

植物乳杆菌素 L-1 对单核细胞增生李斯特氏菌作用机理的研究

周 伟, 刘国荣, 李平兰*, 戴蕴青, 周 康

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘 要 :以凝胶层析纯化的植物乳杆菌素作用单核细胞增生李斯特氏菌,结果表明该细菌素可以导致能量化的敏感细胞内 K^+ 、无机磷离子、乳酸脱氢酶、紫外吸收物质和 ATP 发生不同程度的泄漏,相应地破坏了膜 $\Delta\psi$ 和部分 ΔpH ,引起 PMF 的耗散,结果导致细胞的死亡。综合所测指标,可以推测植物乳杆菌素 L-1 对单增李斯特氏菌的作用目标主要是细胞膜,通过形成非选择性孔洞使得选择性离子和小分子生命物质外泄,从而打破原有平衡,最终引起细胞的衰亡。

关键词 :植物乳杆菌素;作用机理;单核细胞增生李斯特氏菌

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)02-0260-05

植物乳杆菌素 L-1 理化特性稳定,具有杀菌作用,且对食品加工中的主要外界影响因素表现出良好的耐受性^[1],可以抑制多种病原菌和腐败菌,尤其对单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)的抑制作用使其具有广阔的应用前景,但在食品防腐中发挥有效的应用还需要深入了解该细菌素的作用机理。一般来说,大部分乳酸菌细菌素都是通过在敏感菌的细胞膜上形成孔洞,使胞内的离子外泄,最终引起质子驱动势的耗散^[2]。然而,不同的细菌素达到这一目标的机制有所不同,目前有两种模型阐述了细菌素和细胞膜之间的相互作用:去污剂破坏模型认为细菌素单体随机插入细胞膜,导致磷脂双层破坏;孔道模型则认为细菌素单体结合并插入到膜中,其它细菌素单体相继插入,形成桶-板模式,这种交互作用导致膜上孔道的形成^[3]。根据饱和动力学和细菌素抑菌机理,两种模型都和膜的破坏及质子动力势(PMF)的耗散有关。本研究以即食食品和低温冷藏肉制品中常见的单核细胞增生李斯特氏菌为受试菌,拟在前人研究的模型基础上,通过检测细菌素作用过的细胞膜上一些指标变化来阐明该细菌素对单核细胞增生李斯特氏菌的作用机理,从而为进一步研究该细菌素的应用及其构效关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) L-1 分离自宣威火腿,已申请专利保藏,保藏号为 CGMCC No. 1357;单核细胞增生李斯特氏菌 54002,购于中国药品生物制品鉴定所。

1.1.2 主要试剂和仪器 :N-(C-羟乙基)哌嗪-N-2 乙烷磺酸(HEPES)、2',7'-bis-(2-carboxy-ethyl)5(and-6-)carboxyfluorescein (BCECF)、尼日利亚菌素(nigericin)、3,3'-dipropylthia-dicarbocyanine iodide (diSC3-5)、缬氨霉素(valinomycin)等购自 Sigma 公司;ATP 分析试剂盒购自 Promega 公司;乳酸脱氢酶试剂盒购自南京建成生物工程公司。970CRT 型荧光分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TAS-986 型原子吸收光谱仪(北京普析通用仪器有限责任公司);GL-20B 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-2100 紫外可见分光光度计(UNICO 上海光谱仪器有限公司);其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 生理分析用菌悬液的制备

对数生长期的单核细胞增生李斯特氏菌液,6000r/min 离心 10min,沉淀用 pH7.0 的 2.5mmol/L HEPES 缓冲液洗涤一次,重悬浮在该缓冲液中,制成 10^7 CFU/mL 的菌悬液,备用。下列试验所用缓冲

基金项目:国家自然科学基金(30671482);北京市自然科学基金(6052015)

* 通讯作者。Tel 86-10-62737664;E-mail: plli@sohu.com

作者简介:周 伟(1979-),女,黑龙江绥滨县人,硕士研究生,研究方向为食品微生物学。E-mail: zwcaw@163.com

收稿日期:2006-07-03;接受日期:2006-08-08;修回日期:2006-11-17

液均为 pH7.0 的 2.5mmol/L HEPES 缓冲液。

1.3 细胞内外 K⁺ 和无机磷浓度的变化

上述菌悬液分成两份,分别加入 10mmol/L 和 100mmol/L 的葡萄糖能量化。加入植物乳杆菌素 L-1,终浓度为 64AU/mL。37℃ 下温育,隔 10min 取 1mL,立即放在冰上冷冻。菌液在 0℃ 下 10000r/min 离心 7min。上清测胞外 K⁺ 含量,菌体细胞用 1mL 5% (W/V) 的三氯乙酸悬浮,20℃ 下冷冻过夜。解冻后 95℃ 温育 10min,每个样品加 4mL 去离子水,10000r/min 离心 15min,上清测胞内 K⁺ 含量。采用 M5 型原子吸收光谱仪测定 K⁺ 浓度。无机磷的处理同上,用钼锑抗比色法来测定^[4]。

1.4 胞外乳酸脱氢酶和紫外吸收物质的测定

菌悬液加入 10mmol/L 的葡萄糖和植物乳杆菌素 L-1,37℃ 温育,间隔 10min 取样,用 0.22μm 孔径的无菌硝酸纤维素膜过滤,滤液测胞外乳酸脱氢酶含量和紫外吸收物质。乳酸脱氢酶测定步骤参照南京建成乳酸脱氢酶试剂盒说明书,紫外吸收物质在 260nm 下测定光吸收值。

1.5 胞内外 ATP 含量的测定

上述菌悬液用 10mmol/L 的葡萄糖能量化,分成两份。37℃ 下培育 3min,一份经植物乳杆菌素作用后,每 5min 取 0.5mL,12000r/min 离心 2min(4℃),上清测胞外 ATP 的量。菌体加入 100μL 细胞裂解液,室温放置 10min,12000r/min 离心 2min(4℃),上清测胞内 ATP 量。取 0.1mL 荧光素-荧光素酶试剂和样品混合,反应立即被启动。用生物发光计测定反应启动后 10s~30s 内的光子数。在此条件下,细胞内的 ATP 在 2pmol~200pmol 内与测定的光子数成线性关系。

1.6 Δψ 的测定

将含有 10mmol/L 葡萄糖的细胞悬浮液和 0.4μmol/L diSC3-5 混合,直到 diSC3-5 达到最大吸收。然后加入 100mmol/L KCl 来平衡细胞外和胞内的 K⁺ 浓度,各取 1mL 细胞悬浮液,分别加入 1μmol/L nigericin、1μmol/L valinomycin、64AU/mL 植物乳杆菌素,立即测其荧光读数,ex = 622nm,em = 670nm,扫描 10min。由于细胞膜受到破坏,最大吸收荧光量将上升。用细胞和染料的混合物做空白调零。

1.7 ΔpH 的测定

经 10mmol/L 葡萄糖能量化的菌悬液分成 4 管(20μL/管),加入 1μL 50mg/mL (10mmol/L) 的 BCECF,混匀,室温下放置 5min,然后加入 1mL 缓冲液摇匀,12000r/min 离心 1min,沉淀含有一定数量的

BCECF(通过黄色程度可判断)。加入 2~3μL 的 HCl 处理后,用 1mL 缓冲液洗 4 次,摇匀后离心,最终悬浮于 200μL 缓冲液中。1 管做对照,其他 3 管分别加入 1μmol/L nigericin、1μmol/L Valinomycin、64AU/mL 植物乳杆菌素,立即用荧光光度计测其胞内 BCECF 的荧光值,用 5nm 的狭缝,ex = 502nm,em = 525nm,扫描 5min。

1.8 统计分析

采用 SAS8.2 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 细胞内外 K⁺ 和无机磷浓度的变化

为了测定植物乳杆菌素是否引起胞内离子的泄漏,用植物乳杆菌素作用经 10mmol/L 和 100mmol/L 葡萄糖能量化的单核细胞增生李斯特氏菌。由图 1 和图 2 可以看出,植物乳杆菌素引起胞内 K⁺ 和无

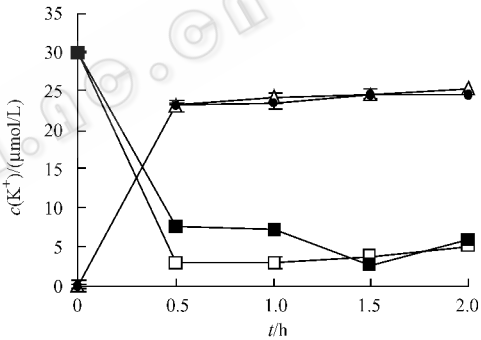


图 1 胞内外 K⁺ 的浓度变化
Fig.1 The K⁺ efflux from energized *L. monocytogenes* 54002 cells. Solid symbols : 100mmol/L glucose ; empty symbols : 10mmol/L glucose. Extracellular K⁺ concentration (▲△); intracellular K⁺ concentration (■□). Values are mean ± standard deviation of two replicate samples.

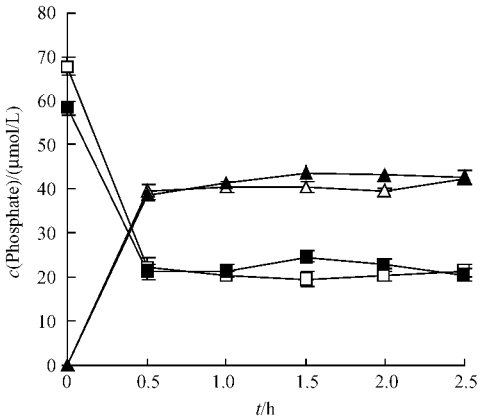


图 2 胞内外无机磷浓度的变化
Fig.2 The phosphate inorganic efflux from energized *L. monocytogenes* 54002 cells. Solid symbols : 100mmol/L glucose ; empty symbols : 10mmol/L glucose. Extracellular P_i concentration (▲△); intracellular P_i concentration (■□). Values are mean ± standard deviation of two replicate samples.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

磷浓度大幅度下降,相应的胞外两种离子的浓度则快速上升,两种无机离子在半小时内即迅速降到较低水平,可见植物乳杆菌素可以快速地引起敏感菌株胞内物质的泄漏。两种浓度(10mmol/L和100mmol/L)的葡萄糖对细菌素的作用影响差异并不显著,所以后面的试验均采用10mmol/L的葡萄糖对指示菌能量化。

2.2 胞外乳酸脱氢酶和紫外吸收物质的测定

乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)是存在于细胞浆内参与糖酵解最后一步即丙酮酸和乳酸相互转化时的一种转化酶,正常情况下,胞外含有少量,但在细胞受损的情况下,就会由细胞漏出至胞外^[5]。有关细菌素引起乳酸脱氢酶外泄的研究国内外均未见报道,由图3显示,经植物乳杆菌素L-1处理过的单核细胞增生李斯特氏菌在前2h内胞外乳酸脱氢酶活力略有上升,在第3小时则明显上升,说明该细菌素对其造成一定的伤害,导致胞内乳酸脱氢酶的部分外泄。值得说明的是,LDH的分子量一般在3000Da左右,胞外含量的上升说明植物乳杆菌素对单核细胞增生李斯特氏菌的破坏作用较大,在其膜上形成的孔洞有可能在0.5nm左右。紫外吸收物质表现出同样的趋势(图4)和对照相比,处理过

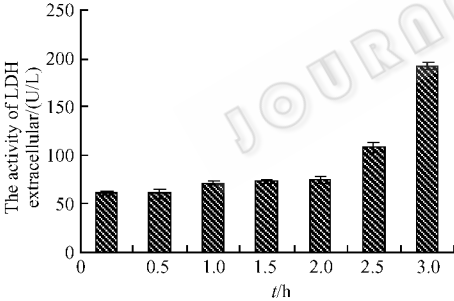


图3 胞外乳酸脱氢酶的测定

Fig.3 The LDH efflux from energized *L. monocytogenes* 54002 cells.

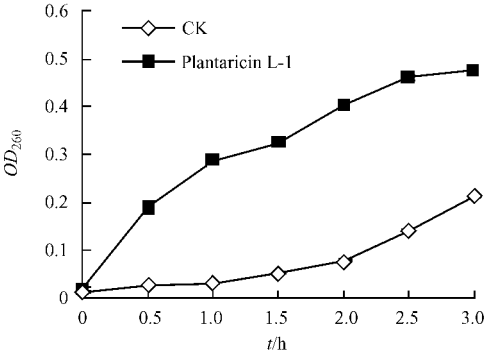


图4 胞外紫外吸收物质的泄漏

Fig. 4 The UV-absorbing materials efflux from energized *L. monocytogenes* 54002 cells.

的指示菌有一部分紫外吸收物质渗出,随着时间延长,量也增加,3h时渗出量趋于缓和。此结果从一个方面验证了植物乳杆菌素对单核细胞增生李斯特氏菌的膜损伤作用。

2.3 胞内外ATP的变化

在最佳条件下,一个光子可以产生一个ATP分子^[6]。经植物乳杆菌素作用后的单核细胞增生李斯特氏菌细胞在30min内发生了ATP的泄漏(图5),图5-A所示为胞外ATP量的变化,对照在半小时内有轻微的上升,细菌素作用过的样品胞外ATP含量则明显上升,约是对照的2.5倍;相应的,对照的胞内ATP量相对稳定,保持在50个光子左右,而细菌素作用过的呈下降趋势,由最初的78降至35个光子(图5-B)。由此可以看出,植物乳杆菌素可以引起敏感菌株胞内ATP的部分外泄,这也从一个方面验证了细胞膜的破坏作用。

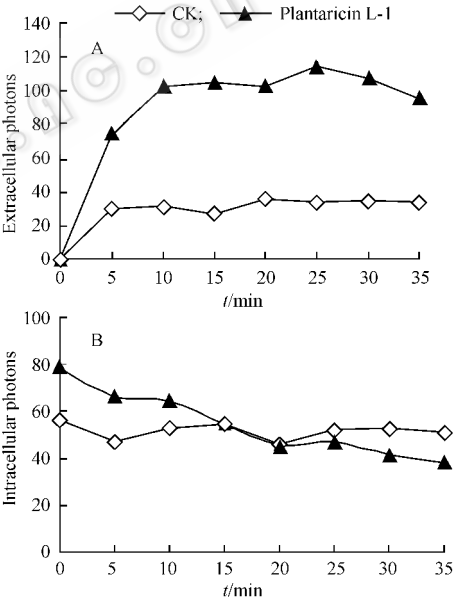


图5 胞内外ATP变化趋势

Fig.5 Effect of plantaricin L-1 on the intracellular and extracellular ATP levels in cells of *L. monocytogenes* 54002 cells.

2.4 Δψ的变化

本试验通过荧光探针 diSC3-5 来定量测定 Δψ,如果膜受到破坏,膜电势将消散,diSC3-5 将释放到培养基中,引起荧光量上升。在 K⁺/H⁺ 离子交换剂 nigericin(1.0μmol/L)存在的情况下,单核细胞增生李斯特氏菌细胞可以维持最大的 Δψ,而 K⁺ 离子载体 valinomycin(1.0μmol/L)可以完全破坏 Δψ。和对照相比,植物乳杆菌素 L-1 的添加引起荧光量的迅速上升,5min后即达到和 valinomycin 一样的破坏效果,可以说导致 Δψ 的完全耗散(图6)。

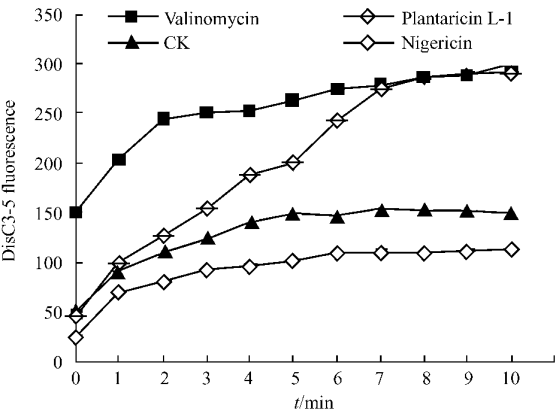


图 6 膜上 $\Delta\psi$ 的变化

Fig.6 Plantaricin L-1 dissipate transmembrane electrical pontia($\Delta\psi$) in *L. Monocytogenes* 54002.

2.5 ΔpH 的变化

胞内 BCECF 的含量变化可以引起荧光值的变化,所以 BCECF 可以作为一种荧光探针监测跨膜 pH 的变化^[7]。1.0 μ mol/L 的 nigericin 可以迅速破坏胞内外的 ΔpH ,导致胞内 pH 和外界环境的 pH 趋同。为了确定 ΔpH 是唯一变量,加入 1.0 μ mol/L 的 valinomycin 将 $\Delta\psi$ 转化为最大量的 ΔpH 。如图 7 所示,加入 valinomycin 和对照的荧光量接近,表明 ΔpH 维持在正常水平,未受到破坏。植物乳杆菌素作用过的单核细胞增生李斯特氏菌胞内荧光量 2min 内迅速上升到最大值并保持稳定,但没有 nigericin 引起的荧光量大,说明植物乳杆菌素引起 ΔpH 的部分耗散而不是完全丧失。

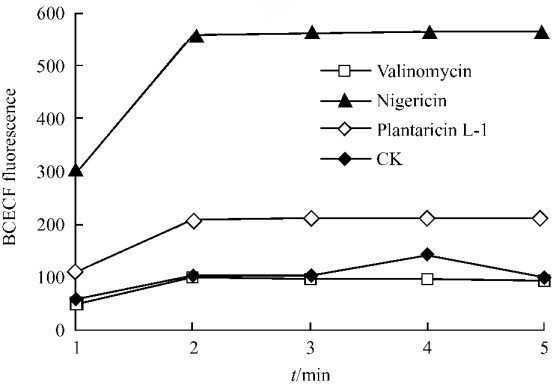


图 7 ΔpH 的变化

Fig.7 The efflux of the fluorescence dye BCECF caused by Plantaricin L-1.

3 讨论

本研究初步探讨了植物乳杆菌素 L-1 的作用机理,结果表明植物乳杆菌素通过增加敏感细胞的膜

通透性来诱导细胞死亡,通透性的改变导致了钾离子和无机磷酸盐及紫外吸收物质的流出,这种作用的进一步结果是引起构成质子动力势的成分 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 的消耗。Nes 等^[8]在对 II 类细菌素的研究中报道了相对具体孔洞的形成,这些孔洞都具有消耗跨膜 PMF 的可能性。Montvill 等^[9]报道了来自乳杆菌的细菌素也通过相似的作用机理来消耗质子动力势。但是,已经在多种抑菌系统中观察到一些例外,二肽类细菌素 lacticin 3127 和 lactococcin G 能够有选择性的消耗膜电势和水解内部的 ATP 从而导致最后的 pH 梯度崩溃^[10,11];另一些二肽类细菌素如 plantaricins EF、plantaricins JK 及 acidocin J1132 使目标细胞增加了渗透性从而以一种非选择性方式消耗了跨膜电势和 pH 梯度。

和其他乳酸菌素一样,植物乳杆菌素 L-1 作用的主要部位在细胞膜上,经葡萄糖活化后的指示菌,增强了植物乳杆菌素的抑菌作用,也就是在质子动力势发生改变后,细菌素插入到细胞膜中,而这一结果与孔洞形成相类似^[12]。植物乳杆菌素对低水平能量化(10mmol/L 葡萄糖)和高水平能量化(100mmol/L 葡萄糖)的细胞诱导死亡的效率一样,McAuliffe 等^[10]比较了 lacticin 3147 在能量化和非能量化细胞中的作用效果,发现对能量化的敏感菌作用效果更好。细菌素发挥抑菌活性对能量的需求对其在食品防腐上的应用具有直接影响,因为复杂并且营养丰富环境给食品中的腐败菌和病原菌提供了充足的能量。

植物乳杆菌素对单核细胞增生李斯特氏菌细胞的作用也引起内部磷酸盐的释放, K^+ 也很快通过非选择性孔洞外泄,对不同能量化的细胞,两种离子的渗透量没有很大差异。Patricia^[13]认为这两种主要离子的损失可能会引起 ATP 水解,也就是依赖于 ATP 的摄取系统试图通过水解 ATP 重新积累 K^+ 和无机磷离子,这种无效的水解最终导致了 ΔpH 的崩溃。值得注意的是,本研究首次测定了胞外乳酸脱氢酶的变化,增加了对细胞膜损伤程度的定性,这在国内外未见有同类的报道。

现有的数据显示,植物乳杆菌素的杀菌作用通过在细胞膜上形成孔洞结构而产生,此过程消耗了质子梯度,从而导致了目标菌的抑制作用。这些结果都在经葡萄糖能量化的敏感细菌中观察到,因此这些参数与其他食品成分共同对细菌素的活性产生相当有意义的影响。

参 考 文 献

- [1] 周 伟,李平兰,周 康,等.温度、pH 及盐对植物乳杆菌素 L-1 作用单核细胞增生李斯特氏菌的影响. *食品科学*, 2006, **27**(2):121 – 125.
- [2] Bauer R, Dicks LMT. Mode of action of lipid II -targeting lantibiotics. *Int J Food Microbiol*, 2005, **10**(2):201 – 216.
- [3] Montville TJ, Winkowski K, Ludescher RD. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. *Int Dairy Journal*, 1995, **5**(8):797 – 814.
- [4] Ames BN. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol*, 1966, **8**:115 – 118.
- [5] 洪庆涛,宋岳涛,唐一鹏,等.细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**(1):89 – 92.
- [6] 李宗军,徐建兴.超高压处理对微生物生理特性的影响. *微生物学报*, 2005 **45**(4):522 – 525.
- [7] Wu M, Maier E, Benz R, *et al.* Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1999, **38**(22):7235 – 7242.
- [8] Nes IF, Holo H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 2000, **55**(1):50 – 61.
- [9] Montville TJ, Bruno MEC. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int J Food Microbiol*, 1994, **24**(2):53 – 74.
- [10] McAuliffe O, Ryan MP, Ross RP, *et al.* Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(2):439 – 445.
- [11] Moll GN, Clark J, Chan WC, *et al.* Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. *J Bacteriol*, 1997, **179**(1):135 – 140.
- [12] Moll GN, Konings WN, Driessen AJM. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1999, **76**(1-4):185 – 198.
- [13] Patricia C, Raul R, Graciela V. Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *Int J Food Microbiol*, 2003, **85**(1-2):35 – 43.

Mode of action of plantaricin L-1, an antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*

ZHOU Wei, LIU Guo-rong, LI Ping-lan*, DAI Yun-qing, ZHOU Kang

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Plantaricin L-1, an anti-*Listeria* bacteriocin, was produced by *Lactobacillus plantarum* and successfully purified by SP-Sepharose FF cation exchange chromatography. The mechanism on energized cells of *Listeria monocytogenes* was studied with purified plantaricin L-1. After adding plantaricin L-1 to *Listeria monocytogenes* at 64 AU/mL, leakage of intercellular K^+ ions, inorganic phosphate, lactic dehydrogenase, UV-absorbing materials and the intracellular ATP was observed, and the action resulted in the dissipation of the membrane potential ($\Delta\psi$) and pH gradient (ΔpH), two components of the proton motive force (PMF). All the data suggested that the primary site of action of plantaricin L-1 was the cytoplasmic membrane of sensitive cells. By forming the nonselective pores which leak ions and small organic compounds plantaricin L-1 induced the cells death, this action was similar to membrane corruption caused by peptide effect. Penetrability increased due to the enlarged pore and dysfunction of membrane transporters, which ensured efficient killing of target bacteria.

Keywords: plantaricin; mode of action; *Listeria monocytogenes*