2.3 *Fn* 感染 HCT116、HT29 细胞后自噬荧光检测

EGFP-mRFP1-LC3 双荧光检测结果显示,与 NC 组相比,*Fn* 处理组(MOI=100, 4 h)自噬体荧光

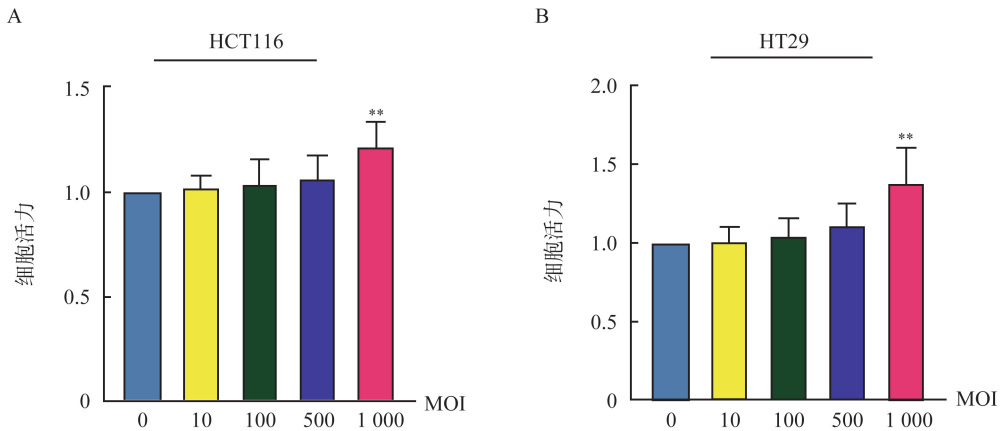
信号升高($t_{\text{HCT116}} = 3.554, P = 0.023$; $t_{\text{HT29}} = 3.554, P = 0.004$),提示折射率的升高可能是由细胞内自噬体的变化引起(图 5)。

图5 *Fn* 感染 HCT116(A) 及 HT29(B) 后自噬荧光检测Figure 5 Fluorescence detection of autophagy following *Fn* infection in HCT116(A)/HT29(B)

2.4 *Fn* 对 HCT116、HT29 细胞系增殖能力的影响

CCK-8 检测结果显示,不同 *Fn* MOI 情况下, HCT116 及 HT29 细胞系的细胞增殖能力差异均具有统计学意义 ($F_{\text{HCT116}} = 13.49, P_{\text{HCT116}} < 0.001$; $F_{\text{HT29}} = 23.03, P_{\text{HT29}} < 0.001$)。与对照组 (MOI = 0) 相比, *Fn* 感染 MOI = 1 000 时, HCT116、HT29 细胞的增殖能力

明显提高 (均 $P < 0.001$), 但在 MOI = 100 时, *Fn* 对 HCT116/HT29 细胞的增殖能力无明显影响 ($P_{\text{HCT116}} > 0.999$; $P_{\text{HT29}} > 0.999$) (图 6)。表明在本研究中采用的干预 MOI (MOI = 100) 引起的细胞折射率的改变不受细胞增殖的影响。

图6 *Fn* 对 HCT116 (A) 及 HT29 (B) 细胞增殖能力的影响
与对照组 (MOI = 0) 比较, ** $P < 0.01$ 。Figure 6 Effect of *Fn* on proliferation of HCT116(A) and HT29 (B) cells
** $P < 0.01$ vs. control group (MOI = 0).

2.5 自噬水平对细胞折射率的影响

蛋白免疫印迹显示,不同细菌感染细胞后, HCT116 及 HT29 细胞系 Beclin-1、LC3、P62 表达水平差异均有统计学意义 ($F_{\text{HCT116-Beclin-1}} = 13.42, P_{\text{HCT116-Beclin-1}} = 0.006, F_{\text{HT29-Beclin-1}} = 8.876, P_{\text{HT29-Beclin-1}} = 0.016$; $F_{\text{HCT116-LC3}} = 137.9, P_{\text{HCT116-LC3}} < 0.001, F_{\text{HT29-LC3}} = 32.45, P_{\text{HT29-LC3}} < 0.001$; $F_{\text{HCT116-P62}} = 71.02, P_{\text{HCT116-P62}} < 0.001, F_{\text{HT29-P62}} = 10.68, P_{\text{HT29-P62}} < 0.011$)。

与对照组 (NC) 相比, DH5 α 感染细胞后, Beclin-1 ($P_{\text{HCT116}} > 0.999$; $P_{\text{HT29}} > 0.999$)、LC3 ($P_{\text{HCT116}} = 0.886$; $P_{\text{HT29}} > 0.999$)、P62 ($P_{\text{HCT116}} = 0.558$; $P_{\text{HT29}} > 0.999$) 表达水平差异无统计学意义,表明细胞自噬

水平没有明显变化 (图 7A)。光学检测结果显示,两细胞系各组间细胞折射率差异具有统计学意义 ($F_{\text{HCT116}} = 13.27, P_{\text{HCT116}} < 0.001$; $F_{\text{HT29}} = 17.61, P_{\text{HT29}} < 0.001$), 但 DH5 α 感染细胞后细胞折射率较对照组 (NC) 无明显改变 ($P_{\text{HCT116}} > 0.999$; $P_{\text{HT29}} > 0.999$) (图 7B)。

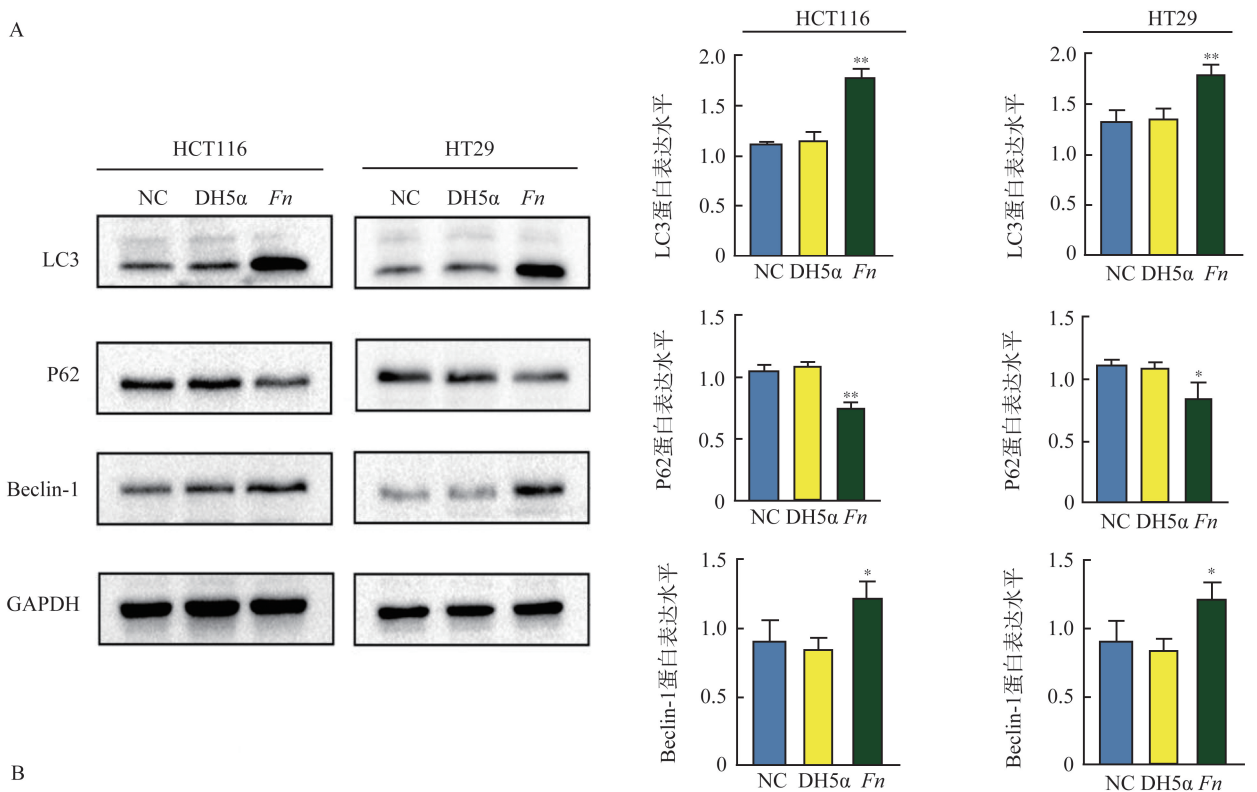
Fn 感染细胞后,蛋白免疫印迹结果显示,相较于对照组 (NC),两细胞系 Beclin-1 ($P_{\text{HCT116}} = 0.013$; $P_{\text{HT29}} = 0.047$)、LC3 ($P_{\text{HCT116}} < 0.001$; $P_{\text{HT29}} = 0.001$) 表达水平明显升高, P62 ($P_{\text{HCT116}} < 0.001$; $P_{\text{HT29}} = 0.018$) 表达水平明显降低,细胞自噬水平升高。而光学检测结果显示, *Fn* 感染细胞后两细胞系细胞折射率较

对照组(NC)降低,差异具有统计学意义($P_{\text{HCT116}} < 0.001, P_{\text{HT29}} < 0.001$),说明光学检测未受胞外残余细菌的明显影响,其折射率的改变主要是由胞内自噬水平的变化引起的。

Fn 联合 3-MA 干预两细胞系后,蛋白免疫印迹结果显示,各组间 Beclin-1、LC3、P62 表达水平差异均有统计学意义($F_{\text{HCT116-LC3}} = 29.14, P_{\text{HCT116-LC3}} < 0.001, F_{\text{HT29-LC3}} = 64.95, P_{\text{HT29-LC3}} < 0.001; F_{\text{HCT116-P62}} = 34.27, P_{\text{HCT116-P62}} < 0.001, F_{\text{HT29-P62}} = 39.06, P_{\text{HT29-P62}} < 0.001$)。相较于 *Fn* 组,*Fn* + 3-MA 组 LC3 水平($P_{\text{HCT116}} < 0.001, P_{\text{HT29}} < 0.001$)显著降低,P62 水平($P_{\text{HCT116}} < 0.001, P_{\text{HT29}} < 0.001$)显著升高(图 8A); EGFP-mRFP1-LC3 双荧光检测结果显示,各组间平

均荧光强度差异具有统计学意义($F_{\text{HCT116}} = 71.80, P_{\text{HCT116}} < 0.001; F_{\text{HT29}} = 67.08, P_{\text{HT29}} < 0.001$),*Fn* + 3-MA 组荧光信号较 NC 组和 *Fn* 组均显著降低($P_{\text{HCT116-NC}} < 0.001, P_{\text{HCT116-Fn}} < 0.001; P_{\text{HT29-NC}} < 0.001, P_{\text{HT29-Fn}} < 0.001$) (图 8B),表明细胞自噬受到抑制且自噬小体数量减少。光学检测结果显示,各组间细胞折射率差异具有统计学意义($F_{\text{HCT116}} = 35.14, P_{\text{HCT116}} < 0.001; F_{\text{HT29}} = 37.21, P_{\text{HT29}} < 0.001$),*Fn* + 3-MA 组细胞折射率较对照组(NC)和 *Fn* 组均显著降低($P_{\text{HCT116-NC}} = 0.036, P_{\text{HCT116-Fn}} < 0.001; P_{\text{HT29-NC}} = 0.003, P_{\text{HT29-Fn}} < 0.001$) (图 8C),进一步说明 *Fn* 感染后细胞折射率的改变主要受胞内自噬水平变化的影响。

A



B

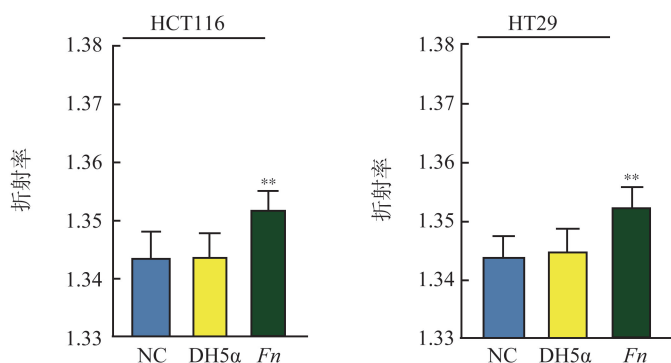


图7 大肠杆菌(DH5α)感染对 HCT116、HT29 细胞系自噬水平(A)及细胞折射率(B)的影响与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 7 Effect of *E. coli*(DH5α) infection on autophagy level and cell refractive index in HCT116 and HT29 cell lines * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. NC group.

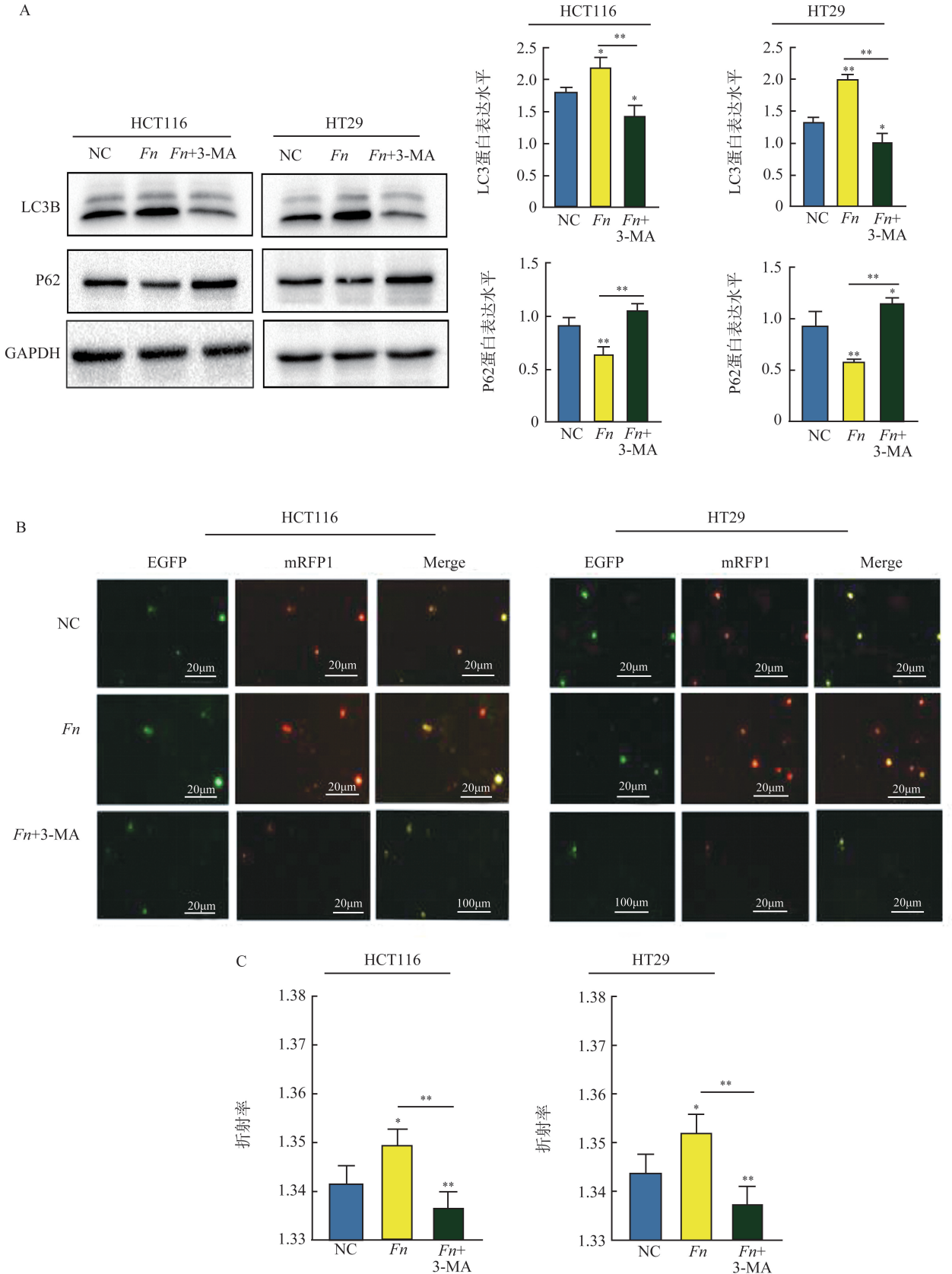


图8 *Fn*联合3-MA干预对HCT116、HT29细胞系自噬水平(A)、自噬流(B)及细胞折射率(C)的影响与NC组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Figure 8 Effect of *Fn* combined with 3-MA intervention on autophagy level (A), autophagic flow (B) and cell refractive index (C) in HCT116 and HT29 cell lines

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. NC group.

3 讨论

近年来,越来越多的研究表明,*Fn*介导的自噬与CRC的发生发展密切相关,*Fn*能通过激活宿主细胞内核转录因子kappa B(Nuclear Factor kappa B, NF- κ B)、哺乳动物雷帕霉素靶点(Mammalian target of rapamycin, mTOR)、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子88(Myeloid differentiation primary response gene 88, MYD88)等信号通路介导CRC细胞自噬,进而促进CRC的增殖及化疗耐药^[17-19]。目前,针对自噬的生物检测主要为电镜观察、自噬荧光检测、蛋白质检测以及基因表达分析等^[20]。有学者将光学引入了上皮-间充质转化研究中,使用光学检测细胞的上皮-间充质转化能力,能够在不影响细胞活性的情况下,实现无标记活细胞检测^[21]。但目前将光学技术应用于自噬水平的检测研究仍较少。因此,本研究通过光学表面波传感技术与生物研究相结合的方法,探索了细胞折射率变化与*Fn*所介导的自噬水平的关系,初步探究了光学表面波技术对癌细胞自噬水平检测的潜力。

3.1 光学表面波技术可反映*Fn*介导的CRC细胞自噬水平

本研究以不同MOI及不同感染时间与CRC细胞共培养,探索*Fn*诱导自噬的浓度及时间。有研究表明,当*Fn* MOI = 1000时,能够促进细胞的增殖^[22-23]。也有研究表明,*Fn*感染复数MOI = 100时能够影响CRC细胞内基因水平的表达,激活细胞信号通路,引起一系列细胞效应^[24-26]。本研究结果表明,当MOI = 100时,CRC细胞的自噬水平升高。Yu等^[12]观察*Fn*感染CRC细胞4h后产生了细胞自噬。Zhu等^[27]在研究中发现,当感染时间为1h时,可引起肠上皮细胞细胞外调节蛋白激酶(Extracellular regulated protein kinases, ERK)/信号转导及转录激活蛋白3(Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路的改变。本研究结果显示,*Fn*与CRC细胞共培养4h后,CRC细胞的自噬水平升高。同时,本研究对不同感染复数及感染时间的CRC细胞进行光学检测发现,当MOI = 100、干预时间为4h时,细胞折射率出现显著升高。表明光学表面波技术可及时、敏感地反映细胞自噬水平的潜力。

3.2 光学折射率可通过自噬小体数量变化反映CRC细胞的自噬水平

为进一步探索光学折射率反映自噬的可能机制,本研究使用LC3荧光双标检测法观察*Fn*感染

后CRC细胞内自噬小体及自噬溶酶体的变化情况。结果表明,*Fn*感染细胞后,促进了细胞内自噬小体向自噬溶酶体转化,*Fn*干预组自噬溶酶体数量增加,这可能是导致细胞折射率变化的原因。为进一步验证光学折射率的改变主要是受细胞内自噬小体及自噬溶酶体数量的变化,排除*Fn*侵袭进入细胞或*Fn*引起的其他细胞结构改变对细胞折射率的影响,本研究使用了经典的自噬小体形成抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)干预CRC细胞,结果表明,当自噬小体数量形成受到抑制后,细胞折射率显著下降,进一步证明了光学检测能通过感受细胞内自噬小体水平的变化,进而反映细胞的自噬水平。

3.3 光学折射率不受细胞增殖及胞外物质影响

考虑到光学折射率可能会受细胞的生命活动状态、细胞的结构、细胞增殖及细胞外物质的影响,本研究使用不同感染复数干预同一批次CRC细胞,保证了基线期细胞的生命活动状态基本一致,排除了细胞的生命活动状态的影响,发现当MOI = 1000时,CRC细胞出现明显增殖,当MOI = 100时,CRC细胞未发生明显增殖,但此时已经发生了自噬,且细胞折射率也发生了相应变化,说明细胞折射率的变化不是由细胞增殖引起的。此外,为排除PBS清洗后胞外残余细菌对细胞折射率可能产生的影响,本研究使用非致病性大肠杆菌DH5 α 感染细胞并进行蛋白质及光学检测,结果表明DH5 α 对自噬蛋白及光学折射率无明显影响。

综上,本研究表明,当*Fn* MOI = 100、感染时间为4h时,细胞自噬水平出现明显升高,细胞折射率亦出现明显改变,其变化主要由细胞内自噬小体水平的变化引起,提示光学检测细胞折射率的变化可及时有效的反映*Fn*干预后CRC细胞自噬水平的改变,表明光学表面波传感技术的细胞折射率可作为一种快速、直观且不影响细胞活性的检测自噬水平的技术。但本研究目前仅在HCT116及HT29细胞系中进行初步验证,在其他细胞系中尚未展开,存在一定局限性,接下来基于其他细胞系与自噬干预措施的光学检测应陆续开展,为今后进一步探索该技术在生物医学领域的其他应用提供借鉴。

参考文献:

- [1] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [2] Mahdavi M, Laforest-Lapointe I, Massé E. Preventing colorectal cancer through prebiotics[J]. Microorganisms, 2021, 9(6): 1325. doi:10.3390/microorganisms9061325.
- [3] 上海市抗癌协会大肠癌专业委员会. 结直肠癌早筛、早

- 诊、早治上海方案(2023年版)[J]. 中国癌症杂志, 2024, 34(1): 13-66.
- Colorectal Cancer Special Committee of Shanghai Anti-Cancer Association. Shanghai plan for early screening, diagnosis and treatment of colorectal cancer (2023 edition) [J]. *China Oncology*, 2024, 34(1): 13-66.
- [4] 苏雅丽, 曹秋华, 高兴华. 结直肠癌的风险因素研究进展[J]. *药学研究*, 2023, 42(8): 594-598, 640. SU Yali, CAO Qiuhua, GAO Xinghua. Research progress on risk factors for colorectal cancer[J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2023, 42(8): 594-598, 640.
- [5] Lin CZ, Cai XL, Zhang J, et al. Role of gut microbiota in the development and treatment of colorectal cancer[J]. *Digestion*, 2019, 100(1): 72-78.
- [6] Zepeda-Rivera M, Minot SS, Bouzek H, et al. A distinct *Fusobacterium nucleatum* clade dominates the colorectal cancer niche[J]. *Nature*, 2024, 628(8007): 424-432.
- [7] Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(5): 1311-1318.
- [8] Yamaoka Y, Suehiro Y, Hashimoto S, et al. *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population[J]. *J Gastroenterol*, 2018, 53(4): 517-524.
- [9] Mima K, Nishihara R, Qian ZR, et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis[J]. *Gut*, 2016, 65(12): 1973-1980.
- [10] Signat B, Roques C, Poulet P, et al. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2011, 13(2): 25-36.
- [11] Chen YY, Chen Y, Zhang JX, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes metastasis in colorectal cancer by activating autophagy signaling via the upregulation of CARD3 expression[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 323-339.
- [12] Yu T, Guo FF, Yu YN, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy[J]. *Cell*, 2017, 170(3): 548-563.
- [13] Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma[J]. *Genome Res*, 2012, 22(2): 292-298.
- [14] Xing F, Meng GX, Zhang Q, et al. Ultrasensitive flow sensing of a single cell using graphene-based optical sensors[J]. *Nano Lett*, 2014, 14(6): 3563-3569.
- [15] 张崇磊, 辛自强, 闵长俊, 等. 基于光学表面波的折射率传感成像技术[J]. *光学学报*, 2019, 39(1): 0126009. doi:10.3788/AOS201939.0126009. ZHANG Chonglei, XIN Ziqiang, MIN Changjun, et al. Refractive index sensing imaging technology based on optical surface wave[J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(1): 0126009. doi:10.3788/AOS201939.0126009.
- [16] 刘雪莲, 冯保华, 林滨, 等. 基于偏振差分干涉技术声表面波检测系统研究[J]. *激光与红外*, 2018, 48(10): 1231-1237. LIU Xuelian, FENG Baohua, LIN Bin, et al. Research on SAW detection system based on optical interference technology[J]. *Laser & Infrared*, 2018, 48(10): 1231-1237.
- [17] Chen G, Gao CN, Jiang S, et al. *Fusobacterium nucleatum* outer membrane vesicles activate autophagy to promote oral cancer metastasis[J]. *J Adv Res*, 2024, 56: 167-179. doi:10.1016/j.jare.2023.04.002.
- [18] Duan CH, Tang XL, Wang WJ, et al. *Lactobacillus rhamnosus* attenuates intestinal inflammation induced by *Fusobacterium nucleatum* infection by restoring the autophagic flux[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 125-136.
- [19] Rubinstein MR, Baik JE, Lagana SM, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer by inducing Wnt/ β -catenin modulator Annexin A1[J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(4): e47638. doi:10.15252/embr.201847638.
- [20] 窦婷婷, 金玲, 池宇欣, 等. 自噬的检测方法及其在相关疾病中的研究进展[J]. *包头医学院学报*, 2021, 37(9): 111-116. DOU Tingting, JIN Ling, CHI Yuxin, et al. Detection methods of autophagy and its research progress in related diseases[J]. *Journal of Baotou Medical College*, 2021, 37(9): 111-116.
- [21] Sun LX, Wang YJ, Zhang HQ, et al. Graphene-based confocal refractive index microscopy for label-free differentiation of living epithelial and mesenchymal cells[J]. *ACS Sens*, 2020, 5(2): 510-518.
- [22] Gao YH, Bi DX, Xie RT, et al. *Fusobacterium nucleatum* enhances the efficacy of PD-L1 blockade in colorectal cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 398. doi:10.1038/S41392-021-00795-x.
- [23] Yang YZ, Weng WH, Peng JJ, et al. *Fusobacterium nucleatum* increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor- κ B, and up-regulating expression of microRNA-21[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4): 851-866.
- [24] Chen LF, Zhao R, Shen JJ, et al. Antibacterial *Fusobacterium nucleatum*-mimicking nanomedicine to selectively eliminate tumor-colonized bacteria and enhance immunotherapy against colorectal cancer[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(45): e2306281. doi:10.1002/adma.202306281.
- [25] Hong J, Guo FF, Lu SY, et al. *F. nucleatum* targets lncRNA ENO1-IT1 to promote glycolysis and oncogenesis in colorectal cancer[J]. *Gut*, 2021, 70(11): 2123-2137.
- [26] Chen SJ, Zhang L, Li MJ, et al. *Fusobacterium nucleatum* reduces METTL3-mediated m6A modification and contributes to colorectal cancer metastasis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1248. doi:10.1038/s41467-022-28913-5.
- [27] Zhu HY, Li M, Bi DX, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes tumor progression in KRAS p.G12D-mutant colorectal cancer by binding to DHX15[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1688. doi:10.1038/S41467-024-45572-w.