

原儿茶酸对副溶血弧菌的抑菌和减毒作用

芦平, 刘欢*, 肖苗, 李莹玉, 赵燕妮*

(陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 该研究旨在探讨原儿茶酸对副溶血弧菌的抑菌活性和减毒作用, 揭示原儿茶酸抑菌的作用机制。通过测定最小抑菌浓度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)、生长曲线、核酸与蛋白质泄漏量、丙二醛 (MDA) 含量, 利用扫描电镜观察副溶血弧菌形态的变化, 来评估原儿茶酸对副溶血弧菌的抑菌活性及其对细胞膜完整性和通透性的影响。同时, 通过检测亚抑菌浓度 (Sub-inhibitory Concentrations, SICs) 下原儿茶酸对副溶血弧菌毒力因子合成的影响, 研究原儿茶酸对副溶血弧菌的毒力衰减作用。实验结果表明, 原儿茶酸的 MIC 为 2 mg/mL, 经 MIC 浓度原儿茶酸处理后, 副溶血弧菌发生严重内陷和破裂, 上清液中核酸、蛋白质、MDA 含量分别是对照组的 2.65 倍、1.94 倍和 10.05 倍。此外, 原儿茶酸在浓度为 1/4 MIC 时对胞外多糖、胞外蛋白酶、生物被膜的抑制率分别为 40.57%、19.79% 和 26.04%, 在浓度为 1/2 MIC 时的抑制率分别为 52.85%、28.38% 和 34.69%。原儿茶酸主要作用于细胞膜, 通过影响细胞膜的完整性和通透性抑制副溶血弧菌的生长, 在亚抑菌浓度下便可有效减弱副溶血弧菌毒力。

关键词: 原儿茶酸; 副溶血弧菌; 抑菌机制; 减毒作用

文章编号: 1673-9078(2022)05-278-285

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.5.0855

Antibacterial and Virulence-attenuating Effects of Protocatechuic Acid against *Vibrio parahaemolyticus*

LU Ping, LIU Huan*, XIAO Miao, LI Yingyu, ZHAO Yanni*

(School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: In order to reveal the mechanisms underlying the antibacterial function of protocatechuic acid (PCA), the antimicrobial activity and virulence-attenuating effect of PCA was investigated. To evaluate the antibacterial activity of PCA against *Vibrio parahaemolyticus* and its effect on the integrity and permeability of cell membranes, the minimal inhibitory concentration (MIC), growth curve, nucleotide and protein leakage, and malondialdehyde (MDA) content were measured, and the morphological changes of *V. parahaemolyticus* were examined by scanning electron microscopy. Meanwhile, the virulence-attenuating effect of PCA against *V. parahaemolyticus* was further investigated through detecting the effects of PCA at sub-inhibitory concentrations (SICs) on the synthesis of virulence factors of *V. parahaemolyticus*. The experimental results showed that the MIC of PCA against *V. parahaemolyticus* was 2 mg/mL. After the treatment with PCA at MIC, *V. parahaemolyticus* was severely invaginated and ruptured. The contents of nucleic acid, protein, and MDA in the supernatant were 2.65 times, 1.94 times, and 10.05 times those of the control group, respectively. In addition, the inhibition rates of PCA against extracellular polysaccharides, extracellular proteases, and biofilms were 40.57%, 19.79%, and 26.04%, respectively, at a PCA concentration of 1/4 MIC, and 52.85%, 28.38% and 34.69%, respectively, at a PCA concentration of 1/2 MIC. PCA mainly acted on cell membrane, inhibited the growth of *V. parahaemolyticus* through affecting the integrity and permeability of the cell membrane, and at sub-inhibitory concentrations reduced effectively the virulence of *V. parahaemolyticus*.

引文格式:

芦平,刘欢,肖苗,等.原儿茶酸对副溶血弧菌的抑菌和减毒作用[J].现代食品科技,2022,38(5):278-285

LU ping, LIU huan, XIAO miao, et al. antibacterial and Virulence-attenuating Effects of Protocatechuic Acid against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(5): 278-285

收稿日期: 2021-08-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32070129; 31800328); 陕西省重点研发计划一般项目 (2020NY-121; 2021NY-164); 西安市未央区科技计划项目 (201937; 201940); 陕西科技大学博士启动项目 (BJ12-24)

作者简介: 芦平 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 530971152@qq.com

通讯作者: 刘欢 (1983-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 病原微生物致病机制及疫苗开发, E-mail: liuhuan@sust.edu.cn; 共同通讯作者: 赵燕妮 (1987-),

女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品代谢组学与分析检测, E-mail: zhaoyanni@sust.edu.cn

Key words: protocatechuic acid; *Vibrio parahaemolyticus*; antimicrobial mechanism; virulence attenuation

副溶血弧菌是具有两套鞭毛系统的弧状革兰氏阴性病原菌,在自然环境中广泛分布于河流与海口,为鱼、虾的主要致病菌^[1]。人如果误食受副溶血弧菌污染的产品,会出现腹痛、腹泻等症状,严重时可导致急性胃肠炎和败血症,引起感染者休克甚至死亡。近年来,由副溶血弧菌引起的相关病例报导激增,表明副溶血弧菌已成为一种重要的食源性致病菌。研究发现,副溶血弧菌具有胞外多糖、胞外蛋白酶、生物被膜、溶血毒素等多种毒力因子,这些毒力因子对副溶血弧菌在宿主体内的定殖和病害的发生发挥着重要作用^[2-4]。

食物腐败现象普遍存在,食源性病原菌引起的食物中毒严重威胁人类健康,抑制腐败微生物的生长以减少食品安全问题的发生显得尤为重要。防腐剂广泛应用于食品保鲜,按来源可分为天然食品防腐剂和化学合成防腐剂,化学合成防腐剂因易累积、难代谢而具有潜在危害性,因此,来源安全的天然防腐剂更受消费者的关注和认可。植物多酚富含于许多草本植物中,展现出良好的抑菌活性,且具有抗肿瘤、抗衰老、降血压血脂等多种保健功能,在食品、生物与医药行业具有广阔的应用前景^[5,6]。原儿茶酸是植物体内重要的酚酸,广泛存在于茶叶、蔬菜和水果中,也是乌蕨、大血藤等中草药的有效成分^[7,8]。据报道,原儿茶酸具有抑菌^[9]、抗肿瘤^[10]、抗氧化^[11,12]的效果。

本实验选取海产品中常见的副溶血弧菌作为供试菌,探究原儿茶酸对副溶血弧菌的抑制作用,通过测定原儿茶酸对副溶血弧菌的最小抑菌浓度、胞内核酸和蛋白泄漏量、丙二醛(MDA)含量,同时通过扫描电镜观察细胞表面形态变化来评估原儿茶酸对副溶血弧菌细胞膜的损伤作用。此外,选取 1/4 MIC 和 1/2 MIC 作为亚抑菌浓度,探究低浓度原儿茶酸对副溶血弧菌毒力的衰减作用,为原儿茶酸在食品防腐中的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和主要仪器

原儿茶酸(≥97%,色谱纯),上海源叶生物科技有限公司; NaCl(≥99%,分析纯),天津天力化学试剂有限公司; 蛋白胨、酵母粉,英国 Oxoid 集团; 天蓝色皮粉,美国 Sigma 公司; 琼脂粉,上海生工股份有限公司; 丙二醛(MDA)测定试剂盒,南京建成生物研究所; 其他所用试剂均为市售分析纯。

恒温摇床,江苏同君仪器科技有限公司; 电子分析天平,瑞士 Mettler-Toledo 集团; 高速离心机、多功能酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 集团; 超微量分光光度计,美国 Quawell 公司。

1.2 菌株和培养基

副溶血弧菌(RIMD 2210633)由陕西科技大学食品与生物工程学院微生物实验室提供; 细菌基础培养基(Luria-Bertani broth, LB)(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化

将冻存在-80℃的菌种划线至 LB 平板上培养,然后挑取单菌落接种到含有 5 mL LB 液体培养基的培养瓶中,于 37℃恒温摇床中以转速 200 r/min 过夜培养,调整细菌培养液 OD₆₀₀ 为 1.0(约 5.0×10⁶ CFU/mL),以供后续使用。

1.3.2 最小抑菌浓度(MIC)测定、亚抑制浓度(SICs)选择和抑菌圈实验

采用二倍稀释法^[13]测定原儿茶酸对副溶血弧菌的最小抑菌浓度, MIC 定义为完全抑制副溶血弧菌生长的最低原儿茶酸浓度,并选择 1/8 MIC、1/4 MIC 和 1/2 MIC 三个浓度作为原儿茶酸的 SICs 用于后续实验。根据周芳等^[14]的方法,采用牛津杯法测定不同浓度原儿茶酸对副溶血性弧菌的抑菌活性。在培养皿中放置 4 个已灭菌的牛津杯, LB 固体培养基灭菌后倒平板,培养基凝固后吸取 100 μL 菌悬液液液涂布在平板上,风干后取出牛津杯,然后吸取 200 μL 不同浓度的原儿茶酸溶液分别加入到孔中。将培养皿于 37℃恒温培养箱正置培养 24 h,以不加原儿茶酸为对照,测量抑菌圈直径大小。

1.3.3 生长曲线测定

吸取 50 μL 活化的细菌培养液,加入至 5 mL 含有不同浓度(0、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8 mg/mL)原儿茶酸的 LB 液体培养基中,轻微振荡,置于恒温摇床中 37℃以转速 200 r/min 进行培养。每隔 1 h 吸取 200 μL 培养液,以 LB 液体培养基作为空白对照,测定 OD₆₀₀ 值,并绘制生长曲线。

1.3.4 核酸和蛋白质含量测定

根据 Zhou 等^[15]的方法进行修改,测定泄漏的核酸、蛋白质含量。吸取 50 μL 菌悬液接种至 5 mL LB 液体培养基中,37℃培养 6 h 后加入原儿茶酸进行处

理, 孵育 3 h 后在 4 °C 以 10000 r/min 转速离心 1 min, 使用微量分光光度计分别测定上清液核酸和蛋白质的含量。

1.3.5 丙二醛 (MDA) 含量测定

吸取 50 μ L 菌悬液接种至 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 培养 6 h 后加入原儿茶酸, 处理 3 h 后, 按照细胞丙二醛测定试剂盒说明书要求, 对样品中的 MDA 含量进行测定。

1.3.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考 Giuliano^[16]的实验方法加以修改, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。吸取 50 μ L 菌悬液接种至 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 培养 6 h 后加入原儿茶酸, 处理 3 h 后离心吸取 800 μ L 上清液甲醇氯仿以提取蛋白。离心弃去上清液, 加入 20 μ L 上样缓冲液并沸水浴 5 min, 根据电泳样品制备步骤进行蛋白电泳。

1.3.7 场发射扫描电镜观察

场发射扫描电镜对副溶血弧菌形态的观察参照 Shi 等^[17]的方法, 具体步骤如下: 吸取 50 μ L 菌悬液接种至 5 mL LB 液体培养基中, 于 37 °C 培养 6 h 后加入不同浓度原儿茶酸处理 4 h。离心收集菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤后重悬在 2.5% (V/V) 的戊二醛水溶液中固定, 于 4 °C 静置过夜。随后, 用不同浓度的乙醇 (30%、50%、70%、90%、100%, V/V) 进行梯度脱水处理, 每次脱水时间为 10 min, 将样品于 70 °C 烘干 3~4 h 至干燥, 并装载在载物台, 喷金后使用场发射扫描电镜进行观察。

1.3.8 胞外多糖含量测定

于培养瓶中加入 5 mL LB 液体培养基, 接种 50 μ L 菌悬液, 再加入不同浓度的原儿茶酸, 混匀后于 37 °C 恒温摇床培养 9 h。吸取 1.5 mL 菌液, 以 12000 r/min 转速离心 1 min, 取 1 mL 上清液加入 3 倍体积的 95% 乙醇并于 4 °C 静置过夜, 以 4000 r/min 转速离心 15 min, 测定沉淀物中胞外多糖的含量。

1.3.9 胞外蛋白酶含量测定

于培养瓶中加入 5 mL LB 液体培养基, 接种 50 μ L 菌悬液, 再加入不同浓度的原儿茶酸, 混匀, 置于恒温摇床上 37 °C 培养 9 h, 测定在 600 nm 处的吸光度, 记为 OD₁。吸取 1.5 mL 菌液, 以 10000 r/min 转速离心 1 min, 吸取 1 mL 上清加入新的培养瓶中, 然后再加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 和 0.01 g 天蓝色皮粉 (Hide Powder Azure, HPA, Sigma-Aldrich), 于 37 °C 恒温摇床培养 2 h, 以转速 12000 r/min 离心 1 min, 取上清液于 600 nm 处测量吸光度, 记为 OD₂, 分别计算 OD₂ 与 OD₁ 的比值并进行作图。

1.3.10 生物被膜含量测定

于培养瓶中加入 5 mL LB 液体培养基, 接种 50 μ L 菌悬液, 再加入不同浓度的原儿茶酸, 混匀后于 37 °C 培养 48 h 以形成生物被膜。小心倒去培养液, 加入 1 mL 质量分数为 2% (m/V) 的结晶紫染色 1 min, 洗去多余染液后晾干, 再加入 1 mL 质量分数为 33% (V/V) 的冰乙酸溶解生物被膜, 并测定其在 570 nm 处的吸光度。

1.4 数据处理和分析

所有实验均至少重复三次, 并使用 GraphPad Prism 7.00 软件进行数据处理和分析。当 $p < 0.05$ 时表示显著 (图中以 * 表示), $p < 0.01$ 时表示极显著 (图中以 ** 表示), 统计学差异采用单因素方差分析 (ANOVA) 确定。

2 结果与讨论

2.1 原儿茶酸抑菌活性分析

2.1.1 原儿茶酸的 MIC 及敏感性分析

当原儿茶酸的浓度低于 2 mg/mL 时, 副溶血弧菌经过 24 h 的培养均进行了不同程度的增殖, 培养液出现浑浊; 当原儿茶酸的浓度达到或高于 2 mg/mL 时, 副溶血弧菌经过 24 h 的培养没有肉眼可见的细菌生长, 培养液澄清透亮, 与未接种细菌的空白组基本相同。可见, 原儿茶酸对副溶血弧菌的 MIC 为 2 mg/mL。从图 1 可知, 当原儿茶酸浓度为 1/4 MIC 时, 与对照组相比无明显变化; 当原儿茶酸浓度为 1/2 MIC 时, 加样孔周围细菌生长减少; 当原儿茶酸浓度达到 MIC 时, 抑菌圈直径为 18.37 mm, 此时加样孔周围未见细菌生长。原儿茶酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、腐败希瓦氏菌的 MIC 分别为 3.0、0.9、1.25 mg/mL^[18,19], 对阪崎肠杆菌 ATCC29544、ATCC29004、ATCC12868、12-2 的 MIC 分别为 5、5、5 和 2.5 mg/mL^[9]。可见, 原儿茶酸对革兰氏阴性菌和阳性菌都具有抑菌作用, 但对于不同菌种或同一菌种不同菌株的抑菌活性不尽相同。

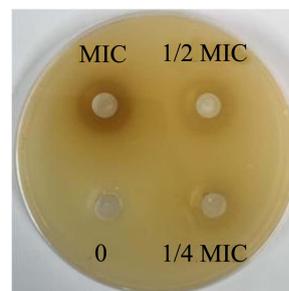


图 1 副溶血弧菌对原儿茶酸敏感性分析

Fig.1 Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to PCA

2.1.2 原儿茶酸对副溶血弧菌生长的影响

从图2可以看出,对照组中副溶血弧菌迅速进入对数生长期,培养至8h后即进入稳定期,生长趋缓;培养12h后OD₆₀₀值为1.06。原儿茶酸的浓度大于或等于2mg/mL时,副溶血弧菌在整个检测周期中未见增殖。当原儿茶酸的浓度达到1mg/mL时,副溶血弧菌进入对数生长期的时间明显滞后,在整个生长周期中的菌体浓度均低于对照组,9h后进入稳定期,培养12h后OD₆₀₀为0.86;当原儿茶酸浓度为0.5、0.25、0.125mg/mL时,培养物OD₆₀₀分别为0.99、0.96、0.99,与对照组相比不存在显著差异。进一步证明原儿茶酸对副溶血弧菌的MIC为2mg/mL。

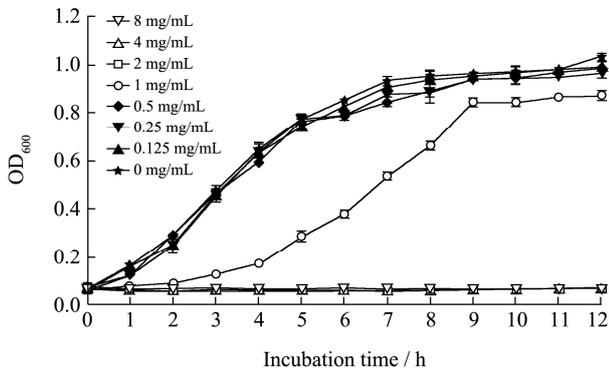


图2 不同浓度原儿茶酸处理下副溶血弧菌的生长情况

Fig.2 Growth curves of *Vibrio parahaemolyticus* with treatment of PCA at different concentrations

2.2 原儿茶酸对副溶血弧菌细胞膜的影响

2.2.1 原儿茶酸对核酸、蛋白质泄漏的影响

细胞膜参与细菌的能量转换、信号传递和物质运输^[20],并能有效防止核酸、蛋白质等生物大分子从胞内泄漏至胞外。从图3a可知,没有添加原儿茶酸的副溶血弧菌在培养3h后的胞外核酸量与0h基本相同,而经不同浓度原儿茶酸处理的副溶血弧菌胞外核酸量则显著上升,且随着浓度的增加而增高,在经过MIC浓度的原儿茶酸处理3h后,细菌培养液上清中的核酸含量达到2187.28ng/mL,为对照组的2.65倍。同样地,原儿茶酸处理后副溶血弧菌胞外总蛋白的含量随其添加量的增加而升高,当用MIC浓度原儿茶酸处理3h后,胞外总蛋白含量达到34.28mg/mL,为对照组的1.94倍(图3b)。此外,利用SDS-PAGE对不同浓度原儿茶酸处理后的细菌胞外总蛋白进行了分析,结果如图3c所示,处理组和对照组均出现明显的条带,与对照组相比,当原儿茶酸浓度增大时,分子量在10、25、33、40ku附近的蛋白质条带变化不明显,说明原儿茶酸对小分子量蛋白质泄漏的影响不大,但当原儿茶酸的浓度增加到1/2MIC和MIC时,蛋白条

带颜色加深,尤其是分子量在95~180ku范围附近的条带,表明大分子量的蛋白质发生了明显的泄漏。出现这一现象的原因可能是具有选择透过性的细胞膜在原儿茶酸作用后发生了破损,失去了原有的选择透过性,使得除了菌体正常分泌的蛋白外,胞内的大量蛋白外泄。贾振宇等^[9]报道原儿茶酸可降低阪崎肠杆菌细胞膜的完整性和通透性,从而抑制其生长。朱金帅等^[19]发现MIC浓度下的没食子酸可以显著提高腐败希瓦氏菌胞外核酸和总蛋白的含量。

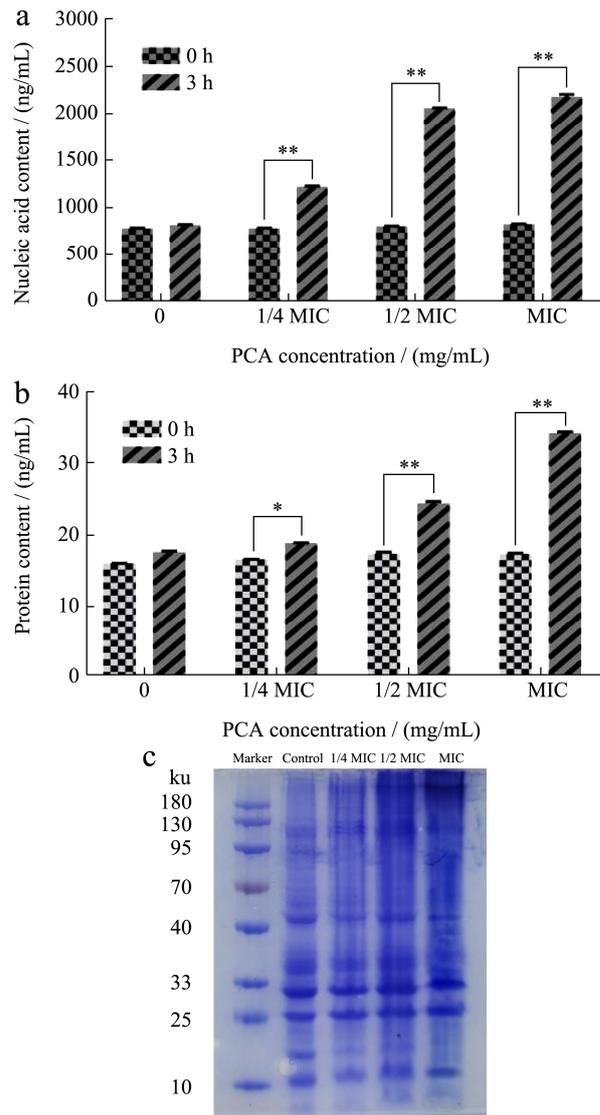


图3 原儿茶酸对核酸、蛋白质泄漏的影响

Fig.3 Effects of PCA on nucleic acid and protein leakage

注: a: 原儿茶酸对副溶血弧菌核酸外泄的影响; b: 原儿茶酸对副溶血弧菌蛋白质外泄的影响; c: 不同浓度原儿茶酸处理后副溶血弧菌胞外总蛋白 SDS-PAGE 分析。

2.2.2 原儿茶酸对丙二醛含量的影响

丙二醛是细胞膜脂质代谢的特征终产物之一,可作为脂质过氧化评价的重要参考指标。如图4所示,没有添加原儿茶酸的副溶血弧菌在培养3h后的丙二

醛含量较 0 h 略有上升, 在经 1/4 MIC 原儿茶酸处理后, 丙二醛的含量为对照组的 1.59 倍; 而经不同浓度原儿茶酸处理的副溶血弧菌胞外核酸量则显著上升, 且随着浓度的增加而增高, 当浓度达到 1/2 MIC 时, 副溶血弧菌培养液上清中的丙二醛含量显著上升, 为对照组的 3.80 倍; 在原儿茶酸浓度达到 MIC 时, 丙二醛含量达到 1.40 nmol/mL, 为对照组丙二醛含量的 10.05 倍。原儿茶酸能够攻击细胞膜上游离的自由电子, 破坏氧自由基反应的动态平衡, 诱导活性氧(ROS)产生, 形成氧自由基连锁反应, 导致脂质过氧化, 产生过量丙二醛^[21]。可见, 原儿茶酸可引起副溶血弧菌细胞膜的氧化损伤, 且损伤程度随着原儿茶酸浓度的增加而增强。

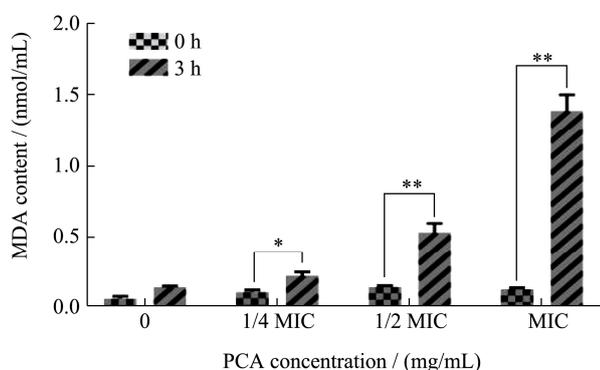


图4 原儿茶酸对丙二醛含量的影响

Fig.4 Effects of PCA on malondialdehyde content

2.2.3 原儿茶酸对副溶血弧菌形态的影响

如图 5 所示, 未经原儿茶酸处理的副溶血弧菌形态饱满, 表面光滑。经 1/4 MIC 浓度的原儿茶酸处理后副溶血弧菌菌体未见明显变化, 依旧能维持正常形态。经 1/2 MIC 浓度的原儿茶酸浓度处理后, 部分菌体开始发生皱缩, 表面变得粗糙。在 MIC 浓度原儿茶酸处理后, 副溶血弧菌出现集聚, 菌体发生严重内陷, 已不能维持细菌正常的形态。在 2 MIC 浓度原儿茶酸处理后, 副溶血弧菌严重干瘪并且发生破裂, 失去原本的形态, 可见原儿茶酸主要通过影响细胞膜的完整性破坏副溶血弧菌的正常细菌形态。

目前, 植物多酚的抑菌机制主要有: 一是破坏细胞壁的完整性和细胞膜的通透性, 影响细胞的正常形态; 二是通过去极化或超极化方式, 影响细胞膜电位; 三是影响细菌的能量代谢; 四是抑制生物大分子的合成^[22]。然而, 由于植物多酚成分复杂且受试菌不尽相同, 我们难以从某一方面深入阐明植物多酚的抑菌机理。本实验发现, 原儿茶酸能够使细胞壁凹陷、坍塌, 影响细胞膜的完整性和通透性, 进而破坏细胞的正常形态, 导致核酸、蛋白质等生物大分子的泄漏。此外, 已有研究发现, 原儿茶酸能直接作用于 DNA, 抑制基

因的转录和蛋白质的翻译, 干扰核酸和蛋白质正常代谢^[23,24], 但原儿茶酸是否会对副溶血弧菌基因表达和蛋白质合成产生影响, 还需要进一步验证。

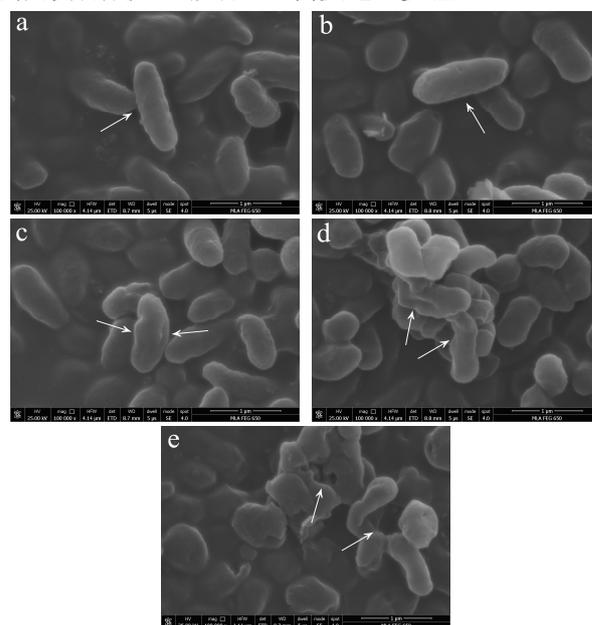


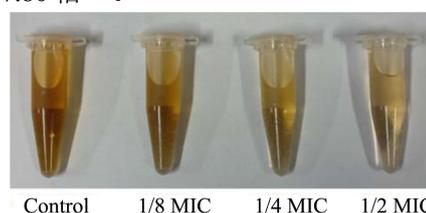
图5 场发射扫描电镜观察未经处理(a)、经 1/4 MIC 处理(b)、经 1/2 MIC 处理(c)、经 MIC 处理(d)和 2 MIC 处理(e)的副溶血弧菌的形态

Fig.5 The micrographs of *Vibrio parahaemolyticus* untreated with protocatechuic acid (a), treated at 1/4 MIC (b), treated at 1/2 MIC (c), treated at MIC (d) and treated at 2 MIC (e) based on field emission scanning electron microscope

2.3 原儿茶酸对副溶血弧菌毒力衰减作用

2.3.1 原儿茶酸对副溶血弧菌胞外多糖合成的影响

胞外多糖是细菌生物被膜的重要组分, 与细菌毒力密切相关。从图 6 可以看出, 副溶血弧菌胞外多糖产量随着原儿茶酸浓度的增加而减少。当原儿茶酸浓度分别达到 1/8 MIC、1/4 MIC 和 1/2 MIC 时, 其对胞外多糖产量的抑制率分别为 22.30%、40.57% 和 52.85%, 与对照组相比, 均存在显著差异性, 说明原儿茶酸能够降低副溶血弧菌胞外多糖的含量。本实验室前期研究发现, 植物精油(如柠檬醛)通过抑制相关调控基因 *VP1406* 的表达降低副溶血弧菌胞外多糖的合成, 在柠檬醛浓度为 1/2 MIC 时 *VP1406* 的表达下调了 7.80 倍^[25]。



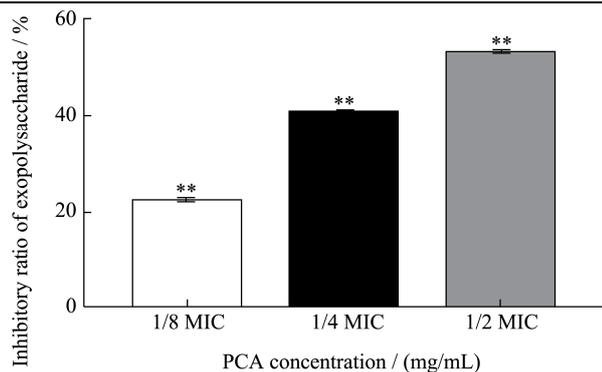


图6 原儿茶酸对副溶血弧菌胞外多糖的影响

Fig.6 Effects of PCA on the extracellular polysaccharides of *Vibrio parahaemolyticus*

2.3.2 原儿茶酸对副溶血弧菌胞外蛋白酶的影响

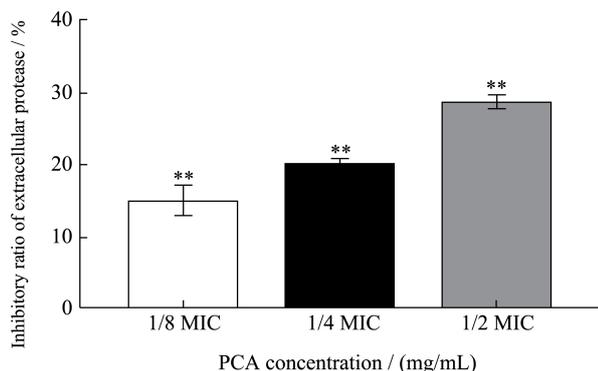
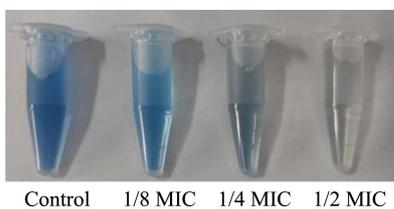


图7 原儿茶酸对副溶血弧菌胞外蛋白酶的影响

Fig.7 Effects of PCA on the extracellular protease of *Vibrio parahaemolyticus*

碱性丝氨酸蛋白酶是副溶血弧菌胞外蛋白酶的主要成分，也是副溶血弧菌在感染、侵袭宿主过程中发挥重要作用的外毒素之一。由图7可知，在没有添加原儿茶酸的对照组中，上清液与底物反应后形成明显的蓝色，即副溶血弧菌可产生大量的胞外碱性丝氨酸蛋白酶。当原儿茶酸浓度分别为1/8 MIC、1/4 MIC和1/2 MIC时，对胞外蛋白酶的抑制率分别为14.85%、19.79%和28.38%，与对照组相比均存在显著性差异。实验室前期研究发现香草酸可通过抑制群体感应中元件LuxR的表达而抑制碱性丝氨酸蛋白酶合成^[26]。副溶血弧菌胞外蛋白酶以及其他毒力因子受到群体感应系统的紧密调控，而许多植物提取物中的酚类物质都证明具有抑制群体感应系统的作用，如干扰信号分子的合成或抑制群体感应元件的表达^[27]。后期可深入

研究原儿茶酸对副溶血弧菌群体感应系统的作用。

2.3.3 原儿茶酸对副溶血弧菌生物被膜形成的影响

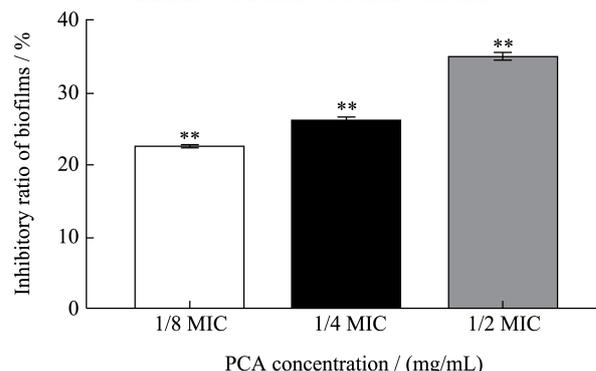
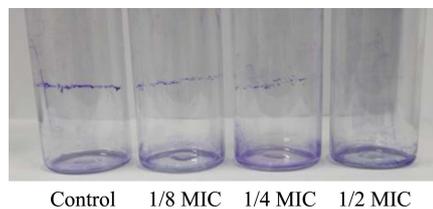


图8 原儿茶酸对副溶血弧菌生物被膜的影响

Fig.8 Effects of PCA on the biofilms of *Vibrio parahaemolyticus*

生物被膜是由细菌及其分泌的胞外多糖、蛋白、核酸等共同组成的具有一定三维结构的复合物，有助于包裹在其中的细菌抵抗抗菌剂的抑制作用，提高细菌的环境耐受性^[28]。由图8可知，在没有添加原儿茶酸的对照组中，副溶血弧菌可以形成一圈明显的生物被膜，而在添加了原儿茶酸后，其被膜量明显减少。当原儿茶酸浓度为1/8 MIC、1/4 MIC和1/2 MIC时，其对副溶血弧菌生物被膜的抑制率分别为22.37%、26.04%和34.69%，与对照组相比均存在显著性差异。可见，原儿茶酸对副溶血弧菌生物被膜的形成具有明显的抑制作用，且随浓度的增加而增强。生物被膜的形成一般需要经过5个阶段：第一阶段是微生物在基质表面建立可逆的吸附作用；第二阶段是微生物分泌聚合物使其牢固黏附于基质表面；第三阶段是细菌在基质表面生长，形成不成熟的被膜；第四阶段是细菌持续生长形成具有稳定结构的成熟生物被膜；第五阶段是三维结构发生改变，沿四周不断延展形成新的生物被膜^[29]。Bernal-Mercado等^[30]报道儿茶素、原儿茶酸和香草酸的混合物可以有效地阻止大肠杆菌细胞在基质表面的吸附，清除不成熟的被膜。原儿茶酸对副溶血弧菌生物被膜的抑制作用主要在哪个阶段进行以及对成熟的生物被膜是否具有清除作用尚不明确，也未见相关文献报导，后续可以考虑设计相关实验进行更为深入的探究。

3 结论

原儿茶酸对副溶血弧菌具有一定的抑菌活性和减毒作用,其最小抑菌浓度为2 mg/mL,且主要作用于细胞膜。原儿茶酸能促使细胞膜发生凹陷、坍塌,影响细胞膜的完整性和通透性,导致核酸、蛋白质泄漏至胞外,破坏细胞正常形态,并引起脂质过氧化,使细菌的生长繁殖受阻,最终导致其凋亡。在亚抑菌浓度下,原儿茶酸能明显抑制副溶血弧菌胞外多糖、胞外蛋白酶和生物被膜的合成,具有良好的毒力衰减作用。

参考文献

- [1] 杭莉.淡水产品中弧菌菌群组成及主要菌群致病性分析[D].扬州:扬州大学,2012
HANG Li. Composition and pathogenicity of *Vibrio* flora in fresh water products [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012
- [2] Yang C, Zhang X L, Fan H, et al. Genetic diversity, virulence factors and farm-to-table spread pattern of *Vibrio parahaemolyticus* food-associated isolates [J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103270
- [3] 张德福,付绪磊,励建荣,等.副溶血弧菌毒力因子及致病机理的研究进展[J].食品科学,2015,36(7):216-222
ZHANG Defu, FU Xulei, LI Jianrong, et al. Recent progress in research on *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors and pathogenic mechanism [J]. Journal of Food Science, 2015, 36(7): 216-222
- [4] 张婷,杨梦华.副溶血弧菌的毒力基因表达调控的分子机制[J].微生物学报,2020,60(7):1345-1357
ZHANG Ting, YANG Menghua. Molecular mechanisms of virulence genes expression in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(7): 1345-1357
- [5] 伊娟娟,王振宇,曲航,等.植物多酚抗肿瘤活性及其机制研究进展[J].食品工业科技,2016,37(18):391-395
YI Juanjuan, WANG Zhenyu, QU Hang, et al. Research progress in the anti-tumor activities and related mechanisms of plant polyphenols [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(18): 391-395
- [6] Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, et al. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2016, 21(2): 208
- [7] 李天运.乌蕨化学成分的提取分离及其功能分析[D].上海:上海师范大学,2018
LI Tianyun. Extraction and separation of chemical components from *Stenoloma chusana* Ching and its functional analysis [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2018
- [8] Shihikhar V, Ajay-Kumar S R, Malipeddi V R, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric profile of non-polar fraction and high-performance thin-layer chromatographic analysis of methanolic fraction with simultaneous quantifications of protocatechuic acid and quercetin in *Carissa carandas* L. fruits [J]. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2019, 32(3): 237-241
- [9] 贾振宇,孙怡,石超,等.原儿茶酸对阪崎克罗诺杆菌的抑制作用[J].微生物学通报,2018,45(4):788-796
JIA Zhenyu, SUN Yi, SHI Chao, et al. Antimicrobial activity of protocatechuic acid against *Cronobacter sakazakii* [J]. Microbiology China, 2018, 45(4): 788-796
- [10] Yang M H, Baek S H, Chinnathambi A, et al. Identification of protocatechuic acid as a novel blocker of epithelial-to-mesenchymal transition in lung tumor cells [J]. Phytotherapy Research, 2020, 35(4): 1953-1966
- [11] Han L, Qu L Z, Wang M, et al. Protocatechuic acid ameliorated palmitic acid-induced oxidative damage in endothelial cells through activating endogenous antioxidant enzymes via an AMPK-dependent pathway [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(40): 10400-10409
- [12] Grajeda-iglesias C, Salas E, Barouh N, et al. Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 749-757
- [13] 李永慧,王洪彬,张志强,等.中药对鲍曼不动杆菌的体外抑菌试验[J].中国兽医杂志,2019,55(1):82-85
LI Yonghui, WANG Hongbin, ZHANG Zhiqiang, et al. Antimicrobial activity of traditional Chinese medicine on *Acinetobacter baumannii* in vitro [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(1): 82-85
- [14] 周芳,熊海涛,宋凯,等.牛津杯法测定抗菌肽对四种有害微生物的抑制效果[J].饲料工业,2018,39(6):48-51
ZHOU Fang, XIONG Haitao, SONG Kai, et al. Determination of inhibitory effect of antimicrobial peptides on four harmful microorganisms by oxford cup method [J]. Feed Industry, 2018, 39(6): 48-51
- [15] Zhou D, Liu Z H, Wang D M, et al. Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of valonia and shell from *Quercus variabilis* Blume (Fagaceae) against *Salmonella paratyphia* and *Staphylococcus aureus* [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2019,

- 19(1): 568-584
- [16] Elia G. Cell surface protein biotinylation for SDS-PAGE analysis [J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2019, 1855: 449-459
- [17] Shi C, Song K K, Xia X D, et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii* [J]. *PLoS One*, 2019, 11(7): e0159006
- [18] Gutiérrez-Larraínzar M, Rúa J, Caro I, et al. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria [J]. *Food Control*, 2012, 26(2): 555-563
- [19] 朱金帅,李秋莹,励建荣,等.酚酸对水产品腐败希瓦氏菌的抑菌作用[J].食品与机械,2020,36(6):133-137
ZHU Jinshuai, LI Qiuying, LI Jianrong, et al. Antibacterial effect of phenolic acid on *Shewanella putrefaciens* from aquatic product [J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(6): 133-137
- [20] Shi Y, Cai M J, Wang H D, et al. The structure and function of cell membranes studied by atomic force microscopy [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2018, 73: 31-44
- [21] 翟晓虎,杨海锋,陈慧英,等.丙二醛的毒性作用及检测技术研究进展[J].上海农业学报,2018,34(1):144-148
ZHAI Xiaohu, YANG Haifeng, CHEN Huiying, et al. Research progress in the toxicity and determination technology of malondialdehyd [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2018, 34(1): 144-148
- [22] 费鹏,赵胜娟,康怀彬,等.植物多酚抑菌活性、作用机理及应用研究进展[J].食品与机械,2019,35(7):226-230
FEI Peng, ZHAO Shengjuan, KANG Huaibin, et al. The research progress on antimicrobial activity, mechanism and application of plant polyphenols [J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(7): 226-230
- [23] 薛小燕,章正,罗焕敏,等.原儿茶酸对 M146L 细胞 APP mRNA 表达的抑制作用[J].中药材,2012,35(11):1813-1816
XUE Xiaoyan, ZHANG Zheng, LUO Huanmin, et al. Inhibitory effect of protocatechuic acid on APP mRNA expression in M146L cells [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2012, 35(11): 1813-1816
- [24] Dai X Q, Chen Y, Han F M, et al. Protocatechuic acid inhibits hepatitis B virus replication by activating ERK1/2 pathway and down-regulating HNF4 α and HNF1 α *in vitro* [J]. *Life Sciences*, 2017, 180: 68-74
- [25] Cao J J, Liu H, Wang Y, et al. Antimicrobial and antivirulence efficacies of citral against foodborne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633 [J]. *Food Control*, 2021, 120: e107507
- [26] Liu H, Xiao M, Zuo J, et al. Vanillic acid combats *Vibrio alginolyticus* by cell membrane damage and biofilm reduction [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2021, 1: 1-11
- [27] Takó M, Kerekes E B, Zambrano C, et al. Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms [J]. *Antioxidants* (Basel), 2020, 9(2): 165
- [28] 邹明明,王文骏,刘东红,等.细菌生物被膜的研究进展[J].中国食品学报,2017,17(7):156-164
ZOU Mingming, WANG Wenjun, LIU Donghong, et al. Research progress on bacterial biofilm [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(7): 156-164
- [29] 李程程.牡丹花酚类成分提取纯化及其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌生物被膜抑制活性研究[D].无锡:江南大学, 2020
LI Chengcheng. Study on the extraction and purification of phenolics from peony flowers and their anti-biofilm activities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020
- [30] Bernal-Mercado A T, Vazquez-Armenta F J, Tapia-Rodríguez M R, et al. Comparison of single and combined use of catechin, protocatechuic, and vanillic acids as antioxidant and antibacterial agents against uropathogenic *Escherichia Coli* at planktonic and biofilm levels [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2813