



研究报告

短双歧杆菌对鼠伤寒沙门氏菌的抑制

赵梓雯 杨虹*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】鼠伤寒沙门氏菌是主要的肠道病原菌之一，利用益生菌治疗肠道病原菌感染已成为一种新型、绿色的微生态疗法。【目的】研究筛选出的短双歧杆菌无细胞发酵上清液(Cell-free supernatant, CFS)对鼠伤寒沙门氏菌的体外抑制作用及机制。【方法】采用微量稀释法测定短双歧杆菌 YH68 CFS 对鼠伤寒沙门氏菌的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)和亚抑制浓度(Sub-inhibitory concentrations, SIC)，并从鼠伤寒沙门氏菌的细胞形态、细胞膜通透性、膜完整性以及毒力基因表达的变化探讨 YH68 CFS 对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌机理，同时检测 YH68 CFS 对鼠伤寒沙门氏菌粘附和侵袭肠上皮细胞 HT29 的影响。【结果】YH68 CFS (3×10^9 CFU/mL)对鼠伤寒沙门氏菌具有较好的抑制效果，抑菌圈直径为 22.27 ± 0.44 mm，最小抑菌浓度为 $250 \mu\text{L/mL}$ ，对鼠伤寒沙门氏菌的抑制机制是通过增加其细胞膜通透性破坏其完整性，形成难以修复的孔洞，最终达到抑菌的目的；亚抑制浓度为 $62.5 \mu\text{L/mL}$ 时 YH68 CFS 并不能影响鼠伤寒沙门氏菌的生长，但仍然能通过下调毒力基因表达的方式抑制其对肠上皮细胞的粘附和入侵。【结论】短双歧杆菌 YH68 对鼠伤寒沙门氏菌具有良好的抑菌作用，可作为治疗沙门氏菌感染的潜在益生菌。

关键词：鼠伤寒沙门氏菌，益生菌，抑菌机制，毒力基因

Inhibition of *Salmonella typhimurium* by *Bifidobacterium breve*

ZHAO Zi-Wen YANG Hong*

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] *Salmonella typhimurium* is one of the major intestinal pathogens. The use of probiotics to treat intestinal pathogen infection has becoming a new, green micro-ecological method. [Objective] Investigate the antibacterial activity and mechanism of the cell-free supernatant (CFS) of *Bifidobacterium breve* on *S. typhimurium* *in vitro*. [Methods] The microdilution method was used to detect the minimum inhibitory concentration (MIC) and sub-inhibitory concentration (SIC) of YH68 CFS against *S. typhimurium*. The antibacterial mechanism of YH68 CFS against *S. typhimurium* was investigated from the changes of cell morphology, cell membrane permeability, membrane integrity and virulence gene expression of *S. typhimurium*. The adhesion and invasion of *S. typhimurium* to HT29 cells were also studied. [Results] YH68 CFS (3×10^9 CFU/mL) has a good inhibitory effect on *S. typhimurium*, and the

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (21477077)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34205343; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

Received: 01-11-2018; Accepted: 21-02-2019; Published online: 23-07-2019
基金项目：国家自然科学基金(21477077)

*通信作者：Tel: 021-34205343; E-mail: hongyang@sjtu.edu.cn

收稿日期：2018-11-01；接受日期：2019-02-21；网络首发日期：2019-07-23

diameter of the inhibition zone is 22.27 ± 0.44 mm. When YH68 CFS was at MIC concentration ($250 \mu\text{L}/\text{mL}$), its mechanism of action against *S. typhimurium* was to increase the membrane permeability, destroy its integrity, form the cell membrane pores, and ultimately achieve antibacterial purposes. However, YH68 CFS did not affect the growth of *S. typhimurium* at the concentration of SIC ($62.5 \mu\text{L}/\text{mL}$), but it could still inhibit the adhesion and invasion of intestinal epithelial cells by down-regulating the expression of its virulence genes. **[Conclusion]** *Bifidobacterium breve* YH68 has a good antibacterial effect against *S. typhimurium* and could be used as a potential probiotic for clinical treatment of *Salmonella* infection.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, Probiotics, Antibacterial mechanism, Virulence gene

由食源性致病菌引发的食物中毒已经成为严重的公共卫生问题之一, 在全球范围内得到了广泛关注。在各类细菌性感染中, 由沙门氏菌引起的中毒在食源性中毒事件中占比较大, 位居第三^[1]。根据美国疾病预防控制中心(Centers for disease control and prevention, CDC)的统计, 沙门氏菌在美国每年导致约 120 万例疾病, 约 450 例造成死亡^[2]。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*)作为沙门氏菌最常见的血清型, 是世界范围内分布最广泛的人畜共患食源性病原体之一, 也是导致急性腹泻的主要致病因子, 主要病症包括局部胃肠炎和全身性感染^[3]。

沙门氏菌利用菌毛粘附在肠道上皮细胞表面, 进而入侵细胞组织造成损伤, 最终诱发严重感染甚至死亡。针对沙门氏菌所引起的感染, 目前主要的治疗手段是应用氟喹诺酮类药物或广谱头孢菌素^[4]。但是由于抗生素在人药和畜牧业的滥用, 导致近年来沙门氏菌耐药性逐渐增强、耐药谱加宽等一系列严重问题^[5]。另外抗生素对肠道菌群的破坏等问题也相继产生, 这说明采用传统的抗生素疗法愈加困难。因此, 在临床上有待开发新型绿色的抗感染药物来预防和治疗沙门氏菌感染, 其中从微生物或植物中寻找抗生素替代品是当前的研究热点之一。

大量研究表明, 益生菌作为人体肠道菌群的重要组成部分之一, 在胃肠微生态环境保护、机体免疫力增强, 以及抗菌治疗方面有优于药物的功效, 许多研究相继证明了益生菌对肠道病原菌包括沙门氏菌属有良好的拮抗作用。如 Kemgang 等证明了

鼠李糖乳杆菌 S1K3 的无细胞发酵上清液对沙门氏菌良好的抑菌活性, 并且在小鼠模型中降低了粪便的沙门氏菌数量^[6]。现阶段关于益生菌对病原微生物的拮抗作用已经提出了许多理论, 包括竞争排斥^[7]、病原体生长抑制^[8]、宿主免疫调节^[9]等。但益生菌的益生作用具有由属至种最后明确到单一菌株的特异性^[10], 而短双歧杆菌拮抗鼠伤寒沙门氏菌的确切机制尚不明确。

抑菌剂在临床应用上到达肠道时往往已被稀释, 难以达到直接抑菌的效果, 但某些药物和天然化合物已被证实, 在亚抑制浓度(Sub-inhibitory concentrations, SIC)下即使无法抑制致病菌生长, 也能对其毒力产生重要的影响。Li 等发现了真菌聚酮化合物在 SIC 水平下可以对沙门氏菌 I 型毒力岛(SPI-1)相关基因的表达起到显著抑制作用, 最终降低沙门氏菌侵袭 HeLa 细胞的能力^[11]。然而, 也有部分学者发现 SIC 水平的某些化合物会使致病菌的毒性增加^[12]。目前尚无益生菌在 SIC 水平下对 *S. typhimurium* 毒性影响的相关研究, 基于此, 本研究增加短双歧杆菌在 SIC 水平下对 *S. typhimurium* 的抑菌作用考察, 这对实际应用中短双歧杆菌的剂量使用具有指导意义。

本研究从多株实验菌株中筛选到一株具有优良拮抗 *S. typhimurium* 能力的短双歧杆菌 YH68, 并基于它在体外的抑菌活性深入研究其对于 *S. typhimurium* 感染抗性的机制。同时, 采用肠上皮细胞系模型研究 YH68 对 *S. typhimurium* 感染宿主细胞的影响, 从分子、细胞多方面进行考察, 为益生菌预防和治疗沙门氏菌感染提供更深入的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与细胞株

鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028 购买自美国菌种保藏中心; 实验用益生菌菌株(短双歧杆菌菌株)由嘉兴益诺康生物科技有限公司提供, 益生菌菌株信息如表 1 所示。人结肠癌细胞株 HT29 购买自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 主要试剂

LB 培养基、琼脂糖、0.22 μm 微孔滤膜, 生工生物工程(上海)股份有限公司; MRSc 培养基[加 0.05% (质量体积比)的 L-半胱氨酸], Oxford 公司; 无水乙醇(分析纯)、叔丁醇(分析纯)、戊二醛(优级纯), 国药集团化学试剂有限公司; LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit L13152、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、细胞培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、庆大霉素、0.5% Triton X-100, 赛默飞世尔科技公司; 细菌总 RNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; TransStart Top Green qPCR SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司; 荧光定量聚合酶链式反应应用引物由华大基因合成。

1.1.3 仪器与设备

紫外分光光度计, 上海尤尼科仪器有限公司; 全波长酶标仪, PE 公司; 微机型电导率仪, 上海般

特仪器有限公司; 荧光定量 PCR 仪, Eppendorf 公司; 高分辨场发射扫描电子显微镜, FEI 公司; TCS SP8 STED 3X 激光共聚焦显微镜, 徕卡公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的筛选

(1) 菌株的培养

将 *S. typhimurium* 接种于新鲜的 LB 培养基中, 生长至对数期时再次转接于新鲜培养基, 传代 3 次后, 将菌液与 25% (体积比)的甘油以等体积混合后存放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。活化时将冻存的菌液解冻后 1% (体积比)接种于 LB 培养基中, 在恒温摇床中约 45° 角倾斜放置, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床振荡培养 12 h, 备用。

(2) 益生菌无细胞发酵上清液 (Cell-free supernatant, CFS)的制备

将待筛选的益生菌菌株通过 3 次接种传代, 按 1%接种量重新接种于新鲜 MRSc 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 18–24 h。将菌液通过麦氏比浊法调整细胞数为 3×10^9 CFU/mL, 离心 ($10\,000\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 收集上清液并用 0.22 μm 滤膜过滤除去菌体细胞, 将滤液置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

(3) 牛津杯扩散实验

将生长至对数中期的 *S. typhimurium* 浓度调节至 10^6 CFU/mL, 取 200 μL 菌液至 LB 平板上涂布均匀, 用镊子将牛津杯小心地放置于平板上, 取不同的益生菌上清液 200 μL 注入杯内, 以 MRSc 液体培养基作为阴性对照。先在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱扩散 4 h, 然后将平板转移至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 24 h 后观察抑菌结果并用游标卡尺测量抑菌圈的直径。

1.2.2 抑菌有效成分分析

(1) 有机酸排除试验

用 1 mol/L 的 NaOH 调节 YH68 CFS 的 pH 至 7.0, 取 200 μL 样品注入牛津杯中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径, 以未处理的 YH68 CFS 作为对照, 以此排除发酵液中有机酸的抑制作用, 重复 3 次测定平均值。

(2) 过氧化氢排除试验

表 1 实验用益生菌菌株短双歧杆菌

Table 1 Probiotics strains *Bifidobacterium breve* in experiment

菌株编号 Strains No.	菌株来源 Origins
BB01	Human
BB02	Human
BB04	Human
BB05	Human
BB08	Human
BB11	Human
BB15	Human
YH68	Human

用 1 mol/L 的 NaOH 调节 YH68 CFS 的 pH 至过氧化氢酶最适 pH 7.0, 向其中加入终浓度为 5 mg/mL 的过氧化氢酶, 37 °C 恒温水浴 2 h 后取出, 将样品调至原 pH 3.6, 用牛津杯扩散法测定其抑菌效果, 对照组为未经过氧化氢酶处理的 YH68 CFS, 重复 3 次测定平均值。

(3) 蛋白酶敏感试验

用 1 mol/L 的 NaOH 调节 YH68 CFS 的 pH 至蛋白酶 K 最适 pH 8.0, 加入酶母液至蛋白酶 K 最终质量浓度为 1 mg/mL, 37 °C 水浴 2 h 后取出, 将样品调至原 pH 3.6, 用牛津杯扩散法测定其抑菌活性, 对照组为未经蛋白酶 K 处理的 YH68 CFS, 重复 3 次测定平均值。

(4) 热处理试验

将 YH68 CFS 在 121 °C 下加热 20 min, 取 200 μ L 样品注入牛津杯中, 37 °C 恒温培养 24 h 测定其抑菌效果, 以 4 °C 保存的 YH68 CFS 为对照, 重复 3 次测定平均值。

1.2.3 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌活性分析

(1) 最小抑菌浓度(MIC)和亚抑制浓度(SIC)的确定

取 1 mL 细胞数为 3×10^9 CFU/mL 的 YH68 无细胞发酵上清液原液, 通过最小二倍稀释法将上清液稀释为原来的 5%–90% (体积比), 从中取 100 μ L 加入 96 孔板中, 再接入 100 μ L 的 *S. typhimurium* 菌液 (1×10^6 CFU/mL), 阴性对照为 LB 肉汤, 阳性对照孔为未经处理的 *S. typhimurium* 菌液。37 °C 培养 24 h 后, 用酶标仪测定在 600 nm 下的吸光度值, 以未见指示菌生长的 YH68 CFS 的最小体积分数作为其对 *S. typhimurium* 的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)^[13], 不抑制细菌生长的 YH68 CFS 最大体积分数作为亚抑制浓度(Sub-inhibitory concentrations, SIC)^[14]。一式 3 份, 重复 3 次。

(2) 生长曲线的绘制

将培养液调节为含有不同体积分数的 YH68

CFS (0、SIC、MIC, 其中空白组加入等体积的无菌水), 接种等量的 *S. typhimurium* 使细菌浓度均为 10^6 CFU/mL, 37 °C、150 r/min 摇床振荡孵育, 每隔 1 h 测定菌液 OD_{600} 至 16 h, 绘制 *S. typhimurium* 在不同处理下的生长曲线。

(3) 时间-杀菌曲线的绘制

收集培养至对数生长期的 *S. typhimurium* 菌体细胞, 制备浓度为 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 并向其中加入不同浓度的 YH68 抑菌活性物质, 使其终浓度分别达到 0、SIC、MIC, 37 °C 培养 24 h, 在 0、4、8、12、16、20、24 h 分别从每个组别的离心管中吸取培养液, 用 LB 肉汤进行 10 倍系列梯度稀释, 并在 LB 平板上接种, 37 °C 恒温培养 24 h, 通过肉眼对菌落进行计数以记录动力学增长信息, 重复 3 次。以时间为横坐标, \log_{10} CFU/mL 作为纵坐标, 绘制时间与活菌数变化曲线。

1.2.4 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌抑制的机制研究

(1) 不同处理下鼠伤寒沙门氏菌菌悬液的制备

收集培养至对数生长期的 *S. typhimurium* 菌体细胞, 用 0.1 mol/L pH 7.0 的 PBS 缓冲液反复洗涤 3 次后, 重悬于无菌水中, 制备成菌悬液 (10^6 CFU/mL), 并向其中加入适量体积的 YH68 抑菌活性物质, 使其最终浓度为 SIC、MIC 水平, 以加入等体积无菌水的菌悬液作为空白对照, 37 °C 恒温培养 3 h。

(2) YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌形态结构的影响

采用扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 观察 *S. typhimurium* 菌体形态结构的变化, 将 1.2.3 (1) 中的菌悬液离心 ($8\ 000 \times g$, 10 min, 4 °C), 保留菌体细胞并用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液反复清洗 3 遍, 收集菌体; 用 2.5% 的戊二醛 (PBS 稀释) 固定 3 h 后, 再用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 接着用体积分数为 30%、50%、70%、80%、90%、100% 的乙醇溶液对样品进行梯度洗脱处理, 每次脱水时间为 10 min; 再用叔丁醇代替乙醇, 将样品置于临界点干燥机中干燥; 将干燥好的

样品经离子溅射仪进行离子喷金,最后通过 SEM 观察并采集图像。

(3) YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌细胞膜通透性的影响

通过测定空白对照组与处理组菌液相对电导率的变化来表示 YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 细胞膜通透性的影响^[15]。分别在 0、0.5、1、2、3、4、5、6 h 时间点取出 1.2.2 (1) 节中各组菌悬液 5 mL, 将样品进行离心(8 000×g, 10 min, 4 °C)获得上清液, 用电导率仪对上清液进行电导率的测定。

(4) YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌细胞膜完整性的影响

1) 紫外吸收物质的测定

通过在 260 nm 和 280 nm 波长处监测细胞外紫外吸收物质的含量变化^[16], 初步分析 YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 细胞膜完整性的影响作用。分别在 0、30、60、90、120、150、180 min 从对照组和处理组中的细胞悬液中取样。将样品离心(8 000×g, 1 min, 4 °C), 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。收集上清液进行 10 倍比稀释, 取 200 μL 稀释液加入 96 孔板, 用酶标仪测量 OD_{260} 和 OD_{280} , 重复 3 次。

2) 激光共聚焦显微镜观察

SYTO-9 可以标记完整或受损的细胞膜, 而 PI 染料只能标记受损的细胞膜。根据 SYTO-9 染料和 PI 染料竞争性绑定细菌核酸的原理, 采用 SYTO-9 和 PI 荧光染料对 *S. typhimurium* 细胞进行双染, 再次分析细胞完整性情况^[17]。具体方法为: 在暗室环境下打开 LIVE/DEAD™ BacLight L13152 试剂盒, 用 A 吸管吸取 2.5 mL 去离子水, 配成 2×SYTO-9 储存液; 用 B 吸管吸取 2.5 mL 去离子水, 配成 2×PI 储存液, 两管染料 1:1 混和后配成工作染料。在本实验中设置阳性对照组, 即加入等体积的 70% 异丙醇处理 3 h。将空白组、处理组、异丙醇阳性对照的菌悬液离心(10 000×g, 2 min, 4 °C), 并用无菌生理盐水重悬。然后按工作染料与菌悬液 1:1 (体积比) 的比例加入混匀, 在 37 °C 避光孵育 15 min, 再次离心(10 000×g, 10 min, 4 °C), 收集被标记的菌

体细胞, 无菌生理盐水重复漂洗 3 次并重悬。取 3 μL 悬液滴到载玻片上, 加上盖玻片置于激光共聚焦显微镜下观察细胞染色情况并采集复合图片。

(5) YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌致病相关毒力基因的影响

用试剂盒提取不同处理下的鼠伤寒沙门氏菌总 RNA, 用 DNase 去除污染的基因组 DNA。将总 RNA 逆转录合成 cDNA。逆转录体系: 总 RNA 1 μg, Oligo dT 1 μL, 5×Buffer 4 μL, dNTPs (10 mmol/L) 2 μL, RNase Inhibitor 1 μL, ReverTraAce 1 μL, 用 ddH₂O 补足至 20 μL。逆转录条件: 65 °C 5 min; 37 °C 15 min; 98 °C 5 min。将 RNA 和逆转录的 cDNA 分别于 -80 °C 和 -20 °C 保存备用。采用荧光定量 PCR 方法通过特异性引物来检测 *S. typhimurium* SPI-1 相关基因的表达量, 其中引物由 Premier 5.0 软件设计, 由华大基因合成(引物序列见表 2)。PCR 反应体系: cDNA 1 μL, SYBR PremixExTaq (2×) 7.5 μL, 正、反向引物(0.5 μmol/L)各 0.3 μL, ddH₂O 5.9 μL。以 *S. typhimurium* 的 16S rRNA 基因作为内参, PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 40 次。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对数据进行处理, 确定基因的相对表达量。

1.2.5 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌粘附和入侵肠上皮细胞的影响

(1) 细胞的培养

将人结肠癌细胞 HT29 按常规传代培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640、100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的细胞培养液中, 于 37 °C 的 CO₂ 培养箱(5% CO₂, 95% 空气)中培养, 每 48 h 换一次培养液。待细胞生长融合至 70%–80%, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代, 通常传代 5 次左右进行试验, 调整浓度约为 2.5×10^5 cells/mL 备用。

(2) YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌粘附肠上皮细胞的影响^[18]

在 24 孔细胞培养板中加入细胞悬液(1 mL/孔), 于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 孵育, 待细胞汇成单层时(细胞数约为 2.5×10^5 cells/孔), PBS 清洗 3 次,

表 2 实时荧光定量 RT-PCR 引物

Table 2 Primers used in real-time fluorescence quantification PCR

目的基因名称 Target genes name	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
<i>hilA</i>	<i>hilA</i> -fw	TGACCATTACGAAGAACTG
	<i>hilA</i> -rv	GGAATACATCTGAGCAA
<i>fimA</i>	<i>fimA</i> -fw	TACTATTGCGAGTCTGATGTT
	<i>fimA</i> -rv	CAGGACGATGGAGAAAGG
<i>invF</i>	<i>invF</i> -fw	TCGCCAAACGTCACGTAGAA
	<i>invF</i> -rv	CATCCCGTGTATAACCCCCG
<i>sipA</i>	<i>sipA</i> -fw	CCAACGCAATGGCGAGTCAC
	<i>sipA</i> -rv	GCCGTCTCCGTTTGATGCGT
<i>sipB</i>	<i>sipB</i> -fw	GTATGGCAGGCGATGATTGA
	<i>sipB</i> -rv	ATAAACACTCTTGGCGGTATCC
16S rRNA	16S rRNA-fw	CGATGTCTACTTGGAGGTTGTG
	16S rRNA-rv	CTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTC

将不同处理的 *S. typhimurium* 按照感染复数 100:1 与 HT29 细胞共培养 2 h。孵育结束后, PBS 洗涤细胞 3 次, 洗去未载附至细胞的细菌。之后加入 100 μ L 0.5% Triton X-100 作用 5 min, 反复吹打使细胞溶解。将裂解液用 PBS 缓冲液 10 倍比系列稀释, 取适量稀释液涂布于 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 进行菌落计数, 设 3 个重复孔。通过吉姆萨染色法观察粘附情况, 实验方法与上述操作相同, 只需要培养前在孔板底加入无菌盖玻片, 洗去未载附至细胞的细菌后用 70% 的甲醇固定 10 min, 用吉姆萨染液对细胞染色, 对 *S. typhimurium* 粘附 HT29 细胞的情况拍照记录。

粘附率 = $\text{CFU}_{\text{rec}} / \text{CFU}_{\text{added}} \times 100\%$ (其中 CFU_{rec} 表示细胞裂解后的细菌数, $\text{CFU}_{\text{added}}$ 表示加入孔中的细菌数)。

(3) YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌侵袭肠上皮细胞的影响

侵袭实验采用庆大霉素保护法^[19]。培养方法同 1.2.4 (2), 待 *S. typhimurium* 与细胞共孵育 2 h 后, 用 PBS 冲洗 3 次以除去未粘附的细菌, 再加入含有庆大霉素 (100 μ g/mL) 的 RPMI-1640 培养液, 于 5% CO_2 细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 以杀死粘附在细胞表面未侵入的 *S. typhimurium*。PBS 冲洗细胞

3 次, 每孔加入 100 μ L 0.5% Triton X-100 作用 5 min, 反复吹打使细胞裂解脱落。将裂解液进行 10 倍比系列稀释, 取适量稀释液接种于 LB 平板进行活菌平板计数, 设 3 个重复孔。对入侵情况进行吉姆萨染色, 实验方法与上述操作相同, 只需在培养前在孔底加入无菌盖玻片, 待庆大霉素杀死粘附在细胞表面未侵入的 *S. typhimurium* 后 70% 的甲醇固定 10 min, 用吉姆萨染液对细胞染色, 对 *S. typhimurium* 入侵细胞的情况拍照记录。

侵袭率 = $\text{CFU}_{\text{intra}} / \text{CFU}_{\text{added}} \times 100\%$ (其中 $\text{CFU}_{\text{intra}}$ 表示细胞内的细菌数, $\text{CFU}_{\text{added}}$ 表示加入孔中的细菌数)。

1.2.6 数据分析统计

每个试验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 用 SPSS 17.0 (V20.0) 软件进行统计分析, 使用方差分析 (One-way ANOVA, Turkey) 对结果进行差异比较, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 益生菌的筛选

待筛选的益生菌 CFS 对 *S. typhimurium* 的抑菌圈直径如表 3 中所示。可知所测试的短双歧杆菌对 *S. typhimurium* 都有不同程度的抑制作用, 大多数菌

株的抑菌圈直径平均值在 11 mm–19 mm, 其中 YH68 具有最强的抑菌能力, 抑菌圈直径为 22.27 mm, 可作为后续试验菌株进行拮抗 *S. typhimurium* 的活性和机制研究。

2.2 抑菌有效成分分析

2.2.1 有机酸排除试验

将实验组的发酵上清液 pH 调至 7.0, 以未处理的发酵上清液为对照, 通过牛津杯法测定抑菌圈的大小。如表 4 所示, 实验组与对照组的抑菌圈直径相比明显减小 ($P < 0.05$), 说明无细胞发酵液中有有机酸起到了很大的抑菌作用。但此时上清液仍具有一定的抑菌活性, 说明排除有机酸的作用后, 上清液中仍然存在其他的抑菌物质。

2.2.2 过氧化氢排除试验

短双歧杆菌不含过氧化氢酶, 产生的过氧化氢不断累积, 可能会对致病菌产生抑制作用。过氧化氢排除实验的结果如表 4 所示, 经过过氧化氢酶处理后的无细胞发酵液与对照组相比抑菌圈直径并没有显著变化, 因此可以排除发酵上清液中过氧化氢的抑菌作用。

2.2.3 蛋白酶敏感试验

由表 4 可以看出, 蛋白酶 K 处理后无细胞发酵

表 3 益生菌无细胞发酵液对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈直径

Table 3 Antibacterial circle diameter of probiotic cell-free supernatant to *S. typhimurium*

菌株编号 Strains No.	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
MRS	8.00±0.00 ^f
BB01	17.47±0.18 ^{bc}
BB02	18.29±0.36 ^b
BB04	16.43±0.38 ^{cd}
BB05	15.33±0.20 ^d
BB08	16.38±0.75 ^{cd}
BB11	16.01±0.32 ^d
BB15	11.63±0.32 ^e
YH68	22.27±0.44 ^a

注: 不同字母代表组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters means significant difference between groups ($P < 0.05$).

液的抑菌圈大小与对照组相比有所减小, 抑菌活性下降了 13.6%, 这说明上清液中的活性物质对蛋白酶敏感, 可能存在抗菌类蛋白。

2.2.4 热处理试验

将 YH68 无细胞发酵液经 121 °C 加热处理后做抑菌活性检测, 由表 4 可知, 热处理后提取物的抑菌活性有大幅度下降, 但是其对指示菌的抑菌活性仍较高, 由此可见 YH68 无细胞发酵液中的抑菌物质具有一定的热稳定性。

2.3 YH68 对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌活性分析

2.3.1 MIC 和 SIC 的确定

当 3×10^9 CFU/mL 细胞数对应的 YH68 CFS 稀释到 $\geq 50\%$ 原液时, 菌悬液中 OD_{600} 未见增大, 由此确定 YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 的最小抑菌浓度为 250 μ L/mL (体积比), 而 YH68 CFS 稀释至 $\leq 12.5\%$ 原液时, 菌悬液中 OD_{600} 未见减小, 确定亚抑制浓度为 62.5 μ L/mL (体积比)。

2.3.2 生长曲线的绘制

在适宜生长条件下, 细菌生长会表现出具有规律性的 3 个阶段: 延滞期、对数期、稳定期^[20]。空白组以及处理为 SIC、MIC 浓度时的生长曲线见图 1。结果发现, *S. typhimurium* 在 SIC 剂量作用时与空白组的生长曲线基本一致, 这也与微量稀释法的结果相同。空白组和 SIC 组的吸光度值都不断增加,

表 4 短双歧杆菌 YH68 无细胞发酵液在不同处理方式下对鼠伤寒沙门氏菌的抑制作用

Table 4 Effect of different treatments for cell-free supernatant of YH68 on its inhibition against *S. typhimurium*

处理方式 Processing method	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
pH 7.0	12.56±0.27 ^c
过氧化氢酶处理 Catalase treatment	22.00±0.57 ^a
蛋白酶 K 处理 Protease K treatment	19.14±0.39 ^b
121 °C 加热处理 121 °C heat treatment	17.94±0.28 ^b
发酵原液 The fermentation liquid	22.14±0.52 ^a

注: 不同字母代表组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters means significant difference between groups ($P < 0.05$).

在 2–8 h 内, 吸光值成指数增加, 在 8–12 h 内吸光值增长变得缓慢, 12 h 后趋于稳定, 说明在有限的生存空间和营养条件下, 细菌的数量达到了最大。而 MIC 处理组在 0–3 h 内 *S. typhimurium* 没有表现出明显的生长趋势, 延滞期与空白组相比明显延长, 在 4 h 进入指数期, 4–9 h 内吸光度值也在不断升高, 但细菌生长速度要低于空白组, 这说明 YH68 CFS 破坏了细菌正常的生长周期和细胞分裂。在 9–16 h 内吸光值趋于平稳, 但吸光度峰值明显低于对照组, 具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。这些都说明 YH68 CFS 在 MIC 浓度下对 *S. typhimurium* 生长起到了抑制作用, 而在亚抑制浓度下对 *S. typhimurium* 生长几乎没有抑制作用。

2.3.3 时间-杀菌曲线的绘制

时间-杀菌曲线可以提供细菌生长动力学相关信息^[21], 结果见图 2。对照组、SIC 剂量处理组菌落数在 0–12 h 呈现上升趋势, 12–24 h 趋于稳定或者略有下降, 并且在 SIC 剂量作用下, 曲线走势与对照组几乎一致, 菌落数虽略有减少, 但没有明显差异, 可认为 SIC 剂量对 *S. typhimurium* 生长没有抑制作用。而在 MIC 剂量作用时, *S. typhimurium* 的生长受到了明显的抑制作用, 活菌数变化显著 ($P < 0.05$)。前 12 h 菌落数呈现了快速下降的趋势, 12 h 时活菌数由 $6.1 \text{ Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 减少至活菌数

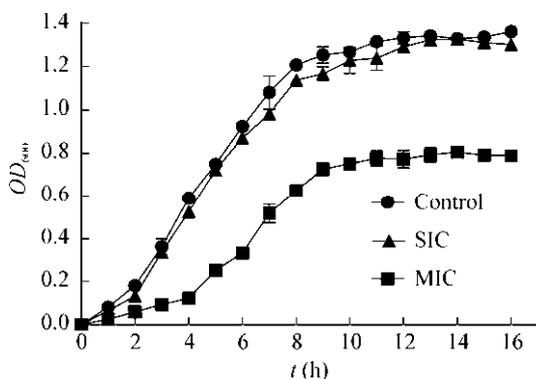


图 1 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌的生长曲线

Figure 1 The growth curves of *S. typhimurium* on the effect of YH68 CFS

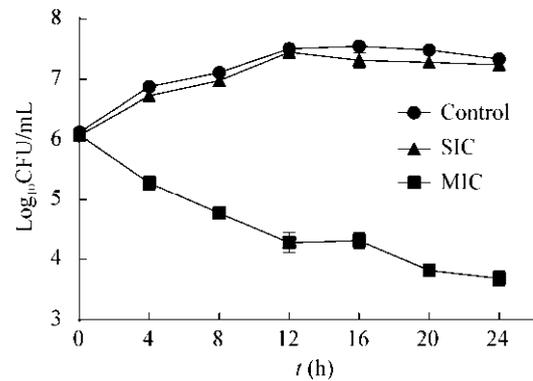


图 2 YH68 抑菌活性物质作用下的鼠伤寒沙门氏菌时间-杀菌曲线

Figure 2 Time-kill curves of *S. typhimurium* on the effect of YH68 CFS

4.3 $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$, 下降了 $1.8 \text{ Log}_{10}\text{CFU/mL}$, 经过 24 h 时菌落数下降量达最大值, 下降了 $2.4 \text{ Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 。

2.4 抑菌机理研究

2.4.1 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌形态的影响

如图 3 所示, 可知未经处理的空白组和 SIC 剂量作用的 *S. typhimurium* 细胞表面光滑, 细胞完整并且呈规则的短杆状形态; 而经过 MIC 剂量的 YH68 CFS 处理 3 h 后, 许多细胞形态发生不规则的改变, 主要表现为细胞出现塌陷, 形态扭曲, 受损严重的细胞甚至出现破洞, 取单个细胞放大 50 000 倍观察可以更加明显地看到其被破坏所形成的破洞。结果说明 YH68 CFS 在抑菌浓度下可以改变 *S. typhimurium* 细胞的外部形态, 造成菌体细胞表面塌陷、破损, 推测破坏所形成的破洞可能是造成 *S. typhimurium* 生长被抑制的直接原因, 可能导致细胞内外物质非正常交换, 影响细胞正常的代谢与增殖。

2.4.2 电导率的测定

细胞膜是细菌的保护屏障, 如果菌体的保护屏障被打破, 其内部电解质(如 K^+ 、 Na^+ 等)渗漏到细胞外的培养液中, 使培养液的电导率上升。因此, 电导率的变化可以反映 YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 菌体细胞膜通透性的影响, 排除代谢物自身的电导率影响(表 5), 各组菌悬液的电导率如图 4 所示。



图3 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌的 SEM 图

Figure 3 SEM of *S. typhimurium* treated with or without YH68 CFS

注: A: 对照组(无菌水); B: YH68 抑菌活性物质 SIC 剂量处理组; C: YH68 抑菌活性物质 MIC 剂量处理组; 箭头指向的鼠伤寒沙门氏菌的细胞形态已被改变。

Note: A: Control cells (sterile water); B: Cells treated with YH68 CFS at SIC value; C: Cells treated with YH68 CFS at MIC value; And the cell morphology of *S. typhimurium* pointed by the arrows had been changed.

表5 短双歧杆菌 YH68 上清液的电导率

Table 5 The extracellular conductivity of YH68 CFS (ms/cm)

YH68 无细胞发酵液	电导率
YH68 CFS	Conductivity (ms/cm)
MIC	4.13±0.23
SIC	2.31±0.14

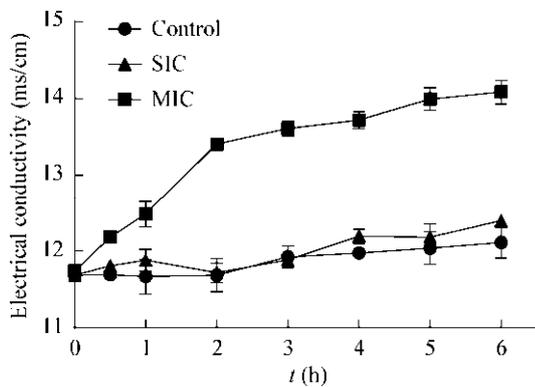


图4 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌上清液电导率的变化

Figure 4 Effects of YH68 CFS on the extracellular conductivity of *S. typhimurium*

SIC 剂量作用下和空白组的菌液电导率相比没有明显的差异, 都呈现微小上升的趋势, 空白组在 6 h 时的电导率值由 0 h 的 11.69 ms/cm 上升为 12.11 ms/cm。而经 YH68 抑菌活性物质 MIC 剂量处理后的细胞上清液的电导率明显增大, 且与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。MIC 剂量作用的前 2 h, 菌液的

电导率迅速增大, 时间点为 2 h 时电导率增长到 13.41 ms/cm, 之后的增长趋于平缓, 电导率趋于稳定。结果显示 YH68 抑菌活性物质可以使 *S. typhimurium* 的细胞膜渗透性发生一定程度的改变, 细胞内外渗透压的调节能力下降, 胞内离子如 K^+ 、 Na^+ 等离子外泄增加, 从而导致菌液的电导率增大。

2.4.3 紫外吸收物质的测定

260 nm 处主要为 DNA、RNA 的吸收峰, 280 nm 处主要是蛋白质的吸收峰, 通过测定紫外吸收物质的浓度考察菌体核酸、蛋白等大分子内容物质的释放情况^[16], 可以初步确定 YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 细胞膜完整性的影响。由图 5 可以看出核酸泄漏的情况, 0 h 时各组样品初始 OD_{260} 均为 0.093, 空白组和 SIC 组在 3 h 内核酸含量没有明显的上升, 而 MIC 处理组 OD_{260} 逐渐增加, 且在作用后的 2 h 达到最大值 0.51, 之后逐渐稳定。由图 6 可以看出蛋白质泄漏的情况, 空白组和 SIC 组蛋白质含量没有显著性差异, 呈现微小的上升趋势。而经 MIC 剂量作用后, 胞外 OD_{280} 具有相对明显的增长趋势。作用 3 h 后, OD_{280} 由 0 h 的 0.05 增加至 0.456, 与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$), 但其泄漏程度没有核酸明显。通过此实验初步确定 YH68 CFS 抑菌浓度下可以破坏 *S. typhimurium* 细胞膜的完整性, 使细菌内部的核酸和蛋白质穿过细胞膜进入到细菌外液中。

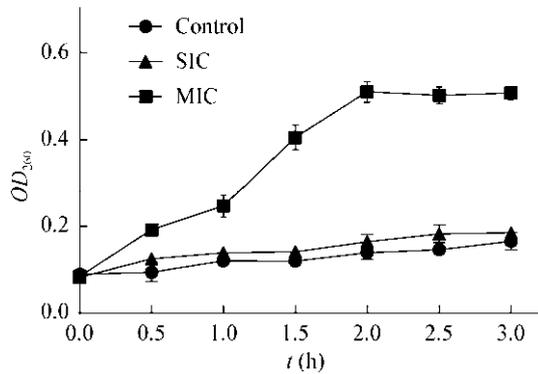


图 5 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌上清液于 260 nm 处吸光度值的变化

Figure 5 Effects of YH68 CFS on the UV absorption at 260 nm of *S. typhimurium*

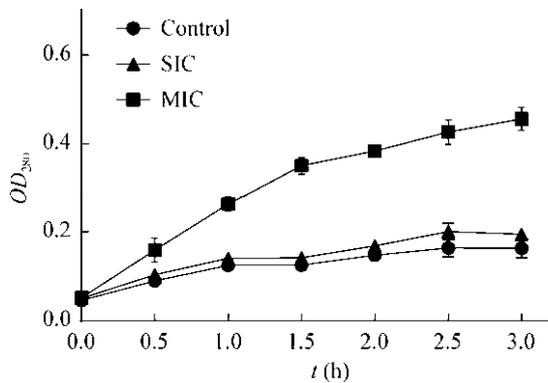


图 6 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌上清液于 280 nm 处吸光度值的变化

Figure 6 Effects of YH68 CFS on the UV absorption at 280 nm of *S. typhimurium*

2.4.4 激光共聚焦显微镜观察

共聚焦显微镜观察不同处理下的 *S. typhimurium* 细胞膜完整性变化如图 7 所示。通过 SYTO-9 和 PI 染色剂处理菌悬液，使细胞膜破损的死菌呈现红色，完整细胞膜的活菌呈现绿色，红色和绿色重叠显示为黄色^[17]。在对照组中，*S. typhimurium* 没经过处理，细菌全部呈现绿色，看不到红色死菌存在，此时 *S. typhimurium* 的细胞膜完整，排斥 PI。在 SIC 剂量下对细胞膜也没有破坏作用，细胞同样发绿色荧光。而在 MIC 剂量处理下膜受损的细胞数量明显增多，绝大多数细胞呈现中间态的黄色荧光，也有少量细胞呈现红色。说明 MIC 处理下 *S. typhimurium* 的细胞膜完整性被破坏，PI 进入细胞与 SYTO-9 竞

争取代了结合位点。而异丙醇阳性对照组具有更显著的杀菌作用，完全破坏了细胞膜，使图像呈现红色。该结果可进一步证明，YH68 CFS 在 MIC 剂量下增加 *S. typhimurium* 细胞膜通透性的同时，也破坏了细胞膜的完整性。

2.4.5 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌毒力基因的影响

RT-PCR 所得数据利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行定量。将空白组相关基因的表达量标准化为 1，*S. typhimurium* 的毒力基因表达情况如图 8 所示。与前面实验结果不同的是，与对照组相比无论是 MIC 浓度还是 SIC 浓度，YH68 CFS 均能显著降低 *S. typhimurium* 主要毒力基因 *hilA*、*fimA*、*invF*、*sipA*、*sipB* 的 mRNA 转录水平 ($P < 0.01$)。*fimA* 基因编码 I 型菌毛的结构蛋白^[22]，菌毛结构直接影响 *S. typhimurium* 的运动能力及其穿透肠粘液、粘附肠道上皮细胞的能力，影响了 *S. typhimurium* 的致病性；而入侵能力由 SPI-1 III 型分泌系统(T3SS)的调控蛋白和效应蛋白控制：*hilA* 基因编码 *S. typhimurium* 入侵宿主细胞关键的转录调控因子，在基因转录表达中起主导地位^[22]；*invF* 基因编码侵袭蛋白，决定 *S. typhimurium* 入侵宿主上皮细胞的能力，在 *S. typhimurium* 入侵宿主细胞过程中起重要作用^[23]；*sipA*、*sipB* 编码效应蛋白，*S. typhimurium* 通过 T3SS 将效应蛋白注射到宿主细胞中导致感染^[24]。*S. typhimurium* 在加入 YH68 CFS 孵育 3 h 后，与空白试验组进行比较。当 YH68 CFS 以 SIC 剂量处理时，*invF* 和 *sipB* 基因分别下调了 3 倍和 7 倍，而 *hilA*、*fimA*、*sipA* 均下调了 10 倍以上；当 YH68 CFS 以 MIC 剂量处理时，除了 *invF* 基因表达下调了 8 倍，基因 *hilA*、*fimA*、*sipA*、*sipB* 表达量下降幅度均超过了 10 倍，并且相比于 SIC 剂量作用组，所有基因的下调幅度明显更大，说明这种抑制作用呈剂量依赖性，高浓度时的抑制作用强于低浓度。更重要的是，YH68 CFS 在 SIC 浓度下也可以显著抑制 *S. typhimurium* 致病相关毒力基因的表达，这提示 YH68 CFS 在 SIC 剂量下即使无法抑制细菌生长，

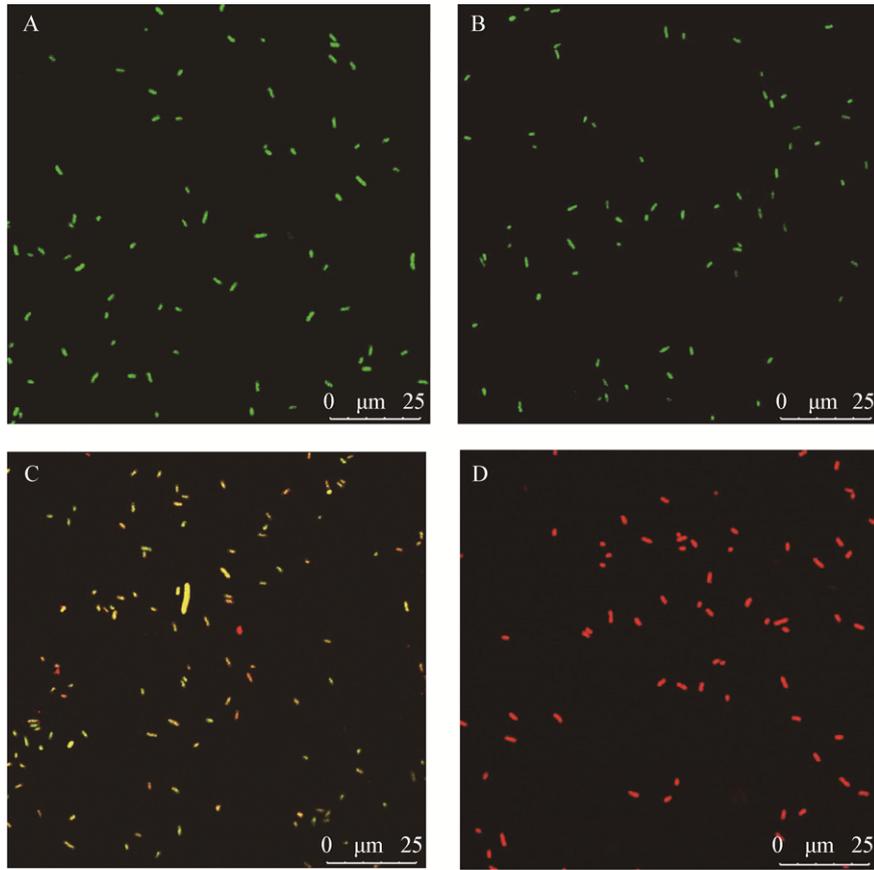


图 7 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌细胞的激光共聚焦显微镜图

Figure 7 CLSM of *S. typhimurium* cells with or without YH68 CFS

注: A: 对照组(无菌水); B: YH68 抑菌活性物质 SIC 剂量处理组; C: YH68 抑菌活性物质 MIC 剂量处理组; D: 阳性对照组(异丙醇).

Note: A: Control cells (sterile water); B: Cells treated with YH68 CFS at SIC value; C: Cells treated with YH68 CFS at MIC value; D: Positive control cells (treated with isopropanol).

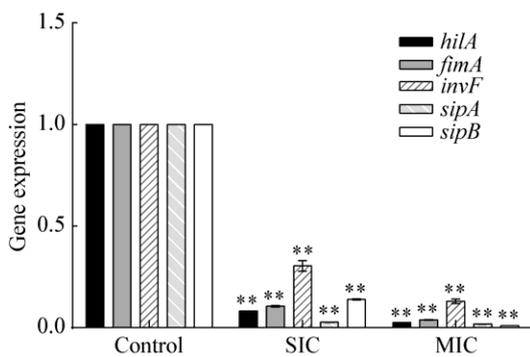


图 8 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌毒力基因表达的影响

Figure 8 Expression of *S. typhimurium*'s virulence genes in response to YH68 CFS

注: **: 与对照组相比较具有极显著差异($P < 0.01$).

Note: **: $P < 0.01$, compared with the control group.

也可能通过影响 *S. typhimurium* 相关毒力基因的表达来抑制其毒性。

2.5 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌粘附和侵袭肠上皮细胞的影响

HT29 细胞可以较好地模拟人体的肠道环境, 在细菌的感染和定殖方面被广泛作为实验模型。细菌粘附和入侵宿主细胞是其感染的重要步骤, 与 *S. typhimurium* 的致病性密切相关。*S. typhimurium* 的粘附和侵袭能力可以在一定程度上反映其毒力的强弱。在对主要致病毒力基因的 mRNA 水平考察基础上, 本实验从细胞水平进一步分析了 YH68 CFS 干预 *S. typhimurium* 粘附和侵袭肠上皮细胞的作用。YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 粘附、侵袭的抑制作用分别如图 9–12 所示。平板计数法与吉姆

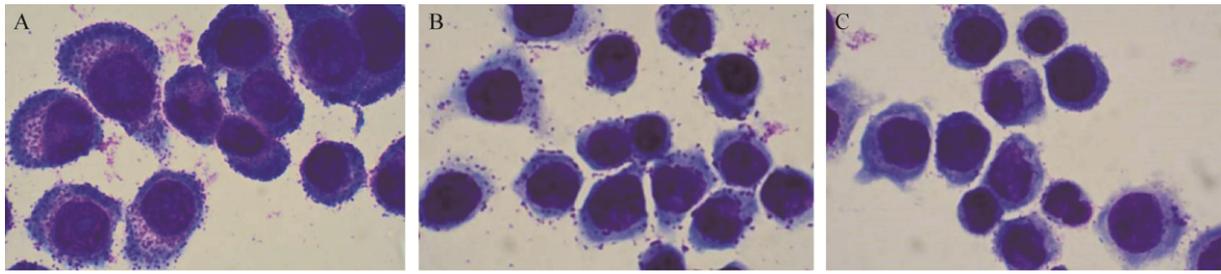


图9 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌粘附 HT29 细胞的情况(1 000×)

Figure 9 Adhesion of *S. typhimurium* to HT29 cells by YH68 CFS (1 000×)

注: A: 对照组(无菌水); B: YH68 抑菌活性物质 SIC 剂量处理组; C: YH68 抑菌活性物质 MIC 剂量处理组.

Note: A: Control cells (sterile water); B: Cells treated with YH68 CFS at SIC value; C: Cells treated with YH68 CFS at MIC value.

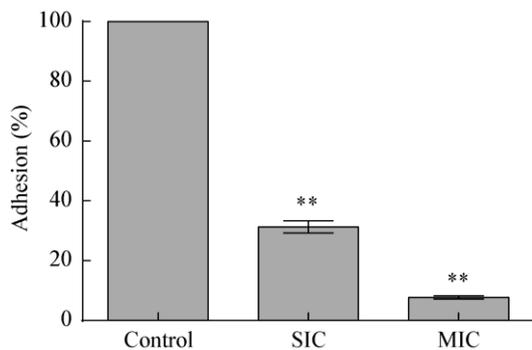


图10 YH68 抑菌活性物质对鼠伤寒沙门氏菌粘附 HT29 细胞比率的影响

Figure 10 Effect of YH68 CFS on the adhesion rate of HT29 cells by *S. typhimurium*

注: **: 与对照组相比较具有极显著差异($P < 0.01$).

Note: **: $P < 0.01$, compared with the control group.

萨染色结果一致,结果显示两种测试浓度的 YH68 CFS 均可以显著降低 *S. typhimurium* 对 HT29 细胞的粘附和入侵数目($P < 0.01$), 两种浓度下 YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 的粘附、侵袭抑制效果有所不同,呈剂量依赖性。相比于对照组(相对粘附率和侵袭率都设定为 100%), MIC 剂量表现出最佳的粘附、侵袭抑制能力, *S. typhimurium* 的粘附率和侵袭率分别降低到 $7.73\% \pm 0.53\%$ 和 $3.41\% \pm 0.16\%$; SIC 剂量的抑制效果次之, *S. typhimurium* 的粘附率和侵入率分别降低到 $31.32\% \pm 2.01\%$ 和 $6.32\% \pm 0.35\%$ 。本试验结果与 RT-PCR 一致,显示 SIC 浓度下的 YH68 CFS 也可以显著降低 *S. typhimurium* 的毒力。

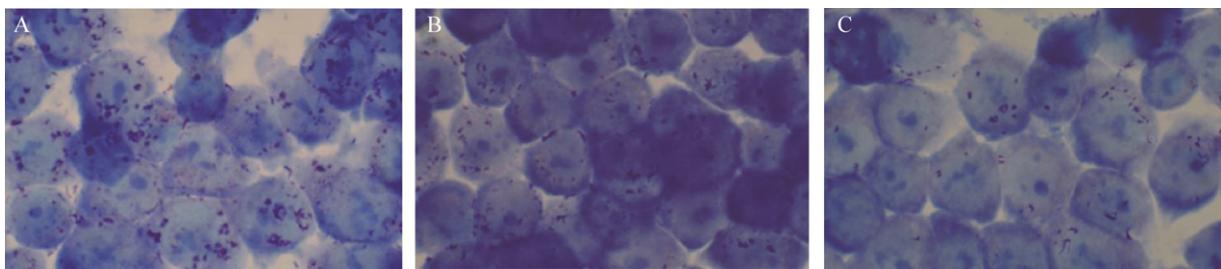


图11 YH68 抑菌活性物质作用下鼠伤寒沙门氏菌侵袭 HT29 细胞的情况(1 000×)

Figure 11 Invasion of *S. typhimurium* to HT29 cells by YH68 CFS (1 000×)

注: A: 对照组(无菌水); B: YH68 抑菌活性物质 SIC 剂量处理组; C: YH68 抑菌活性物质 MIC 剂量处理组.

Note: A: Control cells (sterile water); B: Cells treated with YH68 CFS at SIC value; C: Cells treated with YH68 CFS at MIC value.

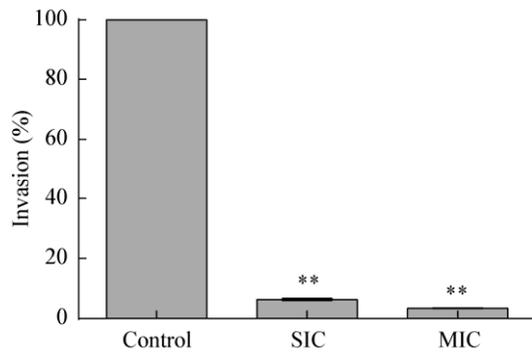


图 12 YH68 抑菌活性对鼠伤寒沙门氏菌侵袭 HT29 细胞比率的影响

Figure 12 Effect of YH68 CFS on the invasion rate of HT29 cells by *S. typhimurium*

注: **: 与对照组相比较具有极显著差异($P < 0.01$).

Note: **: $P < 0.01$, compared with the control group.

3 讨论与结论

临床研究表明, *S. typhimurium* 感染患者在恢复初期体内活菌数在 10^6 – 10^7 之间^[25]。本研究中, 经 MIC 水平的 YH68 CFS 处理 24 h 后的致病菌活菌数由初始的 $6 \text{ Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 下降为 $3.6 \text{ Log}_{10}\text{CFU/mL}$, 表明 *S. typhimurium* 的生长受到了显著抑制, 但这种作用方式是抑菌而不是杀菌, 因为活菌数下降值小于 $3 \text{ Log}_{10}\text{CFU/mL}$, 即致死率不足 99.9%^[26]。而 SIC 的 CFS 对 *S. typhimurium* 的生长没有抑制作用, 说明此时 CFS 所含抑菌物质由于被稀释含量较低, 无法对 *S. typhimurium* 造成影响, 这一点在 *S. typhimurium* 的生长曲线上也有所体现(图 1)。

维持离子稳态是细胞保持能量状态、代谢调节所必不可少的, 而细胞膜为小离子如 K^+ 、 Na^+ 提供了渗透性屏障, 所以即使是很小的膜结构变化也会对细胞代谢产生不利影响并导致细菌死亡。当细菌细胞暴露于抗菌剂时, 细胞膜可能会受到损伤, 并且倾向于小离子先溢出, 然后是核酸、蛋白质等大分子^[16]。本研究中, SIC 处理的 *S. typhimurium* 细胞膜仍保持完整性, 这也解释了在活性研究试验中致病菌活菌数并未减少的原因。而 MIC 处理前 2 h 内电解质就已经泄漏, 表明 *S. typhimurium* 的渗透性屏障已被快速破坏, 紧接着就是蛋白质和核酸大

分子的流出。周伟等表示膜破坏作用的进一步影响就是消耗质子动力势的成分 $\Delta\psi$ 和 ΔpH , 最终诱导细胞死亡^[27]。本研究中 MIC 水平下的这种膜损伤机制与许多已报道的益生菌细菌素类似^[28], 然而与 McAuliffe 等报道的 Lacticin 3147 细菌素对单增李斯特菌破坏形成的只允许小分子通过的选择性孔洞不同的是^[29], YH68 CFS 作用 *S. typhimurium* 细胞膜后形成的是无选择性孔洞, 这种孔洞既能够允许小分子电解质通过, 也可以使大分子核酸和蛋白质泄漏。

S. typhimurium 通过粘附、侵袭肠上皮细胞引起肠道感染, 这一过程需要多种毒力基因参与。粘附由编码菌毛的基因控制, 而侵袭由 SPI-1 控制。Hapfelmeier 发现缺乏 SPI-1 的突变体无法诱导小鼠患胃肠炎疾病^[30], 这证明了 SPI-1 在沙门氏菌致病过程中的关键作用。SPI-1 编码 III 型分泌系统(T3SS)和相关的效应蛋白^[25], 效应蛋白通过 T3SS 装置转移到真核宿主的上皮细胞中, 诱导肌动蛋白细胞骨架重排, 导致上皮细胞膜产生褶皱并吞噬细菌, 进而引发感染。当 *S. typhimurium* 受到环境影响时, 这些毒力基因的表达也会产生变化, 导致其粘附和侵袭能力的改变, 进而影响致病性。已有研究发现了益生菌对 *S. typhimurium* 毒力的影响作用, Searle 等发现两歧双歧杆菌无细胞发酵上清液在体内外均能显著降低 *S. typhimurium* 的粘附和侵袭能力^[31], 但他们未能揭示背后的实际机制。Bayoumi 等在 Searle 研究的基础上证明了两歧双歧杆菌无细胞发酵上清液对 *S. typhimurium* SPI 中心调控子 *hilA* 的下调作用^[32], 从基因层面上阐述了益生菌的抑菌机制, 但是仅通过 *hilA* 基因说明粘附和侵袭力的变化并不全面。短双歧杆菌与两歧双歧杆菌同属于双歧杆菌属, 基于前人的研究结论基础, 本研究增加了对粘附相关的鞭毛结构基因和 SPI-1 入侵相关基因的考察, 并开展益生菌在亚抑制浓度下的相关研究, 所筛选的 YH68 CFS 在 MIC 浓度下与预想一致, 显著下调了 *S. typhimurium* 鞭毛结构基因 *fimA*、转录调控基因 *hilA*、侵袭基因 *invF* 和效应蛋白编码基

因的表达。此外, SIC 处理下尽管未能影响 *S. typhimurium* 的生长,也使致病基因的表达被显著下调,也相应地削弱了对宿主细胞的粘附、侵袭能力。这证明了亚抑制浓度下 YH68 CFS 对 *S. typhimurium* 感染的缓解作用并不是作为生长抑制剂而是毒力基因抑制剂来实现的。试验中还发现,所有组别中 *S. typhimurium* 的侵袭率都比粘附率要小得多,这一点 Kusters 等早在 1993 年进行过解释,他表示并不是所有粘附的 *S. typhimurium* 都具有入侵能力,这是由于入侵所涉及细胞因子的限量供应所致^[33]。

在临床治疗中,抗菌药物进入肠道后由于被稀释可能在体内发生亚抑制浓度,但在不清楚抗菌药物在亚抑制浓度下的作用机制时,临床治疗往往会与预期效果有所出入,甚至会起反作用。Salaheen 等发现亚抑制浓度的黑莓和蓝莓果渣提取物可以显著抑制 *S. typhimurium* SPI-1 主要毒力基因的转录,并降低其粘附、入侵肠上皮细胞的能力和在鸡盲肠中的定殖数目^[23]。而 Durant 等却发现 SIC 水平的乙酸盐对沙门氏菌粘附喉癌细胞 HEp-2 的能力无影响,但使侵袭数目增加了 2 倍,导致致病菌毒性增加^[12]。这从理论上证明,不同亚抑制浓度的药物与 *S. typhimurium* 组合可能会对其毒性产生诱导、抑制或无影响的不确定效果。据我们所知,关于益生菌在亚抑制浓度下对 *S. typhimurium* 的影响尚未见报道。本研究使用亚抑制 YH68 CFS 治疗 *S. typhimurium* 感染,其突出的治疗特点是在不影响病原体生长的情况下下调了 *S. typhimurium* 的关键致病基因,从而抑制了 *S. typhimurium* 感染肠上皮细胞能力,这种情况下 *S. typhimurium* 的选择性抗性机制未被激活^[34],可以避免耐药性的产生。此外,这种非杀灭性抗病原体效应可降低 *S. typhimurium* 释放内毒素的风险。总而言之,对于目前由抗生素耐药性导致的 *S. typhimurium* 治疗瓶颈而言, YH68 具有成为抗生素替代品的应用潜力。

益生菌在对抗致病菌感染的同时能起到提高机体免疫力、丰富肠道菌群多样性等功效,已被认可作为一种治疗肠病原菌感染的新方法^[35],有益作

用已被许多学者证实。*Nature* 近期上线的一项研究通过人群分析和小鼠实验发现,肠道内的芽孢杆菌可通过生成脂肽芬芥素抑制金黄色葡萄球菌的群体感应,从而清除这种多重抗生素耐药细菌^[36]。益生菌对病原菌的抑制作用依赖于其在生长过程中产生的一些初级和次级代谢产物,如有机酸、细菌素、过氧化氢等^[37]。本研究中短双歧杆菌 YH68 无细胞发酵上清液的抑菌活性是多方面的,主要的抑菌物质为有机酸,同时存在抗菌类蛋白二者共同起到对鼠伤寒沙门氏菌的拮抗作用,并且具有一定的热稳定性,在生产中具有良好的应用前景。下一步的研究方向应该对短双歧杆菌 YH68 的代谢产物进行分离、纯化,明确起到抑菌作用物质的具体成分和比例,在此基础上可以对纯化产物进行两两组合研究协同或拮抗机制存在的可能性。

本研究从致病菌生长活性、菌体细胞破坏、毒力表达,以及对肠上皮细胞感染能力的变化来阐明短双歧杆菌对鼠伤寒沙门氏菌的影响,为鼠伤寒沙门氏菌相关感染的治疗提供抗生素之外的新思路。我们认为短双歧杆菌 YH68 即使在亚抑制浓度下也是治疗鼠伤寒沙门氏菌感染的潜在益生菌株。

REFERENCES

- [1] Wang C, Yan L, Zeng QZ. Detection technologies and methods of salmonella[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(5): 82-85,75 (in Chinese)
王磊, 闫磊, 曾庆祝. 沙门氏菌的检测技术与方法[J]. *现代食品科技*, 2007, 23(5): 82-85,75
- [2] Silva AF, Dos Santos AR, Trevisan Coelho DA, et al. Cinnamaldehyde induces changes in the protein profile of *Salmonella typhimurium* biofilm[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(1): 33-43
- [3] Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review[J]. *Immunology & Cell Biology*, 2007, 85(2): 112-118
- [4] Zhang ZF, Meng XF, Yang BW, et al. Resistance of chickenborne *Salmonella* to quinolone and fluoroquinolones and related genes[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(3): 158-165 (in Chinese)
张增峰, 孟晓风, 杨保伟, 等. 鸡肉源沙门氏菌对(氟)喹诺酮类抗生素的耐药性及相关基因[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(3): 158-165
- [5] Zhang QH, Zhang DJ, Li JN, et al. Advances in *Salmonella* resistance[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018,

- 46(17): 27-29 (in Chinese)
张庆贺, 张丹俊, 李瑾年, 等. 沙门氏菌耐药性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(17): 27-29
- [6] Kemgang TS, Kapila S, Shanmugam VP, et al. Fermented milk with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* S1K3 (MTCC5957) protects mice from *Salmonella* by enhancing immune and nonimmune protection mechanisms at intestinal mucosal level[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 30: 62-73
- [7] Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, et al. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(8): 5183-5188
- [8] Coconnier MH, Liévin V, Bernet-Camard MF, et al. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41(5): 1046-1052
- [9] Dahan S, Dalmasso G, Imbert V, et al. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(2): 766-773
- [10] Reid G, Jass J, Sebulsky MT, et al. Potential uses of probiotics in clinical practice[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16(4): 658-672
- [11] Li JF, Lv C, Sun WY, et al. Cytosporone B, an inhibitor of the type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(5): 2191-2198
- [12] Durant JA, Lowry VK, Nisbet DJ, et al. Short-chain fatty acids affect cell-association and invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 1999, 34(6): 1083-1099
- [13] Oo TZ, Cole N, Garthwaite L, et al. Evaluation of synergistic activity of bovine lactoferricin with antibiotics in corneal infection[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(6): 1243-1251
- [14] Upadhyaya I, Upadhyay A, Kollanoor-Johny A, et al. Effect of plant derived antimicrobials on *Salmonella* enteritidis adhesion to and invasion of primary chicken oviduct epithelial cells *in vitro* and virulence gene expression[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(5): 10608-10625
- [15] Shen SX, Zhang TH, Yuan Y, et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane[J]. Food Control, 2015, 47(47): 196-202
- [16] Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3359-3368
- [17] Moussa M, Perrier-Cornet JM, Gervais P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(20): 6508-6518
- [18] Das JK, Mishra D, Ray P, et al. *In vitro* evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar enteritidis[J]. Gut Pathogens, 2013, 5: 11
- [19] Kohli N, Crisp Z, Riordan R, et al. The microbiota metabolite indole inhibits *Salmonella* virulence: Involvement of the PhoPQ two-component system[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0190613
- [20] Yang AQ, Ai QJ, Zhang DQ, et al. Antibacterial activity of several Chinese herbal medicine extracts against salmonella[J]. Food Science and Technology, 2011, 36(3): 176-179 (in Chinese)
杨艾青, 艾启俊, 张德权, 等. 几种中草药提取液对沙门氏菌抑菌效果研究[J]. 食品科技, 2011, 36(3): 176-179
- [21] Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, et al. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 49(2): 345-351
- [22] Salem WM, El-Hamed DMWS, Sayed WF, et al. Alterations in virulence and antibiotic resistant genes of multidrug-resistant *Salmonella* serovars isolated from poultry: The bactericidal efficacy of *Allium sativum*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 108: 91-100
- [23] Salaheen S, Jaiswal E, Joo J, et al. Bioactive extracts from berry byproducts on the pathogenicity of *Salmonella* Typhimurium[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 128-135
- [24] Li LT, Ma C, Zhao Q, et al. Inhibition effect of kaempferol on the invasion of *Salmonella typhimurium* to chicken intestinal epithelium cells at subinhibitory concentrations[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(7): 534-539 (in Chinese)
李连涛, 马畅, 赵茜, 等. 亚抑菌浓度山奈酚对鼠伤寒沙门氏菌侵袭鸡肠道上皮细胞的抑制作用研究[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(7): 534-539
- [25] Tanner SA, Chassard C, Rigozzi E, et al. *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 impacts on growth and virulence gene expression of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium[J]. BMC Microbiology, 2016, 16: 46
- [26] LaPlante KL. *In vitro* activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 57(4): 413-418
- [27] Zhou W, Liu GR, Li PL, et al. Mode of action of plantaricin L-1, an antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(2): 260-264 (in Chinese)
周伟, 刘国荣, 李平兰, 等. 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[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 260-264
- [28] Liu GR, Gao YK, Wang X, et al. Antibacterial activity and mechanism of Bifidocin A against *Staphylococcus aureus*[J]. Food Science, 2017, 38(17): 1-7 (in Chinese)
刘国荣, 郜亚昆, 王欣, 等. 双歧杆菌细菌素 Bifidocin A 对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及其机制[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 1-7
- [29] McAuliffe O, Ryan MP, Ross RP, et al. Lactacin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential[J]. Applied and Environmental

- Microbiology, 1998, 64(2): 439-445
- [30] Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, et al. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(2): 795-809
- [31] Searle LEJ, Best A, Nunez A, et al. A mixture containing galactooligosaccharide, produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in mice[J]. Journal of Medical Microbiology, 2009, 58: 37-48
- [32] Bayoumi MA, Griffiths MW. Probiotics down-regulate genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity islands 1 and 2[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(3): 452-460
- [33] Kusters JG, Mulders-Kremers GA, Van Doornik CE, et al. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*[J]. Infection and Immunity, 1993, 61(12): 5013-5020
- [34] Park H, Yeo S, Ji Y, et al. Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Control, 2014, 45: 62-69
- [35] Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, et al. Getting better with bifidobacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(6): 1303-1315
- [36] Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference[J]. Nature, 2018, 562(7728): 532-537
- [37] Vuotto C, Longo F, Donelli G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data[J]. International Journal of Oral Science, 2014, 6(4): 189-194



稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一，主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展，其内容要求新颖丰富，观点明确，论述恰当，应包含作者自己的工作内容和见解。因此，作者在动笔之前必须明确选题，一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及各个方面，在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势，即掌握其内在的精髓，深入到专题研究的本质，论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望，提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外，作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法，辅以注释，客观而有少量评述，使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是：(1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介，并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现，同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文，引用文献数量不限。