

丁酸钠对副溶血性弧菌毒性的影响及机制研究

朱文秀^{1,2}, 柳红莉^{1,2}, 高静竹^{1,2}, 刘佳秀^{1,2}, 夏效东^{1,2*}

(1. 大连工业大学食品学院, 大连 116034; 2. 大连工业大学国家海洋食品工程技术研究中心, 大连 116034)

摘要: **目的** 探究丁酸钠对副溶血性弧菌毒性的影响及机制。**方法** 通过测定丁酸钠对副溶血性弧菌生物膜形成能力及黏附宿主细胞能力, 评估其对副溶血性弧菌毒性的影响; 通过傅里叶变换红外光谱法(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)和拉曼光谱法检测胞外成分变化; 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)测定毒力基因转录水平变化。**结果** 亚致死浓度(sub-inhibitory concentrations, SICs)的丁酸钠基本不影响副溶血性弧菌生长, 但对生物膜形成有显著抑制作用; 丁酸钠处理后, 副溶血性弧菌对 Caco-2 细胞的黏附率分别降低 28%、41%和 61%; FT-IR 和拉曼光谱结果表明丁酸钠能影响副溶血性弧菌脂肪酸及蛋白质疏水性以及降低核酸、碳水化合物和蛋白质的峰面积; RT-qPCR 分析显示 0.500 mg/mL 丁酸钠可显著下调与副溶血性弧菌毒力相关基因的转录表达($P<0.01$)。**结论** 丁酸钠具有一定的抑制副溶血性弧菌毒性的能力, 有用于预防及控制副溶血性弧菌造成的食源性疾病的潜力。

关键词: 副溶血性弧菌; 丁酸钠; 毒力; 基因

Effect and mechanisms of sodium butyrate on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHU Wen-Xiu^{1,2}, LIU Hong-Li^{1,2}, GAO Jing-Zhu^{1,2}, LIU Jia-Xiu^{1,2}, XIA Xiao-Dong^{1,2*}

(1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effect and mechanisms of sodium butyrate on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods** The effect of sodium butyrate on the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* was evaluated by measuring its biofilm formation ability and host cell adhesion ability; Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Raman spectroscopy were used to detect the changes in extracellular components, and the changes in virulence genes expression were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** Sodium butyrate at sub-inhibitory concentrations (SICs) had minimal effect on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*, but had significant inhibitory effects on bacterial biofilm formation; the adhesion rates of *Vibrio parahaemolyticus* to Caco-2 cells were decreased by 28%, 41% and 61% respectively with sodium butyrate treatment under different concentrations. The results of FT-IR and Raman spectroscopy suggested that sodium butyrate could affect the fatty acid, protein, hydrophobicity of *Vibrio parahaemolyticus*, and reduce the peak area of nucleic acid, carbohydrate, and protein; RT-qPCR analysis revealed that 0.500 mg/mL sodium butyrate significantly

基金项目: 辽宁省教育厅自然科学基金项目(J2020044)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation Project of Liaoning Department of Education (J2020044)

*通信作者: 夏效东, 博士, 教授, 主要研究方向为食品中活性物质抗菌及健康功能及应用。E-mail: foodscixiaodong@yahoo.com

*Corresponding author: XIA Xiao-Dong, Ph.D, Professor, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, China. E-mail: foodscixiaodong@yahoo.com

down-regulated transcriptional expression of genes associated with virulence ($P<0.01$). **Conclusion** Sodium butyrate has the ability to inhibit virulence of *Vibrio parahaemolyticus* and has potential to be used in the prevention and control of food-borne diseases caused by *Vibrio parahaemolyticus*.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; sodium butyrate; virulence; gene

0 引言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种广泛存在于海洋环境中的食源性病原菌,属于弧菌科,呈丝状、杆状、弧状等多种形状,有鞭毛,无芽孢,可在固体表面和液体介质中运动^[1-2]。副溶血性弧菌经常可从贝类、虾类和鱼类等多种海产品中分离出来^[3],夏季(7~9月份)海鲜中检出率高达 50%以上^[4]。此外,蛋品、畜禽肉和咸菜等食品中也能检测到副溶血性弧菌^[5]。世界各地已有多起大规模食源性副溶血性弧菌暴发的报道^[6-9]。1950 年,副溶血性弧菌在日本首次被发现并确认为食源性致病菌^[6];2011—2015 年间,韩国副溶血性弧菌感染造成的食源性疾病排名第 4, 占有食源性致病菌的 2.5%^[7];而在美国,副溶血性弧菌是导致海鲜相关感染和死亡的主要原因,平均每年因副溶血性弧菌感染而住院的人占 13.9%,死亡人数占 0.9%^[8];在中国,从 1962 年首次报道副溶血性弧菌后,该菌及其引起的食品安全问题越来越受关注^[10],尤其是沿海城市,由该菌引发的中毒人数更多,如广州市由副溶血性弧菌引发的食品安全问题是所有食源性致病菌引起的食品安全事件中暴发率最高的^[11]。随着社会经济与贸易的发展,不仅沿海城市,内陆地区由该菌造成的食品安全问题也越来越严重^[12]。

副溶血性弧菌对人和动物具有溶血活性、肠毒性和致死性^[13]。食用生的或未加工熟的海鲜,特别是贝类极易引发副溶血性弧菌感染,感染症状主要表现为腹泻、头痛、呕吐、恶心、腹部痉挛、发烧等,严重者甚至引起败血症、休克等^[14],发病潜伏期大约为 1~4 d,大多为 10 h 左右^[15]。急性肠胃炎症状是副溶血性弧菌感染最常见的临床表现,其占有细菌性食物中毒的 38.9%,居于首位^[16]。

副溶血性弧菌的致病性与其毒力因子密切相关。III 型分泌系统(type 3 secretion systems, T3SS)、VI 型分泌系统(type 6 secretion systems, T6SS)、溶血素和黏附因子是副溶血性弧菌主要的毒力因子^[17]。副溶血性弧菌可以传递 T3SS 效应物,它侵入肠上皮细胞或与肠上皮细胞密切相互作用,引发细胞毒性^[18]。副溶血性弧菌还能在聚氨酯、玻璃、不锈钢等食品加工设备表面形成生物膜^[19],形成生物膜后,副溶血性弧菌对不利环境的抵抗能力增强,不仅污染食品和加工设备,还使得消毒剂等抵抗物质难以进入膜内发挥作用,对食品行业的安全构成持续危害。

丁酸钠($C_4H_7NaO_2$)是一种结构简单的短链脂肪酸盐,为

白色或类白色粉末,易溶于水。丁酸钠在高纤维饮食的人肠道中含量丰富,对维持肠上皮的动态平衡发挥着重要作用^[20]。丁酸是丁酸盐的有效成分,丁酸同时具有亲水性和亲油性,可透过细菌的细胞膜,降低胞内 pH,从而达到抑制病原菌的作用^[21-22]。丁酸钠在实际生活中使用范围广泛,包括化妆品、食品、养殖、饲料、医药等,可作为食品中的调味剂、香味剂、诱食剂、复合酸化剂、胃肠道平衡调节剂等^[23]。

基于前期有关丁酸钠对副溶血性弧菌的抑制作用及其机制的初步研究^[24],本研究拟通过体外实验探究丁酸钠对副溶血性弧菌生物膜形成、细胞黏附能力的影响,并从细胞表面成分以及毒力因子表达的角度深入分析丁酸钠对副溶血性弧菌毒力的影响及其机制,为利用丁酸盐控制食品中的副溶血性弧菌污染奠定理论基础,也为预防及控制副溶血性弧菌造成的食源性疾病提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802(美国模式菌株收集中心);人克隆结肠癌腺细胞(Caco-2 细胞,中科院上海细胞库);结晶紫(纯度>90%)、丁酸钠(纯度≥98%)[阿拉丁试剂(上海)有限公司];胰蛋白胨大豆肉汤(trypsin casein soy broth, TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(trypsin casein soy agar, TSA)(青岛海博生物有限公司);杜氏培养液(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基、胰蛋白酶乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)消化液(0.25%胰酶, Gibco 北京宝希迪有限公司);RNA 柱式提取试剂盒、Evo M-MLV RT 试剂盒、SYBR Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒(湖南艾科瑞生物有限公司);琼脂糖、磷酸盐缓冲液缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(上海生工生物工程有限公司);曲拉通 Triton X-100(上海麦克林生化科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

ZXMP-A1150 恒温恒湿培养箱、IS09001 摇床(上海智城分析仪器制造有限公司仪器);Infinite F200 PRO 荧光酶标仪(瑞士 Tecan Infinite 公司);UV-5100B 紫外分光光度计(上海元析仪器分析有限公司);BSO 生物安全柜(苏州安泰技术公司);Thermo 冷冻离心机、ND-ONE 微量核酸定量仪(赛默飞世尔科技有限公司);MyCycler 实时荧光定量 PCR 仪(德国耶拿有限公司);Spetrum two 傅里叶红外光谱(珀金埃尔默仪器有限公司);LDZX-30KBS 高压灭菌锅(上海申

安医疗器械厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 活化菌株

将-80℃冰箱中冻存的副溶血性弧菌在含有3% NaCl的 TSA 培养基上划线进行活化,经过37℃过夜培养,挑菌落于含3% NaCl的 TSB 中接种,37℃,160 r/min 振荡培养至对数期。5000 g,4℃离心5 min,弃上清,生理盐水洗菌体3次并重悬,调整悬液到 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$ (浓度为 10^8 CFU/mL左右)。

1.3.2 细胞培养

Caco-2 细胞在含20%血清的 DMEM 全培养液中培养(1%的三抗),日常的细胞培养和实验培养条件为37℃、5% CO₂。当细胞量为85%左右,PBS洗3次,胰蛋白酶消化1 min,加入全培养液终止消化,Caco-2 细胞以1:2的比例重新接种。

1.3.3 副溶血性弧菌生长和生物膜形成的测定

按1.3.1所述制备菌悬液,使用无菌3% NaCl的 TSB 清洗菌体,菌液调到 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$,把菌液稀释1000倍(10^5 CFU/mL)。为了评估丁酸钠对浮游细菌生长的影响,加入100 μL 菌液和丁酸钠溶液到孔板中,充分混匀,在37℃下孵育24 h后,使用酶标仪测量600 nm 处的光密度。实验选择对副溶血性弧菌抑制最小或不抑制其生长的3个最高浓度作为本研究中的丁酸钠对副溶血性弧菌的亚致死浓度(sub-inhibitory concentrations, SICs),用于后续实验分析。

参考结晶紫染色法^[25]并稍作修改,考查丁酸钠对副溶血性弧菌生物膜形成的影响,按照1.3.1活化菌株后,调整菌悬液到 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$,并接种在96孔微量滴定板,在含不同质量浓度的丁酸钠(0、0.125、0.250、0.500 mg/mL)培养液中,30℃下培养平板72 h。吸走培养液,并使用无菌 PBS 缓慢清洗每个孔2次,洗去浮游菌体,干燥30 min。200 μL 结晶紫溶液(0.1%)加入到孔板中,室温下染色20 min。吸走结晶紫溶液,PBS清洗3次,干燥30 min。33%的冰乙酸溶液加入于孔板中,放置于脱色摇床上20 min 溶解。最后,使用酶标仪测量孔板在 $OD_{570\text{ nm}}$ 的吸光度。生物膜抑制计算方式为:抑制率(%)=[(对照 $OD_{570\text{ nm}}$ -测试 $OD_{570\text{ nm}}$)/对照 $OD_{570\text{ nm}}$] $\times 100$ 。

1.3.4 丁酸钠对副溶血性弧菌黏附 Caco-2 细胞能力的影响

参照 MIAO 等^[26]的方法,考查丁酸钠对副溶血性弧菌黏附 Caco-2 细胞的影响。Caco-2 细胞如1.3.2描述培养完成后,胰酶消化,含20%血清的 DMEM 调整至 1×10^5 个细胞/mL,接种到48孔板中,每个孔中铺500 μL 的悬液。37℃、5% CO₂培养24 h之后,PBS 轻缓清洗细胞2次。如1.3.1所述制备菌液,使用 PBS 清洗菌悬液2次(5000 g,5 min,4℃),调整悬液到 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$ 。终质量浓度为0.125、0.250、0.500 mg/mL 的丁酸钠溶液处理副溶血性弧菌,37℃,160 r/min 培养至对数中期,以不含丁酸钠溶液的组作为对

照组。将处理后的菌悬液用 PBS 进行清洗(5000 g,5 min,4℃),随后用无血清的 DMEM 纯培养液把菌悬液密度稀释至 10^6 CFU/mL。将500 μL 的菌悬液加入到48孔板中,把孔板放置在37℃,5% CO₂培养箱中培养1 h,用移液器吸走每个孔的液体并使用 PBS 清洗3次。随后向48孔板每孔中加入0.1%的 Triton-100,把孔板放置4℃冰箱裂解20 min,裂解后,充分吹打每个孔中的液体,将孔中的液体用 PBS 进行系列10倍稀释,涂布在含有3% NaCl的 TSA 培养基表面,37℃过夜培养后进行计数。结果以黏附率表示,黏附率的计算为:黏附率(%)=(丁酸钠处理过后的黏附 Caco-2 细胞的菌落总数/对照组的黏附 Caco-2 细胞菌落总数) $\times 100\%$ 。

1.3.5 傅里叶红外光谱分析丁酸钠处理前后副溶血性弧菌成分变化

按照1.3.1描述制备菌悬液,使用 PBS 清洗菌体2次(5000 g,5 min,4℃),调整悬液到 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$ 。参考 PADMAVATHI 等^[27]的方法,并稍作修改,采用傅里叶红外光谱法(Fourier transform infrared spectrometry, FT-IR)对丁酸钠处理的副溶血性弧菌成分变化进行测定。使用终质量浓度为0.125、0.250、0.500 mg/mL 的丁酸钠溶液在37℃,160 r/min 条件下处理副溶血性弧菌到对数中期,没有用丁酸钠处理的样品为对照组。培养后,将混合液在5000 g 4℃,离心5 min,并使用 PBS 进行重悬3次,再次离心后放到-80℃冰箱进行冷冻,冷冻凝固后放到冻干机冻成粉末。最后,将冻干的粉末样品与事先在马沸炉高温烘干的溴化钾(KBr)粉末在干燥的条件下按100:1的质量比进行充分混匀,反复多次研磨成细腻的粉末,并用压片机将混合物制备成圆形的薄膜压入到仪器中,并在4000~400 cm⁻¹波长范围内以4 cm⁻¹的红外光谱分辨率进行扫描,KBr 粉末未用作背景参考。

1.3.6 拉曼光谱分析丁酸钠处理前后副溶血性弧菌成分变化

按照1.3.1描述制备菌悬液,使用 PBS 清洗菌体2次(5000 g,5 min,4℃),调整悬液到 $OD_{600\text{ nm}}=0.5$ 。参考 MAQUELIN 等^[28]的方法,并稍作修改,采用拉曼光谱法对丁酸钠处理副溶血性弧菌成分变化进行测定。使用终质量浓度为0.125、0.250、0.500 mg/mL 的丁酸钠溶液在37℃,160 r/min 条件下处理副溶血性弧菌。培养后,将混合液在5000 g,5 min,4℃条件下离心,将上清液滴入液体坩埚中,随后将液体坩埚置于载玻片上,放在自动 XY 载物台上,定制设计的近红外优化显微镜物镜进行扫描。在显微扫描阶段,通过物镜将532 nm 激光源聚焦到样品上,电荷耦合器件(charge-coupled device, CCD)阵列探测器用于检测拉曼散射信号,从2700~200 cm⁻¹的波数移位范围收集拉曼光谱。

1.3.7 丁酸钠对副溶血性弧菌相关毒力基因表达的影响

按照1.3.1描述制备菌悬液,使用 PBS 清洗菌体2次

(5000 g, 5 min, 4 °C), 调整悬液到 OD_{600 nm}=0.5。使用终质量浓度为 0.125、0.250、0.500 mg/mL 的丁酸钠溶液处理副溶血性弧菌, 在 37 °C, 160 r/min 条件下培养至对数中期, 提取 RNA, 以 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 衡量 RNA 的浓度和纯度。把 RNA 的浓度调到一致, 利用 Evo M-MLV RT 试剂盒把 RNA 反转录成 cDNA, 随后进行扩增, 程序为: 95 °C, 30 s, 1 个循环, 95 °C, 5 s, 55 °C, 30 s, 40 个循环, 95 °C, 15 s 和 60 °C, 30 s。用于逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)的引物序列见表 1, 结果采用 2^{-ΔΔCt} 的计算方法。

表 1 RT-qPCR 与毒力相关的引物信息	
Table 1 Information of primers related to virulence for RT-qPCR	
目标基因名称	引物序列(5'-3')
puvA	F: CAAACTCACTCAGACTCCA
	R: CGAACCGATTCAACACG
vopQ	F: CCACAAGTTTGCTTCGGTTAG
	R: GGTTCTCCTCGGTAGCCTGA
tolC	F: CGCAACTCGTCGCCTAT
	R: TGTCTTGTTTCGCTTAGTGACCA
toxR	F: ACAATGACGCCCTCTGCTAAT
	R: ACTCACCAATCTGACGGAAGT
vpA0450	F: TTGCTGAAGGCTCTGATG
	R: CTGCACTGGCTTATGGTC

1.3.8 统计分析
实验至少进行 3 次重复。数据以平均值±标准偏差表示, 使用 SPSS 19.0 软件处理实验数据, 结果采用 t 检验进行分析。*P<0.05 为差异显著和**P<0.01 为差异极显著。

2 结果与分析

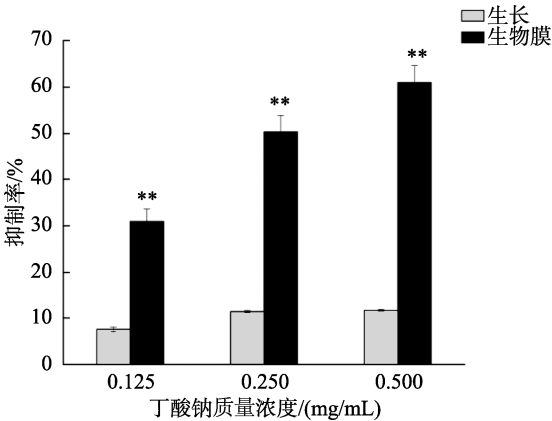
2.1 丁酸钠对副溶血性弧菌生物膜形成的影响

丁酸钠对副溶血性弧菌生物膜的影响如图 1 所示。在选取的 3 个浓度下丁酸钠对副溶血性弧菌的生长没有显著抑制作用(P>0.05), 因此本研究中 0.125、0.250 和 0.500 mg/mL 为丁酸钠对副溶血性弧菌的亚致死浓度(SICs)。另一方面, 丁酸钠在不影响细菌生长浓度的条件下仍能显著降低生物膜的形成量, 以对照组为参考, 0.125、0.250、0.500 mg/mL 丁酸钠对生物膜的抑制率分别为 31%、50%、61%。由此可见, 在丁酸钠的 SICs 处理下, 副溶血性弧菌生物膜的减少可能是由于丁酸钠的抗生物膜潜力, 而不是通过抑制细菌的生长来实现。

2.2 丁酸钠对副溶血性弧菌黏附 Caco-2 细胞的影响

如图 2 所示, 0.125、0.250、0.500 mg/mL 丁酸钠处理副溶血性弧菌后, 副溶血性弧菌的黏附率显著降低, 分别比对照组降低了 28%、41%和 61%。致病菌造成感染的途径之一就是黏附于宿主细胞, 本研究证实 SICs 的丁酸钠可

以减轻副溶血性弧菌对 Caco-2 的黏附作用。此结果与其他抗菌物质抗黏附作用结果类似, 如 UPADHYAYA 等^[29]报道的有关丁香酚、香芹酚和麝香草酚可以降低沙门氏菌对鸡输卵管上皮细胞的黏附作用。



注: **P<0.01 表示与对照组相比, 差异极显著, 下同。
图 1 丁酸钠对副溶血性弧菌生长和生物膜形成的影响
Fig.1 Effects of sodium butyrate on the planktonic growth and biofilm biomass of *V. parahaemolyticus*

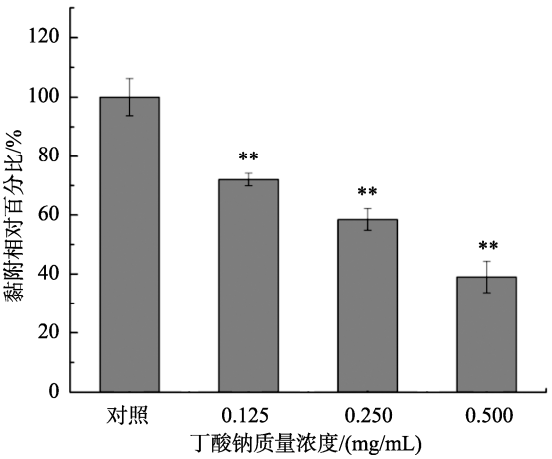


图 2 丁酸钠对副溶血性弧菌黏附 Caco-2 细胞的影响
Fig.2 Effects of sodium butyrate on the adhesion ability of Caco-2 cells to *V. parahaemolyticus*

2.3 红外光谱结果分析

通过 FT-IR 测定生物表面活性分子的结构和化学组成(官能团)。如图 3 所示, FT-IR 光谱显示对照组副溶血性弧菌和丁酸钠处理副溶血性弧菌之间存在差异, 两者在 3700~3200、3050~2850、1700~1600 cm⁻¹ 等区域有较大的吸收, 分别代表着细菌水合、细胞膜中的脂肪酸、蛋白质和多肽的酰胺键(1700~1600 cm⁻¹)。比较 FT-IR 光谱发现, 在 3700~3200 cm⁻¹ 区域内观察到较宽的吸收带, 而且这个范围内丁酸钠处理组和对照组变化最大, 对应于-OH 基团, 表明细菌细胞发生了水合作用; 对照组与丁酸钠处理组在

3050~2850 cm^{-1} 没有明显变化, 这个区域对应于膜脂肪酸链上 CH_3 和 CH_2 官能团的 C-H 伸缩振动; 与对照组相比, 在 1700~1600 cm^{-1} 区域内可以观察到处理组的峰强降低, 这代表蛋白质和多肽的酰胺键由 CO-N 拉伸引起的振动。综上, 丁酸钠处理的副溶血性弧菌在脂肪酸及蛋白质疏水性方面发生了改变。

NITHYANAND 等^[30]的研究表明, 松萝酸可以减少蛋白质和多糖的信号区域, 并破坏链球菌的细胞膜。在本研究中更明显地观察到细菌水合作用(3700~3200 cm^{-1})、蛋白质(1500~1700 cm^{-1})和多糖(1200~900 cm^{-1})区域的峰变化, 细菌水合作用的变化会影响疏水性、黏附性和生物膜的发育。

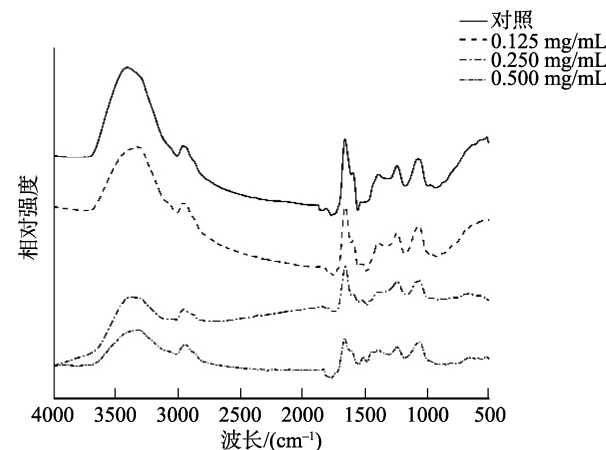


图 3 对照组和丁酸钠处理组的副溶血性弧菌的红外光谱图
Fig.3 FT-IR spectrogram of *V. parahaemolyticus* control group and sodium butyrate treated groups

2.4 拉曼光谱结果分析

拉曼光谱是一种振动光谱技术, 被认为是研究微生物、细胞和生物样品的有力技术, 脂质、蛋白质、碳水化

合物和其他生物学相关分子可以表现出独特的光谱特征。本研究采用拉曼光谱法测定 SICs 的丁酸钠处理前后的副溶血性弧菌的生化成分变化。图 4A 为对照组副溶血性弧菌的拉曼光谱特征。844、1038 和 1643 cm^{-1} 处的主要峰可能是核酸、碳水化合物和蛋白质。844 cm^{-1} 处对应于 DNA 的拉曼强度降低是由于 DNA 环结构的破坏, 表明 DNA 降解; 在 1038 cm^{-1} 处的条带为碳水化合物的 C-C 拉伸; 1327 cm^{-1} 左右处强度较小, 表示 C-H 键的变形带; 酰胺带(酰胺 III)对蛋白质二级结构敏感, 在 1227 cm^{-1} 处, 酰胺 III 来源于耦合的 C-N 拉伸和 N-H 弯曲模式; 另一条比较明显的条带是在 1643 cm^{-1} 处, 与蛋白质相关, 对酰胺 I 的主要贡献来自羰基的 C=O 拉伸模式^[31]。如图 4B 所示, 与对照组相比, 丁酸钠处理后与核酸、碳水化合物和蛋白质相关的条带强度明显降低, 844 和 1643 cm^{-1} 处的峰强随丁酸钠浓度的升高而降低, 在 844 cm^{-1} 处随丁酸钠浓度升高峰强依次降低 24%、36%和 53%。相似地, 1643 cm^{-1} 处, 随丁酸钠浓度升高峰强依次降低。丁酸钠的浓度越高, 拉曼谱图的峰值降低越大, 甚至用 0.5 mg/mL 的丁酸钠处理的副溶血性弧菌在 1643 cm^{-1} 的峰值强度也比对照组降低 63%。由此可见, SICs 的丁酸钠处理能影响副溶血性弧菌的生化成分及细菌的水合作用。

2.5 丁酸钠对副溶血性弧菌相关毒力基因表达的影响

丁酸钠处理前后, 副溶血性弧菌相关毒力基因表达如表 2 所示。表 2 为膜转录激活因子基因(*toxR*)、膜蛋白相关基因(*tolC*)和毒性因子基因(*vopQ*, *vpA0450*)的相对转录表达水平。由表 2 可知, 丁酸钠处理后可在不同程度下调副溶血性弧菌的相关毒力基因的转录水平。0.500 mg/mL 丁酸钠处理可将毒性因子 *vopQ*、*vpA0450*、*toxR* 和 *tolC* 基因的转录水平下调 50%、66%、86%和 61%。

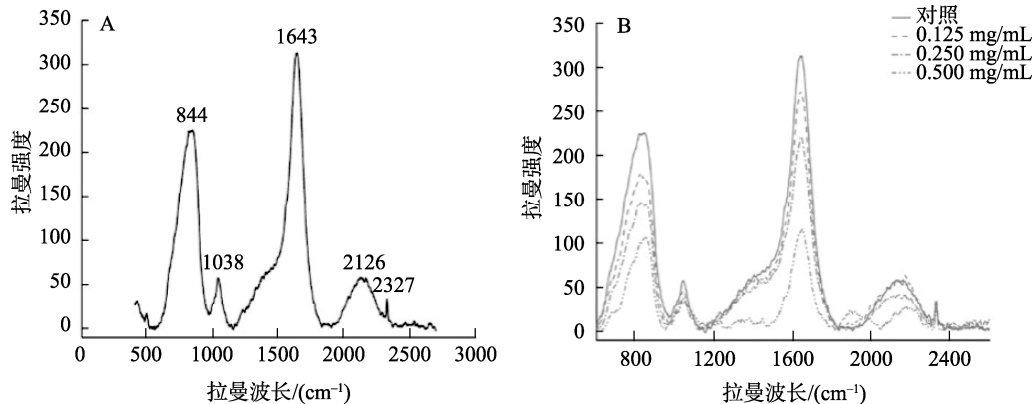


图 4 丁酸钠处理前(A)后(B)的副溶血性弧菌的拉曼光谱图
Fig.4 Raman spectroscopy of *V. parahaemolyticus* before (A) and after (B) treated with sodium butyrate

副溶血性弧菌可以编码一系列的毒力因子,包括耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)、耐热直接相关溶血素(TDH-related hemolysin, TRH)和 T3SS 等。本研究通过检测副溶血性弧菌中常见的毒力因子,进一步探究丁酸钠对副溶血性弧菌毒力影响。*VopQ* 在靶细胞中引起快速的自噬诱导,而 *vpA0450* 通过干扰肌动蛋白细胞骨架和细胞膜之间的联系来破坏细胞的稳定^[32]。*ToxR* 协同调节几个毒力相关基因,包括霍乱弧菌的 *tcp* 基因(毒素共调节菌毛)和 *ompU* 和 *ompT* 基因(主要外膜蛋白)^[33]。此外, *ToxR* 可直接促进 *tdh2* 的表达,导致神奈川现象阳性毒株的产生。TDH 是一种蛋白毒素,具有多种生物学功能,包括溶血、肠毒素和细胞毒活性。本研究显示,0.500 mg/mL 丁酸钠可有效下调副溶血性弧菌 *toxR* 的转录表达水平。

表 2 RT-qPCR 与毒力相关的基因的转录表达
Table 2 Effects of sodium butyrate on virulence-associated gene transcriptional expression in *V. parahaemolyticus*

目标基因	相对基因表达	
	0.125 mg/mL 丁酸钠	0.500 mg/mL 丁酸钠
<i>puvA</i>	1	1
<i>vopQ</i>	-1.41±0.50**	-2.00±0.82**
<i>tolC</i>	-1.40±0.79	-2.60±0.86**
<i>toxR</i>	-2.62±0.86**	-6.95±1.13**
<i>vpA0450</i>	-2.08±0.28**	-2.98±0.84**

注: ***P*<0.01 表示与对照组相比,差异极显著。

3 结 论

丁酸钠具有一定的抑制副溶血性弧菌生物膜形成的能力。红外光谱和拉曼光谱均表明 SICs 的丁酸钠处理能影响副溶血性弧菌的生化成分及细菌的水合作用。丁酸钠能降低副溶血性弧菌对 Caco-2 细胞的黏附能力,并下调毒力相关基因的转录表达。综上,丁酸钠有潜力用于控制副溶血性弧菌在食品及食品产业链中的污染,但将其真正用于食品体系之前还需要对其有效剂量及其实际应用效果展开更多的研究。

参考文献

[1] HARSHEY RM. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 249–273.
[2] 赵宏群,刁保卫,杜小莉,等. 副溶血性弧菌分子分型数据库建立与分析[J]. *疾病监测*, 2016, 31(11): 920–924.
ZHAO HQ, DIAO BW, DU XL, *et al*. Establishment of molecular typing database for *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Dis Surveill*, 2016, 31(11): 920–924.
[3] LISTON J. Microbial hazards of seafood consumption [J]. *Food Technol*, 1990, 44(12): 58–62.

[4] 张俊彦,梅玲玲,朱敏,等. 301 份海水产品副溶血性弧菌定量检测分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(3): 509–510.
ZHANG JY, MEI LL, ZHU M, *et al*. Quantitative inspection and analysis *Vibrio parahaemolyticus* contamination in 301 sea foods [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, 17(3): 509–510.
[5] PANG R, XIE TF, WU QP, *et al*. Comparative genomic analysis reveals the potential risk of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from ready-to-eat foods in China [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 186–195.
[6] LETCHUMANAN V, CHAN KG, LEE LH. *Vibrio parahaemolyticus*: A review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 705–717.
[7] LEE MJ, SONG KY, LEE WC, *et al*. Epidemiological aspects of pathogenic microbial foodborne disease outbreaks in Korea and Japan, 1999–2004 [J]. *Korean J Orthod*, 2007, 33(3): 184–189.
[8] ELMAHDI S, DASILVA LV, PARVEEN S, *et al*. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review [J]. *Food Microbiol*, 2016, 57: 128–134.
[9] BAKER AC, TRINANES J, GONZALEZ EN, *et al*. Non-Cholera *Vibrios*: The microbial barometer of climate change [J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(1): 76–84.
[10] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992–2001 年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病监测网[J]. *卫生研究*, 2004, 33(6): 725–727.
LIU XM, CHEN Y, WANG XY, *et al*. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001-National foodborne disease surveillance system [J]. *J Hyg Res*, 2004, 33(6): 725–727.
[11] 黄志深,许喜林,张明明,等. 市售水产品中副溶血性弧菌的毒力及药敏性分析[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(8): 1–9.
HUANG ZS, XU XL, ZHANG MM, *et al*. Analysis of virulence and drug sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(8): 1–9.
[12] 贺羽,王帅,尹婷婷,等. 副溶血性弧菌毒性相关因子及其外分泌蛋白的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(9): 340–347.
HE Y, WANG S, YIN XT, *et al*. Progress of virulence factors and secreted proteins in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(9): 340–347.
[13] CHUNG CH, FEN SY, YU SC, *et al*. Influence of *oxyR* on growth, biofilm formation, and mobility of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(3): 788–796.
[14] 时晨,于良,王悦,等. 秦皇岛市一起由副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发事件的检测和溯源分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(9): 3503–3507.
SHI C, YU L, WANG Y, *et al*. Detection and traceability analysis of a foodborne disease outbreak caused by *Vibrio parahaemolyticus* in Qinhuangdao city [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(9): 3503–3507.
[15] 张德福,付绪磊,张明,等. 副溶血性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 DF, FU XL, ZHANG M, *et al*. Recent progress in research on *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors and pathogenic mechanism [J]. *Food Sci*, 2015, 36(7): 216–222.
[16] 余淑军. 一起因副溶血性弧菌污染引发的食源性疾病事件流行病学调查报告[J]. *中国当代医药*, 2020, 27(18): 174–178.
YU SJ. An epidemiological investigation report on a foodborne disease event caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Chin Mod Med*, 2020, 27(18): 174–178.

- 174–178.
- [17] LI L, MENG H, GU D, *et al.* Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis [J]. Microbiol Res, 2019, 222: 43–51.
- [18] MAKINO K, OSHIMA K, KUROKAWA K, *et al.* Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: A pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholera* [J]. Lancet, 2003, 361(9359): 743–749.
- [19] AWAD TS, ASKER D, HATTON BD. Food-safe modification of stainless steel food-processing surfaces to reduce bacterial biofilms [J]. ACS Appl Mater Inter, 2018, 10(27): 22902–22912.
- [20] NAZANIN AKS, MOHAMMAD MM, JAMSHID H, *et al.* Sodium butyrate as a histone deacetylase inhibitor affects toll-like receptor 4 expression in colorectal cancer cell lines [J]. Immunol Invest, 2019, 48(7): 1–11.
- [21] SUN W, SUN J, LI M, *et al.* The effects of dietary sodium butyrate supplementation on the growth performance, carcass traits and intestinal microbiota of growing-finishing pigs [J]. J Appl Microbiol, 2020, 128: 1613–1623.
- [22] RDACA B, ALRA A, VSP A, *et al.* Sodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp. [J]. Microb Pathogenesis, 2019, 130: 219–225.
- [23] 郑瑞耕. 丁酸钠对淡水鱼类生长性能及肠粘膜结构的影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- ZHENG RG. The effect of sodium butyrate on the growth performance and intestinal mucous structure of flesh water fish [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2008.
- [24] ZHU WX, GAO JZ, LIU HL, *et al.* Antibiofilm effect of sodium butyrate against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Control, 2022. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108422
- [25] BAI JR, ZHONG K, WU YP, *et al.* Antibiofilm activity of shikimic acid against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2019, 95: 327–333.
- [26] MIAO X, LIU H, ZHENG Y, *et al.* Inhibitory effect of thymoquinone on *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 biofilm formation and virulence attributes critical for human infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 304–310.
- [27] PADMAVATHI AR, ABINAYA B, PANDIAN SK. Phenol 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens* [J]. Biofouling, 2014, 30(9): 1111–1122.
- [28] MAQUELIN K, HOOGENBOEZEM T, JACHTENBERG JW, *et al.* Raman spectroscopic typing reveals the presence of carotenoids in *Mycoplasma pneumonia* [J]. Microbiology, 2009, 155(6): 2068–2077.
- [29] UPADHYAYA I, UPADHYAY A, KOLLANOOR JA, *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]. Int J Mol Sci, 2013, 14(5): 10608–10625.
- [30] NITHYANAND P, BEEMA RM, MUTHAMIL S, *et al.* Usnic acid, a lichen secondary metabolite inhibits group A *Streptococcus* biofilms [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 107(1): 263–272.
- [31] SCHWARTZ T, JUNGFER C, HEISLERS, *et al.* Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectrometry, and ESEM imaging to study natural biofilms grown on filter materials at waterworks [J]. Chemosphere, 2009, 77(2): 249–257.
- [32] ZHANG L, ORTH K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(1): 70–77.
- [33] CHILDERS BM, KLOSE KE, *et al.* Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: The *toxR* regulon [J]. Future Microbiol, 2007, 2(3): 335–344.

(责任编辑: 郑 丽 张晓寒)

作者简介



朱文秀, 硕士研究生, 主要研究方向为食品中活性物质抗菌。
E-mail: 1027574669@qq.com



夏效东, 博士, 教授, 主要研究方向为食品中活性物质抗菌及健康功能及应用。
E-mail: foodscixiaodong@yahoo.com