

王 帆,刘小莉. 植物源化合物肉桂醛对单核细胞增生李斯特氏菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):194-197.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.038

植物源化合物肉桂醛对单核细胞增生 李斯特氏菌的抑制作用

王 帆,刘小莉

(江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014)

摘要:研究了植物源化合物肉桂醛对单核细胞增生李斯特氏菌(*Lm*)的抑制作用。肉桂醛对 *Lm* 的最小抑制浓度和最小杀菌浓度分别为 150、300 $\mu\text{g/mL}$ 。经过肉桂醛处理的 *Lm* 细胞出现菌体细胞变形、膨大的现象,胞外的葡萄糖和核酸含量明显高于对照,胞内蛋白含量降低,说明肉桂醛处理使得 *Lm* 细胞通透性增大,并且抑制了 *Lm* 的蛋白合成。流式细胞仪分析结果显示,最小杀菌浓度的肉桂醛处理 6 h 后,细胞死亡率可达到 95.6%。

关键词:肉桂醛;单核细胞增生李斯特氏菌;抑制作用

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0194-04

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, *Lm*)是一种人畜共患的食源性致病菌,主要存在于水产品、乳品、肉品等动物性食品中,对特定人群(孕妇、新生儿、老人以及免疫缺陷者)的潜在威胁很大,致死率高达 20%~30%^[1-2]。与大多数病原菌不同的是,*Lm* 在低温条件下仍可生长繁殖,在食品加工与贮藏过程中容易造成污染引起食物中毒,随着生活节奏的加快,人们对冷藏以及即食食品的需求比重日益加大,*Lm* 潜在的危险性也逐渐凸显。现有的防控措施中,化学方法可以快速杀菌但也存在安全隐患,因此开发安全高效的新型抑菌剂具有巨大的应用潜力。

肉桂醛(cinnamaldehyde)在自然界主要存在于樟属植物中,工业上通常以化学合成的方法进行制备。它的应用极其广泛,在医药领域被用于抗肿瘤、抗病毒等,在食品领域被用作食用香料以及防腐保鲜剂^[3]。近年研究表明,肉桂醛对 *Lm* 表现出较好的抑制效果^[4-6],但肉桂醛对 *Lm* 的作用机制却很少有报道。本研究探索肉桂醛抑制 *Lm* 的作用机制,为将肉桂醛开发成为新型高效抑菌剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和试剂

Lm CICC21532 采购自中国工业微生物菌种保藏中心,脑心浸液(BHI)培养基采购自北京陆桥公司,肉桂醛采购自国药集团,羧基荧光素二乙酸酯(cFDA)、碘化丙啶(PI)采购自美国 Sigma 公司。

1.2 菌液和药液制备

将 *Lm* 接种于无菌 BHI 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h 至对数期,以 BHI 培养基调整菌液浓度至 1×10^7 CFU/mL 备用。以乙醇作溶剂将肉桂醛配置成浓度为 1×10^5 $\mu\text{g/mL}$ 的母液。

1.3 *Lm* 对肉桂醛的敏感性测定

在 96 孔板上将肉桂醛母液用 BHI 培养基进行梯度稀释,使其作用浓度分别为 0、25、50、75、100、150、200、300 $\mu\text{g/mL}$,菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。采用超微量微孔板分光光度计于 600 nm 测定 96 孔板的吸光度,测定肉桂醛对 *Lm* 的最小抑制浓度(MIC)。在没有浑浊的微孔中接种 50 μL 培养液涂布于 BHI 琼脂培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,测定肉桂醛对 *Lm* 的最小杀菌浓度(MBC)。

1.4 肉桂醛对 *Lm* 细胞形态的影响

Lm 培养至对数期,加入肉桂醛使其作用浓度分别为 MIC 和 MBC,用无菌水作空白对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 处理 6 h 后离心收集菌体,用 0.1 mol/mL pH 值 7.4 的磷酸缓冲液洗涤 3 次,加入 2.5% 戊二醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。菌体采用体积分数为 30%、50%、70%、90%、100% 的乙醇溶液脱水置换,每次

收稿日期:2020-03-19

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(19)2031];江苏省自然科学基金(编号:BK20181242);江苏省农业科学院农产品加工研究所科研基金[编号:JG(2017)05]。

作者简介:王 帆(1983—),女,江苏南京人,硕士,助理研究员,研究方向为食品微生物。E-mail:wangfan713@126.com。

通信作者:刘小莉,博士,研究员,研究方向为食品微生物。E-mail:liuxljas@hotmail.com。

15 min, 脱水后临界点干燥, 将干燥的菌体固定到金属台上, 用离子溅射仪对金属台喷金、镀膜, 扫描电镜观察拍照。

1.5 肉桂醛对 *Lm* 细胞通透性的影响

Lm 培养至对数期, 用无菌磷酸缓冲液 (0.1 mol/mL, pH 值 7.4) 洗涤重悬, 加入肉桂醛使其作用浓度分别为 MIC 和 MBC, 用无菌水作空白对照, 置于 37 °C、120 r/min 条件下培养, 分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 取样, 离心收集上清液, 采用 F006 试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定葡萄糖含量, 260 nm 紫外吸光度反映核酸含量的变化。

1.6 肉桂醛对 *Lm* 细胞蛋白的影响

Lm 培养至对数期, 用无菌磷酸缓冲液 (0.1 mol/mL, pH 值 7.4) 洗涤重悬, 加入肉桂醛使其作用浓度分别为 MIC 和 MBC, 用无菌水作空白对照, 37 °C、120 r/min 处理 6 h, 经细胞破碎仪破碎后离心, 取沉淀加入等体积上样缓冲液混合, 于 100 °C 沸水浴中保温 5 min, 取出冷却至室温后进行 SDS - PAGE 凝胶电泳 (分离胶 12%, 浓缩胶 4%, 电压 120V)。用染色液染色 2 ~ 3 h, 再用脱色液进行处理后观察拍照。

1.7 *Lm* 细胞死亡的测定

Lm 培养至对数期, 用无菌磷酸缓冲液 (0.1 mol/mL, pH 值 7.4) 洗涤重悬, 加入肉桂醛使其作用浓度分别为 MIC 和 MBC, 用无菌水作空白对照, 37 °C、120 r/min 处理 6 h。菌悬液样品加入 cFDA 荧光探针 (终浓度 50 μg/mL), 37 °C 避光装载 10 min, 无菌磷酸缓冲液洗涤后加入 PI 荧光探针 (终浓度 30 μg/mL), 室温避光装载 10 min, 无菌磷酸缓冲液洗涤重悬后进行流式细胞仪分析检测。流式细胞仪激发波长 488 nm, 检测器 FL1 检测波长 525 nm, 检测器 FL3 检测波长 620 nm, cFDA 进入 FL1 荧光通道, PI 进入 FL3 荧光通道, 获取 FL1 - FL3 散点图。

1.8 数据处理与分析

所有试验均进行 3 次重复, 应用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行显著性分析 ($P < 0.05$), Origin 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 *Lm* 对肉桂醛的敏感性测定

Lm 对肉桂醛的敏感性结果见图 1。*Lm* 经肉桂醛处理后生长受到明显的抑制作用, 随着处理浓度

的增大, $D_{600\text{ nm}}$ 逐渐降低, 当浓度达到 150 μg/mL 时, 微孔中观察不到浑浊, 因此肉桂醛对 *Lm* 的 MIC 为 150 μg/mL。在无浑浊的微孔中接种 50 μL 培养液涂布于 BHI 琼脂培养基上, 37 °C 培养 24 h, 完全无细菌生长的最小浓度为 300 μg/mL, 即为肉桂醛对 *Lm* 的 MBC。

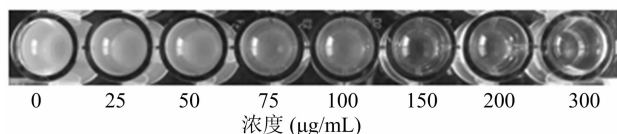
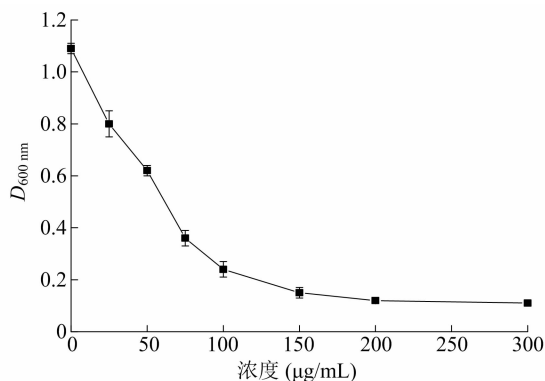


图1 *Lm* 对肉桂醛的敏感性测定

2.2 肉桂醛对 *Lm* 细胞形态的影响

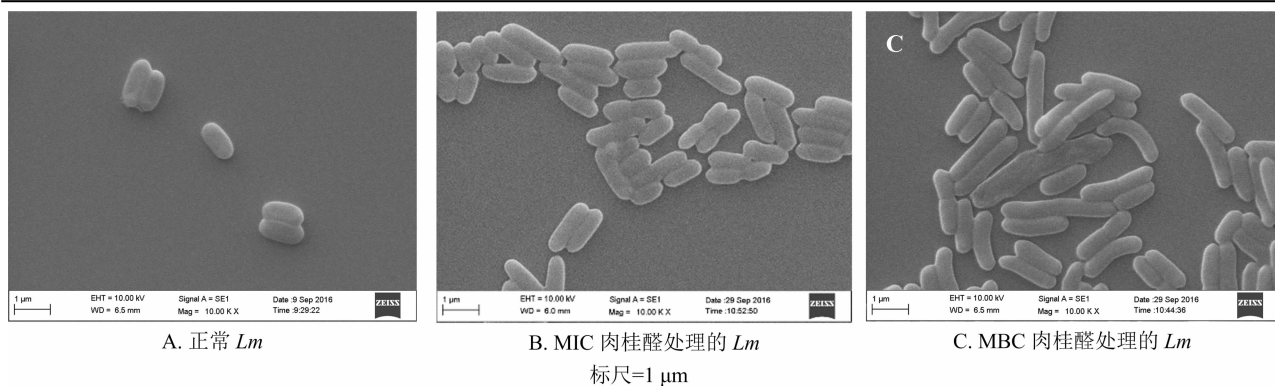
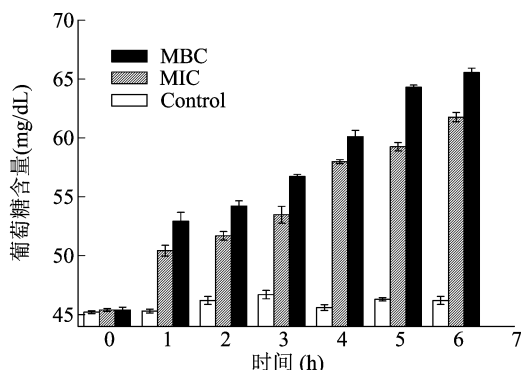
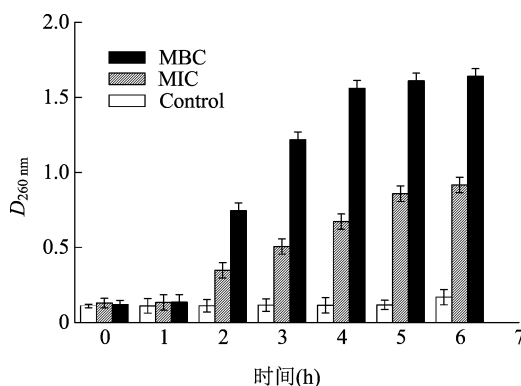
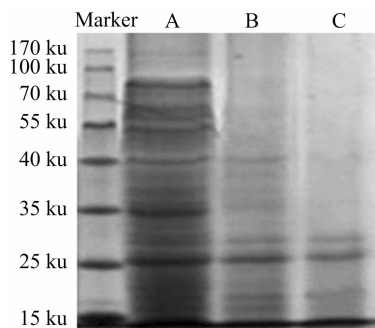
肉桂醛对 *Lm* 细胞形态的影响见图 2。正常 *Lm* 呈短杆状, 菌体形态饱满, 细胞表面光滑。MIC 浓度的肉桂醛处理后, *Lm* 菌体细胞变长, 细胞之间的界限变得模糊。MBC 浓度的肉桂醛处理后, 部分细胞出现变形、膨大的现象。肉桂醛作用后 *Lm* 细胞表面并未观察到明显的凹陷和穿孔。

2.3 肉桂醛对 *Lm* 细胞通透性的影响

核酸中的嘌呤和嘧啶碱基在 260 nm 附近有最大吸收峰, 通过测定 260 nm 处的紫外吸光度可以反映细胞中核酸的泄漏情况^[7]。从图 3、图 4 可以看出, 肉桂醛处理 1 h 后, *Lm* 细胞外的葡萄糖含量明显 ($P < 0.05$) 高于空白对照, 处理 2 h 后, 核酸含量也明显 ($P < 0.05$) 升高, 且含量随着时间和浓度的增加逐渐升高。说明肉桂醛处理导致 *Lm* 细胞的通透性增大, 细胞内的物质向细胞外流失。

2.4 肉桂醛对 *Lm* 细胞蛋白的影响

肉桂醛对 *Lm* 细胞蛋白的影响见图 5, 对分子量在 15 ~ 170 ku 的 *Lm* 细胞蛋白进行 SDS - PAGE 电泳分析, 正常 *Lm* 蛋白电泳条带完整清晰, MIC 肉桂醛处理后, *Lm* 的电泳条带明显变浅, MBC 肉桂醛处理后, 部分条带逐渐缺失, 缺失部分为分子量在 35 ~ 170 ku 之间的蛋白。结果表明, 肉桂醛处理使

图2 肉桂醛对 *Lm* 细胞形态的影响图3 肉桂醛对 *Lm* 细胞外葡萄糖含量的影响图4 肉桂醛对 *Lm* 细胞外核酸含量的影响A—正常 *Lm*; B—MIC 肉桂醛处理的 *Lm*;
C—MBC 肉桂醛处理的 *Lm*图5 肉桂醛对 *Lm* 蛋白的影响

生长受阻死亡;另一方面反映出细胞膜通透性增大导致细胞内蛋白质流失到细胞外,这与“2.3”节的结果趋势一致。

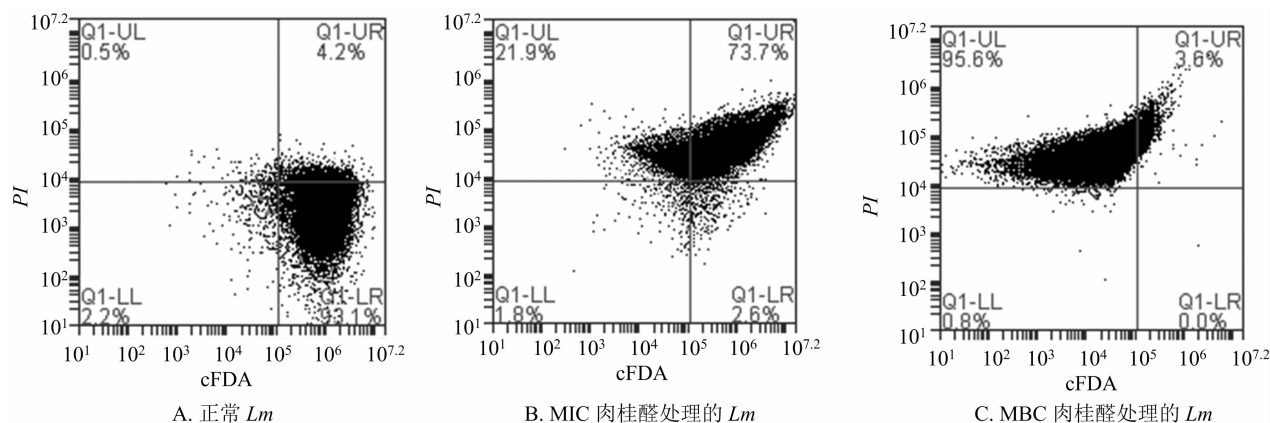
2.5 *Lm* 细胞死亡的测定

cFDA/PI 双染色结果见图 6, cFDA 是一种渗透性染料,自身不发荧光,穿过细胞膜后被细胞内的酯酶水解,释放出绿色荧光的羧基荧光素 cF,非渗透性的 cF 只能保留在具有完整细胞膜的活细胞中,死细胞和细胞膜破损的受伤细胞不能被染色^[8]。PI 不能穿过完整的活细胞膜,只能进入受伤细胞和死细胞破损的细胞膜并与核酸结合发红色荧光,因此 PI 染色可以反映出细胞膜破损和细胞死亡的程度^[9]。采用 cFDA/PI 双染色结合流式细胞仪可以检测菌体活细胞、受伤细胞和死细胞。流式细胞仪 FL1 - FL3 散点图显示 4 类不同的细胞,即 cFDA + /PI - 的活细胞 (Q1 - LR)、cFDA + /PI + 的受伤细胞 (Q1 - UR)、cFDA - /PI + 的死细胞 (Q1 - UL) 以及 cFDA - /PI - 的细胞碎片 (Q1 - LL)^[10]。试验结果表明,正常 *Lm* 大多数细胞处于活细胞状态,所占比例为 93.1%;MIC 肉桂醛处理 6 h 后,活细胞比例降低到 2.6%,细胞受伤率和死亡率分别升高到 73.7% 和 21.9%,大多数细胞处于膜损伤状态,但是细胞内的酯酶仍然具有活性;MBC 肉桂醛处理 6 h 后,细胞死亡率升高到 95.6%,大多数细胞处于死亡状态。

3 结论与讨论

本试验研究了肉桂醛对 *Lm* 的抑制作用。肉桂醛对 *Lm* 的 MIC 和 MBC 分别为 150、300 $\mu\text{g/mL}$ 。扫描电镜结果显示,肉桂醛处理后 *Lm* 出现变形、膨大的现象,细胞表面并未观察到明显的凹陷和穿孔。肉桂醛处理 1 h 和 2 h 后 *Lm* 细胞外的葡萄糖和核酸含量明显高于空白对照,说明肉桂醛处理使得

得 *Lm* 细胞蛋白含量降低,一方面肉桂醛抑制了 *Lm* 的蛋白特别是大分子量蛋白的合成,进而导致菌体

图6 cFDA/PI 双染色结合流式细胞仪检测 *Lm* 细胞死亡

Lm 细胞通透性增大,细胞内的物质向细胞外流失。SDS - PAGE 电泳分析结果表明,肉桂醛处理后 *Lm* 细胞蛋白含量降低,肉桂醛抑制了分子量在 35 ~ 170 ku 之间蛋白的表达。cFDA/PI 双染色结合流式细胞仪检测结果显示,肉桂醛处理后的 *Lm* 活细胞比例降低,细胞受伤率和死亡率升高,MIC 浓度的肉桂醛处理 6 h 后,细胞受伤率升高到 73.7%,MBC 浓度的肉桂醛处理 6 h 后,细胞死亡率达到到 95.6%。综上所述,肉桂醛可对 *Lm* 的细胞形态、细胞膜渗透性造成损伤,并且抑制其大分子量蛋白质的合成。有关肉桂醛抑制 *Lm* 的特异性靶标和分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Hain T, Chatterjee S S, Ghai R, et al. Pathogenomics of *Listeria* spp. [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297 (7/8): 541 - 557.
- [2] Buchanan R L, Gorris L G M, Hayman M M, et al. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose - response, ecology, and risk assessments [J]. Food Control, 2017, 75: 1 - 13.
- [7] Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large - scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nature Protocols, 2011, 6(7): 1060 - 1083.
- [8] Chen X, Qiu L, Guo H, et al. Spermidine induces physiological and biochemical changes in southern highbush blueberry under drought stress [J]. Brazilian Journal of Botany, 2017, 40: 841 - 851.
- [9] Lasanajak Y, Minocha R, Minocha SC, et al. Enhanced flux of substrates into polyamine biosynthesis but not ethylene in tomato fruit engineered with yeast S - adenosylmethionine decarboxylase gene

- [3] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223 - 253.
- [4] Sanla - Ead N, Jangchud A, Chonhenchob V, et al. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose - based packaging films [J]. Packaging Technology and Science, 2012, 25(1): 7 - 17.
- [5] Clemente I, Aznar M, Silva F, et al. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 36: 26 - 33.
- [6] 王帆, 杨静东, 王春梅, 等. 复配植物源杀菌剂的开发研究 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(2): 87 - 89.
- [7] 陆海霞, 黄小鸣, 朱军莉. 超高压对单增李斯特菌细胞膜的损伤和致死机理 [J]. 微生物学报, 2014, 54(7): 746 - 753.
- [8] Ananta E, Heinz V, Knorr D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry [J]. Food Microbiology, 2004, 21: 567 - 577.
- [9] Amor K B, Breeuwer P, Verbaarschot P, et al. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5209 - 5216.
- [10] 叶雷, 陈庆森, 阎亚丽, 等. 流式细胞术快速检测直投式发酵剂菌株活力 [J]. 食品科学, 2014, 35(10): 139 - 144.

[J]. Amino Acids, 2014, 46(3): 729 - 742.

- [10] 陈志远, 赵冠杰, 魏若男. 蓝莓果实发育期内源精胺的 CE - ECL 分析及与保鲜品质的关系 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2356 - 2362.
- [11] Kushad M M, Yelenosky G, Knight R. Interrelationship of polyamine and ethylene biosynthesis during avocado fruit development and ripening [J]. Plant Physiology, 1988, 87(2): 463 - 467.
- [12] 常玉玮, 王国栋. LC - MS 在植物代谢组学分析中的应用 [J]. 生命科学, 2015, 27(5): 978 - 985.
- [13] 孔宏伟, 戴伟东, 许国旺. 基于液相色谱 - 质谱联用的代谢组学研究 中代谢物的结构鉴定进展 [J]. 色谱, 2014, 32(10): 1052 - 1057.

(上接第 152 页)

Bioinformatics, 2017, 18(1): 183 - 196.