

西洋参低极性皂苷对感染单核细胞增生李斯特菌小鼠的保护作用

荆金金, 张若愚, 林冰洁, 林潮辉, 熊智钦, 张丰香, 薛鹏

(潍坊医学院公共卫生学院, 山东潍坊 261053)

摘要: 本研究探讨转化后的西洋参茎叶皂苷 (HTS) 预处理对感染单核细胞增生李斯特菌小鼠的保护作用。HTS 组、西洋参茎叶皂苷 (AGS) 组小鼠进行 14 d 连续性干预后感染单核细胞增生李斯特菌, 染菌后继续灌胃 7 d, 分析 HTS 对染菌小鼠的保护作用。体外抑菌实验表明 HTS 对单核细胞增生李斯特菌的抑菌圈直径为 18.47 mm, 具有明显的抑菌效果; HTS 预处理组小鼠的肝脏系数 (0.0593)、脾脏系数 (0.00433) 与阴性组 (分别为 0.0518、0.00678) 相比差异有显著统计学意义 ($p < 0.05$); HTS 预处理组小鼠肾脏系数 (0.0155) 与空白组 (0.0155) 相比, 差异有统计学意义 ($p < 0.1$)。同空白组相比, 阴性组小鼠肝脏颜色异常, 肝切片可见明显的炎性细胞浸润, 细胞核缺失和肥大; HTS 预处理组小鼠肝脏颜色质地正常, 未见明显的病理性变化。HTS 预处理组小鼠血液中白细胞 (WBC)、中性粒细胞 (NEUT) 数量 (分别为 5.62、2.19) 较阴性组小 (分别为 6.13、2.40); 肝脏中 IL-1 β 和 IFN- γ 的水平 (分别为 76.75 pg/mg、74.67 pg/mg) 低于阴性组水平 (分别为 115.14 pg/mg、335.45 pg/mg), 差异有显著统计学意义 ($p < 0.05$)。因此, HTS 能通过降低炎症细胞的分泌, 减轻肝组织炎性细胞浸润等病理形态, 降低炎性细胞因子的释放来减轻染菌小鼠的损害, 对染菌小鼠肝脏具有保护作用。

关键词: 西洋参; 皂苷; 单核细胞增生李斯特菌; 炎性细胞 (炎症细胞)

文章编号: 1673-9078(2021)08-53-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.1139

Protective Effect of Low Polarity Saponins of American Ginseng on Mice Infected with *Listeria monocytogenes*

JING Jin-jin, ZHANG Ruo-yu, LIN Bing-jie, LIN Chao-hui, XIONG Zhi-qin, ZHANG Feng-xiang, XUE Peng

(School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

Abstract: In this study, the protective effect of heat-transformed saponins of American ginseng (HTS) on mice infected with *Listeria monocytogenes* (*Lm*) was investigated. Mice in the HTS group and American ginseng leaf-stem saponins (AGS) group were infected with *Lm* after 14 days of continuous intervention. After the infection, gavage was continued for another 7 days, to examine the protective effect of HTS on infected mice. *In vitro* antibacterial experiments showed that HTS had a significant antibacterial effect, with an inhibition zone diameter of 18.47 mm. The liver and spleen coefficients of the HTS pretreatment group (0.0593 and 0.00433, respectively) and the negative group (0.0518 and 0.00678, respectively) were statistically different ($p < 0.05$). The kidney coefficients between the HTS pretreatment group (0.0155) and blank group (0.0155) was statistically different ($p < 0.1$). Compared with the blank group, the liver color of the negative group was abnormal, and the liver section showed obvious inflammatory cell infiltration, loss of nuclei and hypertrophy. The color and texture of the liver of the HTS pretreatment group were normal, with no obvious pathological changes. The numbers of white blood cell (WBC) and neutrophil (NEUT) of the

引文格式:

荆金金,张若愚,林冰洁,等.西洋参低极性皂苷对感染单核细胞增生李斯特菌小鼠的保护作用[J].现代食品科技,2021,37(8):53-61,+199

JING Jin-jin, ZHANG Ruo-yu, LIN Bing-jie, et al. Protective effect of low polarity saponins of american ginseng on mice infected with *Listeria monocytogenes* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 53-61, +199

收稿日期: 2020-12-08

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2019PH043)

作者简介: 荆金金 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养安全

通讯作者: 张丰香 (1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食源性蛋白及功能性多肽; 共同通讯作者: 薛鹏 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药化学, 抗食源性致病菌功能因子筛选

HTS pretreatment group (5.62 and 2.19, respectively) were smaller than those of the negative group (6.13 and 2.40, respectively). The levels of IL-1 β and IFN- γ in the liver of the HTS pretreatment group (76.75 pg/mg and 74.67 pg/mg, respectively) were significantly lower than those of the negative group (115.14 pg/mg and 335.45 pg/mg, respectively), with the differences being statistically significant ($p < 0.05$). Therefore, HTS can reduce the damage of infected mice by reducing the secretion of inflammatory cells, alleviating pathological forms such as inflammatory cell infiltration in the liver tissue, and reducing the release of inflammatory cytokines, thereby exerting a protective effect on the liver of infected mice.

Key words: American ginseng; saponins; *Listeria monocytogenes*; inflammatory cells

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *Lm*) 为革兰氏阳性胞内寄生菌, 属于食源性致病菌的一种, 广泛存在于荷塘污泥、浅地表水、土壤等自然环境中且易污染蔬菜、水果、禽类、肉类、蛋类、乳制品、奶制品、水源以及海产品等食物, 可感染多种哺乳动物, 导致人畜共患病^[1,2]。单核细胞增生李斯特菌能打破胃肠道粘膜屏障、胎盘屏障和血脑屏障, 易感人群为老年人、新生儿、孕妇及免疫力低下者^[3], 可导致胃肠炎、败血症、脑膜脑炎、胎盘胎儿感染及流产, 致死率高达 30%, 远高于其他食源性致病菌^[4]。美国疾病预防控制中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 报道, 每年有 1600 人因食用被单核细胞增生李斯特菌污染的食物感染李斯特菌病, 其中约 260 人死亡^[5]。国内李斯特菌感染案例相对较少^[6], 但未来仍存在许多潜在的威胁。

目前, 李斯特菌病的主要治疗药物为抗生素, 但在治疗过程中容易出现抗生素滥用现象, 易引起超级耐药菌的产生^[7]。因此, 研究和开发新型绿色抗生素替代药物成为当前的研究热点和难点之一^[8]。博落回为罂粟科博落回属多年生草本植物, 具有抗菌消炎、增强免疫力以及抗肿瘤等功效^[9]。早在 20 年前, 博落回就因其安全、无污染、易降解无残留、不易产生耐药菌等优点, 作为兽药和生物农药广泛应用于养殖生产中。但博落回本身有毒, 长期食用会对机体产生危害^[8-10]。

西洋参 (American ginseng) 为五加科人参属多年生草本植物, 原生长于北美原始森林, 已在我国引种栽培多年, 目前我国西洋参种植主要集中在吉林、黑龙江、山东、北京等地^[11,12]。西洋参的主要生物活性成分为人参皂苷和多糖。人参皂苷广泛存在于西洋参的根、茎叶、花蕾及果实中^[13,14]。研究表明, 西洋参茎叶中总皂苷的含量高于其根部^[15], 且类型相似, 药理活性差异较小^[16]。人参原型皂苷在肠道中的转化非常微弱, 大部分很难被利用。低糖基的人参皂苷 Rg2、C-K、Rg3、Rh1、Rh2 等, 在肠道中的吸收率高^[17], 具有抗癌、抗血栓、抗炎症、抗皮肤老化以及治疗神经系统疾病等功效, 特别是将人参皂苷结构修饰得到

的次级人参稀有皂苷, 效果更佳^[18,19]。人参中含量极低的皂苷如 Rh2、Rg3、Rk3、Rg6 等被称为稀有皂苷^[17]。稀有皂苷在西洋参中含量非常少, 研究发现, 通过对普通人参皂苷的糖基进行改造可以得到稀有皂苷^[20]。

目前对于单核细胞增生李斯特菌的研究主要集中在其对孕妇、新生儿、免疫力低下者的危害, 对男性危害研究较少。对于人参皂苷的研究主要集中在其抗肿瘤、抗氧化、心血管疾病治疗等方面, 对于抗感染的研究少。因此, 本实验以雄性小鼠为研究对象, 以富含低极性皂苷的西洋参转化皂苷 (HTS) 为原料, 研究其对感染单核细胞增生李斯特菌雄性小鼠的保护效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

单核细胞增生李斯特菌 (ATCC19115), 购自广东省微生物菌种保存中心; 无特定病原体级别 (SPF) 的雄性昆明鼠 (6~8 周龄), 购自山东朋悦实验动物繁育有限公司 (许可证号: SCXK2019003); 西洋参茎叶皂苷 (AGS), 购自吉林宏久生物科技有限公司; 血琼脂和脑心浸液 (BHI) 培养基, 购自青岛海博生物科技有限公司; ELISA 试剂盒, 购自上海西塘生物科技有限公司; 博落回注射液, 购自山东易和天生物科技有限公司; 青霉素 80 万单位和异氟醚, 购自山东鲁抗医药股份有限公司。其他化学物质都是分析或色谱级别的。

BPMJ-150F 型培养箱, 上海亿恒科学仪器有限公司; IX73 奥林巴斯光学显微镜, 日本 Olympus 公司; SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; SCIENTZ-48L 冷冻型高通量组织研磨器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 1510 酶标仪, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; AR224CN 电子天平, 常州奥豪斯仪器有限公司; Thermo 台式离心机, 美国赛默飞世尔科技公司; GF88DA 型高压灭菌锅, 厦门致微仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 西洋参转化皂苷的制备

以西洋参茎叶皂苷(AGS)(粗皂苷含量可达89%)为原料,转化后的西洋参茎叶皂苷(HTS)由实验室前期制备。经高效液相色谱仪分析,AGS中极性皂苷含量为 0.81 ± 0.03 mg/mg(主要为Rb₂、Re/Rg₁、Rd等),低极性皂苷含量为 0.08 ± 0.02 mg/mg;HTS中极性皂苷含量为 0.10 ± 0.01 mg/mg,低极性皂苷含量为 0.76 ± 0.02 mg/mg(主要为Rg₃、Rk₁、Rg₆、Rg₅等)^[21,22]。

1.2.2 单核细胞增生李斯特菌培养

称取7.6 g血琼脂培养基,加热溶解于200 mL蒸馏水中搅拌均匀,置于三角瓶中,高压灭菌锅中121 °C高压灭菌15 min,冷却至50~55 °C时无菌操作加入预温至36 °C的5% (V/V) 无菌脱纤维绵羊血,混匀,倾入无菌平皿及50 mL离心管中,分别制成鲜红色血培养基和血琼脂斜面培养基,4 °C冰箱保存备用。称取7.6 g脑心浸液肉汤(BHI),加热搅拌溶解于200 mL蒸馏水中,置于三角瓶中,高压灭菌锅中121 °C高压灭菌15 min,待培养基冷却至60 °C时,分装至50 mL离心管,4 °C冰箱保存备用。

将冻干的单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)粉末置于BHI培养基中,培养箱37 °C孵化24 h,连续传代。将活化的单核细胞增生李斯特菌置于预先准备好的血液琼脂斜面培养基中低温保存。

1.2.3 菌悬液制备

用接种环接种培养后的*Lm*,将其分别置于含1 mL生理盐水的离心管中,分散混合,显微镜下计数,调整菌悬液浓度至 10^6 CFU/mL。

1.2.4 体外抑菌实验

高温灭菌直径为6 mm的滤纸分成3组(4片/组),分别标记为1、2、3、4。用移液器准确吸取10 mg/mL AGS溶液和HTS溶液,5万单位/0.1 mL青霉素注射液和10 mg/mL博落回注射液各10 μ L,分别对1、2、3、4号试纸片进行浸润干预(2次/片)。用移液器吸取100 μ L菌悬液均匀涂布于血琼脂培养基,用棉棒吸干多余的细菌悬液。将制备好的试纸按序号顺时针排列在培养基上,将培养基置于37 °C培养箱中培养12 h后观察抑菌圈^[23]。

1.2.5 体内抑菌实验

30只雄性昆明鼠适应性喂养1周,随机分成5组:空白组、阴性组、AGS预处理组(AGS组)、HTS预处理组(HTS组)和青霉素组,每组6只。AGS组和

HTS组小鼠分别给予10 mg/kg的AGS、HTS,10 mL/(kg·d)等体积灌胃预处理14 d,其余3组不做任何预处理。14 d后,阴性组、青霉素组、AGS组和HTS组小鼠分别给与腹腔注射0.1 mL 10^6 CFU/mL单核细胞增生李斯特菌菌悬液,空白组不做任何处理。染菌后,AGS组和HTS组小鼠分别给予10 mg/mL的AGS、HTS,10 mg/(kg·d)等体积灌胃7 d,青霉素组小鼠腹腔注射0.1 mL 5万单位/0.1 mL青霉素注射液,阴性组和空白组不做任何处理。根据病情进展,从上午7:00至晚上10:00每隔4 h观察一次。每天称量各组小鼠的体重并做记录。当小鼠出现行动能力下降,不能进食或饮水时,用1%~4%异氟醚对这些小鼠实施安乐死^[24]。所有动物实验方案均经潍坊医学院动物伦理委员会批准(准字文号:2020SDL147)。实验结束时,收集小鼠血液,并迅速解剖脏器(肝、脾、肾),立即拍照并记录脏器重量,手术刀快速收集2 mm \times 5 mm \times 5 mm肝组织切片,10%甲醛溶液固定,并迅速送至潍坊医学院附属医院病理科制备石蜡切片和血常规分析。

1.2.5.1 体重和脏器系数

每天称量并记录各组小鼠体重。当小鼠出现终点现象时,异氟醚麻醉下颈椎脱臼处死小鼠。处死后立即拍照并记录脏器(肝、脾、肾)重量。未出现终点现象的小鼠在第8 d使用异氟醚安乐死,拍照并称量记录脏器(肝、脾、肾)重量。

1.2.5.2 肝组织切片

各组小鼠出现死亡后即刻解剖,并用手术刀快速收集2 mm \times 5 mm \times 5 mm肝组织切片。肝组织切片用10%甲醛溶液固定,尽快送至潍坊医学院附属医院病理科制备石蜡切片。石蜡切片在IX73奥林巴斯光学显微镜(奥林巴斯有限公司,日本东京)下观察。

1.2.5.3 染菌小鼠血常规测定

各组小鼠出现濒死现象时,摘眼球取血,将血液装在含有肝素钠抗凝剂的EP管内混匀,尽快送至潍坊医学院附属医院检验科进行血常规分析。

1.2.5.4 肝脏中IL-1 β 和IFN- γ 水平

取部分小鼠肝脏称重,按重量体积比1:9的比例加入无菌生理盐水,用冷冻型高通量组织研磨器研磨成组织匀浆,4000 \times g离心10 min,取上清液备用。用ELISA试剂盒检测肝组织中IL-1 β 和IFN- γ 水平,具体操作步骤参照试剂盒说明书,由ELISA软件计算细胞因子水平。

1.3 统计学方法

采用SPSS Statistics 17.0统计软件对所得数据进

行统计学分析处理；采用 GraphPad Prism 8 进行数据分析及绘图。利用单因素方差分析进行统计学分析，在方差齐性检验的基础上，利用 LSD-t 法对不同组间差异进行分析，用“*”和“#”表示显著性差异。上述每个实验重复三次，测量结果以均数±标准差(X±SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 纸片法测定抑菌活性

如图 1 可知，通过比较抑菌圈的大小，AGS、HTS、博落回和青霉素对单核细胞增生李斯特菌有抑菌效果，抑菌圈大小为青霉素>博落回>HTS>AGS。低极性皂苷表面的糖基较少，与微生物的亲合力增强，破坏细胞膜的稳定性，从而达到抑菌的效果^[25,26]。



图 1 抑菌圈大小

Fig.1 Bacteriostatic zone size

注：1~4 依次为 AGS、HTS、青霉素和博落回注射液；AGS、HTS 分别代表西洋参茎叶皂苷、转化后的西洋参茎叶皂苷。

表 1 抑菌圈直径的测定结果

Table 1 Results of inhibition zone diameters test

受试样品	抑菌圈直径/mm
AGS	17.00±0.36**
HTS	18.47±0.49**
青霉素	34.70±0.95
博落回	28.27±1.27**

注：AGS、HTS 分别代表西洋参茎叶皂苷、转化后的西洋参茎叶皂苷。**代表与青霉素相比差异有统计学意义。

由表 1 可知，AGS、HTS、青霉素和博落回注射液均对单核细胞增生李斯特菌具有抑制作用。青霉素对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果最好，抑菌圈直径为 34.70 mm；其次为博落回注射液，抑菌圈直径为 28.27 mm；HTS 对单核细胞增生李斯特菌的抑菌圈直径为 18.47 mm；AGS 对单核细胞增生李斯特菌的抑制效果最差，抑菌圈直径为 17.00 mm。AGS、HTS、青霉素和博落回注射液对单核细胞增生李斯特菌抑菌

直径的方差分析结果均显示 $p < 0.05$ ，四种物品的抑菌效果具有统计学意义，说明富含低极性皂苷的 HTS 抑菌效果优于 AGS，与薛鹏^[21]等研究相互佐证。

2.2 染菌小鼠生存情况

腹腔注射 0.1 mL 10^6 CFU/mL 单核细胞增生李斯特菌后，小鼠生存情况如图 2 所示，AGS 组小鼠染菌后的第 3 d 开始出现死亡，7 d 内的存活率为 83%；阴性组、HTS 组和青霉素组小鼠染菌后的 7 d 内未出现死亡，存活率为 100%；空白组小鼠未出现死亡，排除其它因素对小鼠生存率的影响。AGS 除可提高机体免疫力，同时可改善微循环，促进机体血液循环^[27]，加速单核细胞增生李斯特菌在体内分布，进而造成小鼠死亡。

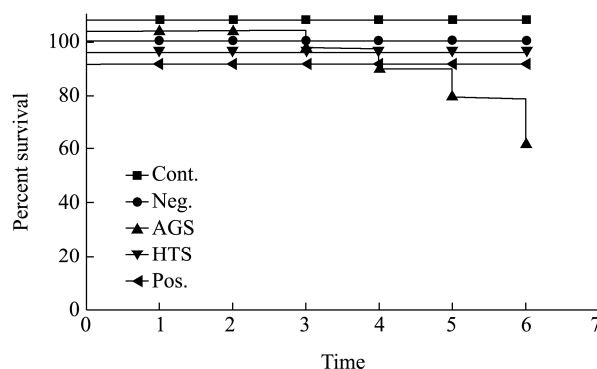


图 2 生存曲线

Fig.2 Percent survival

注：Cont.、Neg.、AGS、HTS、Pos. 分别代表空白组、阴性组、西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组、青霉素组。

2.2.1 染菌小鼠体重变化

根据小鼠的临床表现(表 2)和体重变化情况(图 3)可知，阴性组、AGS 组和青霉素组小鼠，染菌后的第 2 d 出现毛色枯燥、食欲不振、腹泻等临床表现；HTS 组染菌后，第 2 d 毛色、食欲未出现明显变化，体重则呈现上升趋势，第 3 d 出现毛色枯燥、食欲不振、腹泻等临床表现。AGS 组小鼠染菌后的第 3 d 体重下降最严重约 5%，之后呈现缓慢上升趋势；阴性组小鼠染菌后的第 6 d 体重下降最严重约 5.6%，之后呈上升趋势；HTS 组小鼠染菌后第 3 d 体重下降最严重约 0.5%，总体呈上升趋势；青霉素组小鼠染菌后的第 2 d 体重下降最严重约 2.2%，之后呈上升趋势；空白组小鼠在实验期间临床表现正常，体重总体呈现上升趋势。单核细胞增生李斯特菌感染，可引起机体肠胃炎等症状^[4]，HTS 预处理可减轻染菌小鼠的腹泻症状，起到抗炎作用。

表2 小鼠临床表现情况

Table 2 Clinical manifestations of mice

组别	Neg.						AGS						HTS						Pos.					
只数	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
5	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
6	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注: Cont.、Neg.、AGS、HTS、Pos.分别代表空白组、阴性组、西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组、青霉素组; +代表出现毛色枯燥、食欲不振、腹泻等临床表现, -代表未出现毛色枯燥、食欲不振、腹泻等临床表现; 空白表示死亡。

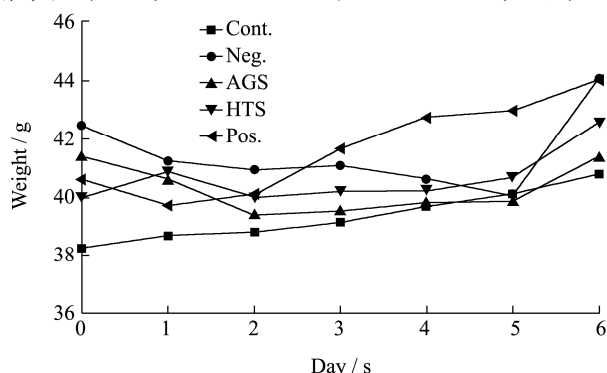


图3 小鼠体重变化情况

Fig.3 Weight change in mice

注: Cont.、Neg.、AGS、HTS、Pos.分别代表空白组、阴性组、西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组、青霉素组。

2.2.2 西洋参低极性皂苷对小鼠脏器指标的影响

脏器系数为毒理学评价常用的指标, 数值增大表示脏器充血、肥大、水肿等异常生理状态; 数值减少表示脏器萎缩及其他退行性改变^[28]。小鼠感染单核细胞增生李斯特菌后的脏器系数变化如图4所示, 空白组和HTS组小鼠肝脏系数(分别为0.0597、0.0593)同阴性组(0.0518)相比有显著统计学意义($p < 0.05$, **); 阴性组、AGS组和青霉素组小鼠肝脏系数(分别为0.0518、0.0537、0.0475)同空白组相比有显著统计学意义($p < 0.05$, ##)。空白组、AGS组、HTS组和青霉素组小鼠的脾脏系数(分别为0.00247、0.00417、0.00433、0.00273)同阴性组(0.00678)相比有显著统计学意义($p < 0.05$, **)。空白组小鼠肾脏系数(0.016)同阴性组(0.0155)相比差异有显著统计学意义($p < 0.05$, **); HTS组小鼠肾脏系数(0.0155)同阴性组相比有统计学意义($p < 0.1$, *); 阴性组、AGS组和青霉素组小鼠肾脏系数(0.0155、0.017、

0.0163)同空白组相比有显著统计学意义($p < 0.05$, ##)。

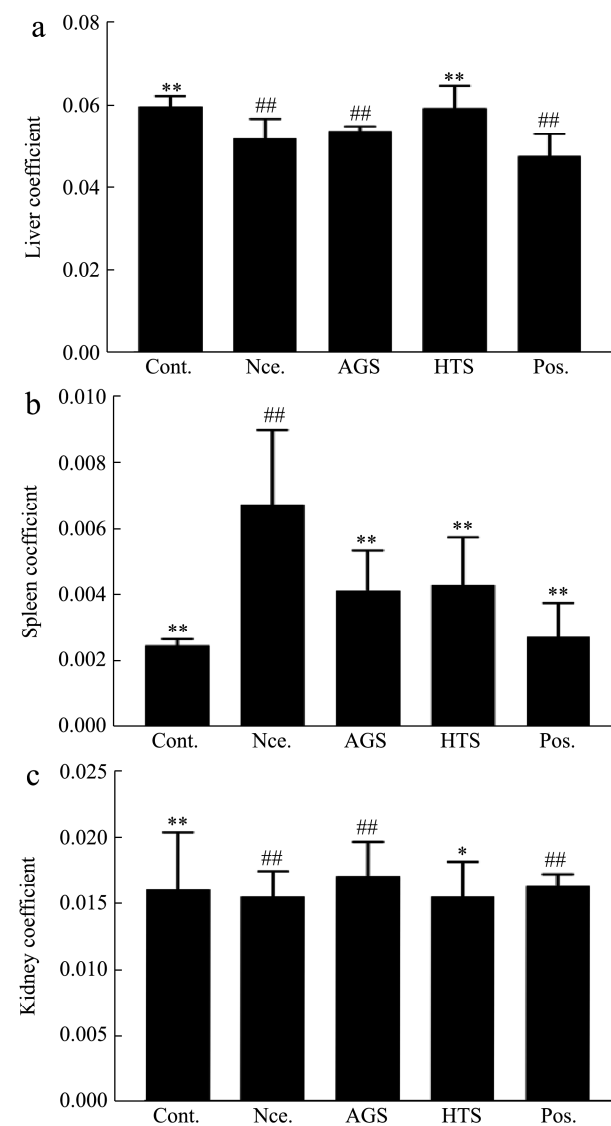


图4 脏器系数

Fig.4 Organ coefficient

注: a-c 分别代表肝脏系数、脾脏系数、肾脏系数; Cont.、

Neg.、AGS、HTS、Pos.分别代表空白组、阴性组、西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组、青霉素组；**代表同阴性组相比有显著统计学意义 ($p<0.05$)；*代表同阴性组相比有统计学意义 ($p<0.1$)，##代表同空白组相比有显著统计学意义 ($p<0.05$)。

2.2.3 西洋参低极性皂苷对小鼠血液中白细胞和中性粒细胞的影响

血液中白细胞 (WBC) 的数量变化可以作为炎症发生的常规指标，中性粒细胞 (NEUT) 数量作为炎症发生的一种重要指标^[29,30]。染菌雄性小鼠血液中WBC和NEUT数量如表3所示，阴性组、AGS组、HTS组和青霉素组小鼠血液中WBC数量同空白组相比差异有显著统计学意义 ($p<0.05$, ##)；阴性组、AGS组、HTS组和青霉素组小鼠血液中NEUT数量同空白组相比差异有显著统计学意义 ($p<0.05$, ##)。结果表明，HTS预处理可以减少染菌小鼠血液中WBC、NEUT含量，起到减轻炎症的作用。

表3 小鼠的血常规分析结果

Table 3 Results of blood routine analysis in mice

Group	WBC ($10^9/L$)	NEUT ($10^9/L$)
Cont.	2.55±0.72**	0.25±0.07**
Neg.	6.13±0.59##	2.40±0.95##
AGS	6.14±1.44##	2.99±0.59##
HTS	5.62±0.95##	2.19±0.69##
Pos.	3.56±1.46##	2.61±0.97##

注：WBC、NEUT 分别代表白细胞、中性粒细胞；Cont.、Neg.、AGS、HTS、Pos.分别代表空白组、阴性组、西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组、青霉素组；**代表同阴性组相比有显著统计学意义 ($p<0.05$)；##代表同空白组相比有显著统计学意义 ($p<0.05$)。

2.2.4 西洋参低极性皂苷对小鼠肝脏的影响

现有研究表明，感染单核细胞增生李斯特菌雌性小鼠肝脏会出现颜色异常，有明显的细菌定植、白斑等症状^[31]。染菌雄性小鼠肝脏照片结果如图5所示，肉眼观察阴性组小鼠肝脏颜色异常，表面未见明显的钙化、白斑等损伤；空白组、AGS组、HTS组和青霉素组小鼠肝脏颜色质地正常，未见明显的外观变化。单核细胞增生李斯特菌对 HTS 组小鼠肝脏无明显的损伤。



图5 肝脏照片

Fig.5 Liver photograph

注：a-e 分别代表空白组、阴性组、AGS 组、HTS 组、青霉素组小鼠肝脏照片；AGS 组、HTS 组分别代表西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组。

2.2.5 染菌小鼠的肝脏切片

感染单核细胞增生李斯特菌小鼠的肝脏切片如图6所示，阴性组小鼠肝切片可见明显的炎性细胞浸润，细胞核缺失、肥大等现象，与空白组相比有明显区别；与空白组相比，HTS 组小鼠肝切片未见明显的炎性细胞浸润等现象；AGS 组和青霉素组小鼠肝脏切片可见细胞核肥大，与空白组相比有区别。动物体内实验的结果同前人的研究相似，单核细胞增生李斯特菌侵入机体后，造成肝脏炎性细胞浸润、坏死，组织水肿等病理性损害^[31,32]。

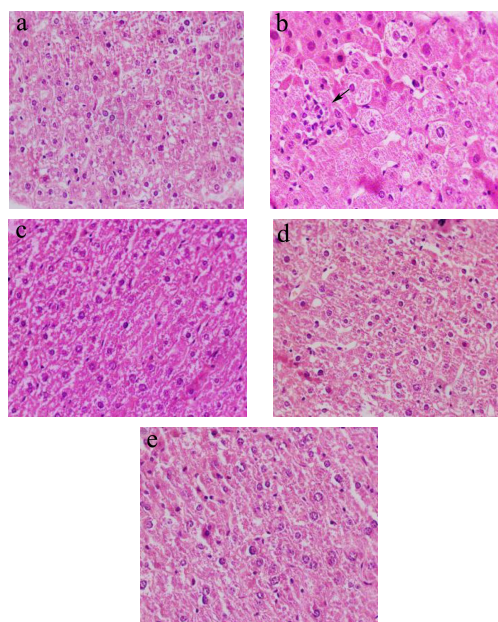


图6 肝脏切片

Fig.6 Liver section

注：a-e 分别代表空白组、阴性组、AGS 组、HTS 组、青霉素组小鼠肝脏切片 ($\times 400$)；AGS 组、HTS 组分别代表西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组。

2.2.6 染菌小鼠肝脏中 IL-1 β 和 IFN- γ 水平

IL-1 β 、IFN- γ 是重要的炎性细胞因子,当机体出现炎症反应时,其水平会大幅度的上调^[33]。IL-1 β 是由巨噬细胞产生的一类细胞因子,能促进黏附分子表达,引起炎症介质和炎症蛋白释放,进而引起肝脏炎症反应和局部组织的损伤^[34,35]。IFN- γ 为非特异性免疫的重要组成部分。IFN- γ 是由干扰素刺激基因调节释放的一类糖蛋白,有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能等作用^[36]。单核细胞增生李斯特菌进入细胞后裂解可以激活炎性小体释放 IL-1 β ,引起环状 GMP-AMP 合酶(cGAS)产生特异性的环二核苷酸(CDN)—环状 GMP-AMP (cGAMP),激活干扰素基因蛋白刺激因子(STING),进而增加巨噬细胞中干扰素 IFN- γ 的产生^[37]。印双红等^[38]研究表明,单核细胞增生李斯特菌可提高雌性小鼠炎性细胞因子 IL-1 β 的水平。王建芳^[39]研究表明单核细胞增生李斯特菌可提高雌性小鼠炎性细胞因子 IFN- γ 的水平。

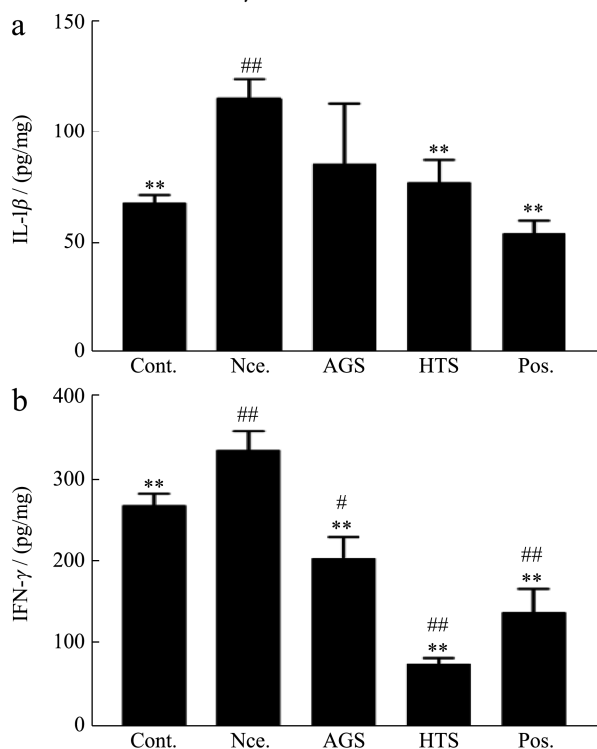


图7 肝脏中 IL-1 β 和 IFN- γ 的水平

Fig.7 Levels of IL-1 β and IFN- γ in the liver

注: a、b 分别代表炎性细胞因子 IL-1 β 水平、IFN- γ 水平; Cont.、Neg.、AGS、HTS、Pos. 分别代表空白组、阴性组、西洋参茎叶皂苷预处理组、转化后的西洋参茎叶皂苷预处理组、青霉素组; **代表同阴性组相比有显著统计学意义 ($p < 0.05$); ##代表同空白组相比有显著统计学意义 ($p < 0.05$), #代表同空白组相比有统计学意义 ($p < 0.1$)。

染菌小鼠肝脏中炎性细胞因子的水平如图 7 所示,空白组、HTS 组和青霉素组小鼠肝脏中 IL-1 β 的

水平(分别约为 67.48 pg/mg、76.75 pg/mg、53.82 pg/mg)同阴性组(约为 115.14 pg/mg)相比有显著统计学意义 ($p < 0.05$, **); AGS 组小鼠肝脏中 IL-1 β 的水平(约为 85.09 pg/mg)同空白组相比,无统计学意义 ($p > 0.1$)。空白组、AGS 组、HTS 组和青霉素组肝脏中 IFN- γ 的水平(分别约为 269.21 pg/mg、203.87 pg/mg、74.67 pg/mg、138.11 pg/mg)同阴性组(约为 335.45 pg/mg)相比有显著统计学意义 ($p < 0.05$, **); 阴性组、HTS 组和青霉素组肝脏中 IFN- γ 的水平同空白组相比有显著统计学意义 ($p < 0.05$, ##); AGS 组肝脏中 IFN- γ 的水平同空白组相比有显著统计学意义 ($p < 0.1$, ##)。结果表明,HTS 预处理可增加机体的免疫力,能减轻单核细胞增生李斯特菌对雄性小鼠的肝细胞损伤,起到减少炎性细胞释放和护肝的作用。

HTS 在肠道中的消化利用率较高,其富含的低极性皂苷表面糖基较少,同微生物细胞膜的亲和力增强,易破坏细胞膜的稳定性^[40,41],更好的保护感染单核细胞增生李斯特菌小鼠肝脏,减轻细菌对肝脏的损伤,减少炎性细胞因子释放,起到护肝的作用。

3 结论

本研究发现,HTS 对单核细胞增生李斯特菌具有一定的体外抑菌效果。尽管,单核细胞增生李斯特菌对雄性小鼠的危害较轻,但会引起肝脏损伤。与 AGS 相比,HTS 预处理对感染单核细胞增生李斯特菌雄性小鼠具有保护作用,主要是通过降低染菌小鼠体内炎症细胞如 WBC 和中性粒细胞的分泌,减轻炎症细胞浸润、坏死等肝组织病理形态,降低染菌小鼠炎性细胞因子的分泌水平来发挥抗炎作用。本研究为防治食源性致病提供了新的材料,也为预防李斯特菌感染提供数据和理论支持。

参考文献

- [1] 程昌勇.单核细胞增多性李斯特菌精氨酸和鲑精胺脱亚胺酶的抗酸应激机制及其调控[D].杭州:浙江大学,2014
CHENG Chang-yong. Arginine deiminase & agmatine deiminase in *Listeria monocytogenes*: mechanisms in acid tolerance and regulation [D]. Hangzhou: Zhejiang: Zhejiang University, 2014
- [2] Rocha P R D, Dalmaso A, Grattarola C, et al. A typical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull [J]. Res Vet Sci, 2013, 94(1): 111-114
- [3] Silk B J, Date K A, Jackson K A, et al. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (Food Net), 2004-2009: further targeted prevention needed for

- higher-risk groups [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54(Suppl 5): S396-S404
- [4] 李宁. 滋养细胞胞内 DNA 识别受体抵抗李斯特菌感染的机制研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2015
- LI Ning. Cytosolic DNA sensor trophoblast cells protects against *Listeria monocytogenes* infection during pregnancy [D]. Jilin: Jilin University, 2015
- [5] CDC. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Enoki Mushrooms [EB/OL]. 2020-10-23. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html>.
- [6] Nadja H V, Kim K, Mette B M, et al. *Listeria* meningitis in Danish children 2000-2017: a rare event even in a country with high rates of invasive listeriosis [J]. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2019, 38(10): e274-e276
- [7] 刘正文. 探究动物滥用抗生素的危害与对策[J]. 兽医导刊, 2019, 15: 64
- LIU Zheng-wen. Explore the harm and countermeasures of animal abuse of antibiotics [J]. *Veterinary Orientation*, 2019, 15: 64
- [8] 王红兵, 姜艳霞, 管桂萍, 等. 博落回生物碱作用于微生物的研究进展[J]. 湖南畜牧兽医, 2019, 5: 48-50
- WANG Hong-bing, JIANG Yan-xia, GUAN Gui-ping, et al. Research progress on the effect of *Macleaya* alkaloids on microorganisms [J]. *Hunan Journal of Animal Science & Veterinary Medicine*, 2019, 5: 48-50
- [9] 侯博, 曾建国. 血根碱的生物学活性及博落回提取物在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2018, 30(2): 413-420
- HOU Bo, ZENG Jian-guo. Biological Activities of sanguinarine and application of *Macleaya cordata* extract in animal production [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(2): 413-420
- [10] 王影, 查琳, 杨怀雷, 等. 人参食品研究进展[J]. 人参研究, 2019, 31(5): 54-58
- WANG Ying, CHA Lin, YANG Huai-lei, et al. Research progress of *Panax ginseng* food [J]. *Ginseng Research*, 2019, 31(5): 54-58
- [11] 林红强, 李平亚, 刘金平, 等. 野生西洋参鉴别、化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2157-2162
- LIN Hong-qiang, LI Ya-ping, LIU Jin-ping, et al. Research progress on identification, chemical constituents and pharmacological effects of wild American ginseng [J]. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(12): 2157-2162
- [12] 张海龙. 基于美国专利分析的人/西洋参与三七的研究进展[J]. 中国科技信息, 2018, 22: 15-17
- ZHANG Hai-long. Research progress of human/ American ginseng and *Panax notoginseng* based on American patent analysis [J]. *China Science and Technology Information*, 2018, 22: 15-17
- [13] 闫彤, 石国慧, 吴韶, 等. HPLC 法测定林下山参制浆前后人参皂苷 Re、Rg1、Rb1、Rg3、Rh1、Rh2 含量的变化[J]. 中草药, 2018, 49(17): 4148-4151
- YAN Tong, SHI Guo-hui, WU Shao, et al. Determination of content changes of ginsenoside Re, Rg1, Rb1, Rg3, Rh1, and Rh2 before and after pulping of mountain cultivated ginseng by HPLC [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(17): 4148-4151
- [14] Xue Y, Wen L. RP-HPLC determination of twelve ginsenosides in extract of root and stem leaf from *Panax quinquefolius* L [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2009, 29: 79-81
- [15] Li F L. Pharmacology effect of ginsenosides from stems and leaves of *Panax ginseng* were same like ginsenosides from roots [J]. *Guizhou Agricultural Scientific*, 2013, 41: 54-57
- [16] Qi L W, Wang C Z, Yuan C S. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(8): 689-699
- [17] Pak E K, Choo M K, Kim E J, et al. Antiallergic activity of ginsenoside Rh2 [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(11): 1581-1584
- [18] Gao Q, Zheng J. Ginsenoside Rh2 inhibits prostate cancer cell growth through suppression of micro RNA-4295 that activates CDKN1A [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(3): e12438
- [19] Jin X, Yang Q, Cai N. Preparation of ginsenoside compound-K mixed micelles with improved retention and antitumor efficacy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 3827-3838
- [20] Chen F, Sun Y, Zheng S L, et al. Antitumor and immunomodulatory effects of ginsenoside Rh2 and its octyl ester derivative in H22 tumor-bearing mice [J]. *J Funct Foods*, 2017, 32: 382-390
- [21] Xue P, Yao Y, Yang X S, et al. Improved antimicrobial effect of ginseng extract by heat transformation [J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(2): 180-187
- [22] Zhang F X, Tang S J, Zhao L, et al. Stem-leaves of *Panax* as a rich and sustainable source of less-polar ginsenosides: comparison of ginsenosides from *Panax ginseng*, American ginseng and *Panax notoginseng* prepared by heating and acid treatment [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(1): 163-175

- [23] Li H H, Zhang W M, Gao X X, et al. Study on antimicrobial activity of *Aquilaria sinensis* peel extract [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17: 100-103
- [24] Castillo Y, Tachibana M, Nakatsu Y, et al. Combination of zinc and all-trans retinoic acid promotes protection against *Listeria monocytogenes* infection [J]. PloS One, 2015, 10(9): e0137463
- [25] Iqbal H, Rhee D K. Ginseng alleviates microbial infections of the respiratory tract: a review [J]. J Ginseng Res, 2020, 44(2), 194-204
- [26] Xue P, Yang X S, Zhao L, et al. Relationship between antimicrobial activity and amphipathic structure of ginsenosides [J]. Industrial Crops & Products, 2020, 143: 111929
- [27] 王承龙,史大卓,殷惠军,等.西洋参茎叶总皂苷对急性心肌梗死大鼠心肌 VEGF、bFGF 表达及血管新生的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2007,4:331-334
WANG Cheng-long, SHI Da-zhuo, YIN Hui-jun, et al. Effect of *Panax quinquefolius* saponin on angiogenesis and expressions of VEGF and bFGF in myocardium of rats with acute myocardial infarction [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2007, 4: 331-334
- [28] 郝桂娟,张宾,章样扬,等.壳寡糖锌配合物对氧化衰老模型小鼠的抗氧化作用[J].核农学报,2019,33(6):1156-1164
HAO Gui-juan, ZHANG Bin, ZHANG Yang-yang, et al. Antioxidant effect of chitooligosaccharide-zinc complex on the oxidative aging mice model [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(6): 1156-1164
- [29] Ingersoll M A, Platt A M, Potteaux S, et al. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation [J]. Trends in Immunology, 2011, 32(10): 470-477
- [30] 宋也好,游慧婷,姚于飞,等.鱼腥草多糖对脂多糖诱导大鼠慢性炎症肺损伤的保护作用[J].现代食品科技,2020, 36(6):1-8
SONG Ye-hao, YOU Hui-ting, YAO Yu-fei, et al. Protective effect of *Houttuynia cordata* polysaccharide on LPS induced chronic inflammatory lung injury in rats [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 1-8
- [31] Lu G, Xu L, Zhang P, et al. Betulin efficiently suppresses the process of an experimental *Listeria monocytogenes* infection as an antagonist against listeriolysin O [J]. Fitoterapia, 2019, 139: 104409
- [32] 肖晴,龙敏,刘一帆.卡博替尼抵抗产单核细胞李斯特菌感染的体内实验研究[J].山西医科大学学报,2017,48(12): 1255-1259
XIAO Qing, LONG Min, LIU Yi-fan. Experimental study on cabozantinib against infection caused by *Listeria monocytogenes* in mice [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2017, 48(12): 1255-1259
- [33] Song J L, Qian Y, Li G J. Anti-inflammatory effects of Kudung cha methanol extract (*Ilex kudung* cha C. J. Tseng) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis [J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 8(4): 1256-1262
- [34] 贾军峰,王梦竹,崔一喆,等.脂多糖致炎时间对小鼠血液免疫与肠道组织形态的影响[J].动物营养学报,2018,30(9): 3609-3616
JIA Jun-feng, WANG Meng-zhu, CUI Yi-zhe, et al. Effects of lipopolysaccharide inflammation time on blood immunity and intestinal morphology of mice [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(9): 3609-3616
- [35] Impellizzeri D, Siracusa R, Cordaro M, et al. Therapeutic potential of dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)-induced colitis in mice by targeting IL-1 β and IL-18 [J]. Biochemical Pharmacology, 2018, 155: 150-161
- [36] 李靖,董文学,杨美盼,等. IFN- γ 研究进展与临床应用[J].卫生职业教育,2019,37(23):157-159
LI Jing, DONG Wen-xue, YANG Mei-pan, et al. Research progress and clinical application of IFN- γ [J]. Health Vocational Education, 2019, 37(23): 157-159
- [37] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(1): 32-46
- [38] 印双红,张俊波,龙建明,等. JAK/STAT 通路抑制剂 AG490 对单核细胞增生李斯特菌感染的影响[J].畜牧与兽医, 2019,51(5):94-100
YIN Shuang-hong, ZHANG Jun-bo, LONG Jian-ming, et al. Effects of the JAK/STAT pathway inhibitor AG490 on *Listeria monocytogenes* infection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 51(5): 94-100
- [39] 王建芳. T细胞通过产生 IFN- γ 参与单核细胞增生李斯特菌感染免疫[D].新乡:新乡医学院,2016
WANG Jian-fang. T cells participate in the immune response to *Listeria monocytogenes* infection by producing IFN- γ [D]. Xinxiang: Xinxiang Medical University, 2016
- [40] Xie G, Wang C Z, Yu C, et al. Metabonomic profiling reveals cancer chemopreventive effects of American ginseng on colon carcinogenesis in Apc(Min/+) mice [J]. J Proteome Res, 2015, 14(8): 3336-3347