



植物乳杆菌后生元缓解小鼠沙门氏菌感染的作用效果及机理

舒鑫¹, 黄雯霞¹, 马世越¹, 刘金松³, 杨彩梅¹, 张瑞强¹, 肖肖¹, 吴艳萍^{1,2,3*}

1 浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 浙江 杭州 311300

2 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095

3 浙江惠嘉生物科技股份有限公司, 浙江 湖州 313300

舒鑫, 黄雯霞, 马世越, 刘金松, 杨彩梅, 张瑞强, 肖肖, 吴艳萍. 植物乳杆菌后生元缓解小鼠沙门氏菌感染的作用效果及机理[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1095-1109.

SHU Xin, HUANG Wenxia, MA Shiyue, LIU Jinsong, YANG Caimei, ZHANG Ruiqiang, XIAO Xiao, WU Yanping. Effects and mechanism of *Lactobacillus plantarum* postbiotics on protecting against *Salmonella enterica* Typhimurium infection in mice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1095-1109.

摘要: 【目的】研究不同剂量的植物乳杆菌后生元缓解小鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella enterica* Typhimurium, ST)感染的作用效果及分子机制。【方法】选择 60 只 5 周龄的 C57BL/6 小鼠, 分为 5 组: Control、ST、CFS-L+ST、CFS-M+ST 和 CFS-H+ST, 后三组分别灌胃低、中、高剂量植物乳杆菌后生元, 即 50、100 和 200 μ L 的无细胞培养上清(cell-free culture supernatant, CFS)预处理 21 d, 然后在第 22 天灌胃 3×10^8 CFU ST 进行攻毒, 3 d 后采样。【结果】与对照组相比, 饲喂低、中剂量 CFS 小鼠体重增长无明显变化, 而高剂量组体重显著降低($P < 0.05$)。中、高剂量 CFS 预处理组可显著缓解沙门氏菌感染引起的小鼠体重损失($P < 0.05$); 饲喂 3 种剂量的 CFS 均可显著降低 ST 在小鼠肝脏、脾脏、结肠和脑组织的细菌移位数量($P < 0.05$), 并缓解结肠和脾脏病理损伤。ST 攻毒显著降低盲肠乙酸和丁酸含量, 而中剂量 CFS 预处理组具改善趋势, 但差异不显著($P > 0.05$)。与 ST 组相比, 预饲中剂量 CFS 可通过显著降低促炎因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平($P < 0.05$), 以及显著升高抑炎因子白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)和白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)

资助项目: 中国博士后科学基金(2022M711659); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2022C02043); 国家自然科学基金(32002212)

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (2022M711659), The Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2022C02043), and the National Natural Science Foundation of China (32002212).

*Corresponding author. E-mail: ypwu@zafu.edu.cn

Received: 2023-09-28; Accepted: 2023-12-20; Published online: 2024-01-04

水平($P<0.05$)缓解炎症反应。进一步研究发现,与 ST 组相比,CFS-M+ST 组热蛋白结构域相关蛋白 3 [nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3]炎症小体关键基因 *NLRP3*、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、半胱氨酸蛋白酶(caspase-1)和细胞死亡调节蛋白(gasdermin D, GSDMD)的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$),其上游核因子- κ B (nuclear factor kappa beta, NF- κ B)通路中关键分子髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)、转化生长因子 β 激活激酶 1 (transforming growth factor beta-activated kinase 1, TAK1)和 NF- κ B 的 mRNA 表达量显著降低($P<0.05$)。【结论】植物乳杆菌后生元 CFS 可通过抑制 NF- κ B 通路介导的 NLRP3 炎症小体缓解小鼠沙门氏菌感染和炎症反应,并且预饲中剂量 CFS 效果最佳。

关键词: 植物乳杆菌后生元; 沙门氏菌感染; 组织损伤; NLRP3 炎症小体; NF- κ B 通路

Effects and mechanism of *Lactobacillus plantarum* postbiotics on protecting against *Salmonella enterica* Typhimurium infection in mice

SHU Xin¹, HUANG Wenxia¹, MA Shiyue¹, LIU Jinsong³, YANG Caimei¹, ZHANG Ruiqiang¹, XIAO Xiao¹, WU Yanping^{1,2,3*}

1 College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

2 College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

3 Zhejiang Vegamax Biotechnology Co., Ltd., Huzhou 313300, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects and mechanism of *Lactobacillus plantarum* postbiotics at different doses on ameliorating *Salmonella enterica* Typhimurium (ST) infection in mice. **[Methods]** Sixty 5-week C57BL/6 mice were randomized into five groups: Control, ST, CFS-L+ST, CFS-M+ST, and CFS-H+ST. *Lactobacillus plantarum* postbiotics (cell-free supernatant, CFS) was administrated at low (L), medium (M), and high (H) doses (50, 100, and 200 μ L, respectively) for 21 days. On day 22, mice were orally challenged with ST at 3×10^8 CFU, and the samples were collected three days later. **[Results]** Compared with the control group, CFS-L+ST and CFS-M+ST groups showed no significant changes in body weight gain, while the CFS-H+ST group showed a significant decrease ($P<0.05$). The CFS-M+ST and CFS-H+ST groups alleviated ST-induced body weight loss ($P<0.05$). CFS pretreatment reduced ST-induced bacterial translocation in the colon, liver, spleen, and brain ($P<0.05$) and alleviated the pathological damages in the colon and spleen. ST reduced the levels of acetic acid and butyric acid in the cecum, which, however, increased in the CFS-M+ST group ($P>0.05$). Compared with the ST group, CFS-M+ST alleviated the inflammatory response by lowering the

levels of pro-inflammatory cytokines including interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P<0.05$) and elevating the levels of anti-inflammatory cytokines including interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10) ($P<0.05$). Moreover, CFS-M+ST suppressed ST-induced inflammation by modulating the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome, as indicated by the down-regulated mRNA levels of *NLRP3*, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cysteine-dependent aspartate-specific protease 1 (caspase-1), and gasdermin D (GSDMD) ($P<0.05$). Furthermore, CFS inhibited NLRP3 inflammasome by blocking the upstream key nuclear factor kappa beta (NF- κ B) pathway, as indicated by the down-regulated expression levels of myeloid differentiation factor 88 (MyD88), tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1), and NF- κ B ($P<0.05$). [Conclusion] *L. plantarum* postbiotics CFS alleviated the *S. enterica* Typhimurium infection and inflammatory responses in mice by inhibiting the NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome, and the pretreatment with medium-dose CFS showed the best effects.

Keywords: *Lactobacillus plantarum* postbiotics; *Salmonella enterica* Typhimurium infection; tissue injury; NLRP3 inflammasome; NF- κ B pathway

沙门氏菌是一种常见的食源性人畜共患病原菌，感染人后通常引起急性发热，甚至死亡，其也可感染猪、鸡等畜禽，导致生产性能下降或死亡，造成重大经济损失^[1]，受感染的畜禽加工成动物源性食品将引发食品安全问题。目前，防治沙门氏菌的主要方法是抗生素，但抗生素滥用会引起耐药菌的产生和药物残留等危害，因此寻求新型抗沙门氏菌策略已成为研究重点。乳酸菌是一种理想的抗生素替代品，具有抗菌、免疫调节和改善肠道健康等益生功能，但乳酸菌具有不耐储存和肠道存活率不高等缺点，所以在实际应用受到了限制^[2]。后生元是指益生菌的灭活菌体和/或其代谢产物，近年来研究发现后生元具有与活菌类似甚至更优的作用效果^[3]。据报道，后生元可通过缓解盲肠损伤、减少细菌移位数量抵御沙门氏菌感染^[4]，但其作用机制尚不明确。

沙门氏菌侵入机体后通常会引起组织损伤以及强烈的炎症反应，而 NLRP3 炎症小体在炎

症反应中发挥重要作用，NLRP3 通过 PYD-PYD 相互作用激活 ASC，从而促进 caspase-1 将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 转化为活性形式 IL-1 β 和 IL-18^[5]。核因子- κ B (nuclear factor kappa beta, NF- κ B) 通路包括 TLR4、髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、TRAF6、TAK1 和 NF- κ B 等信号分子，其中 TRAF6 和 TAK1 在 NLRP3 的激活中发挥重要作用^[6]；NF- κ B 可通过上调 NLRP3 的 PYD 和 pro-IL-1 β 的基因表达激活炎症。Chen 等^[7]研究发现沙门氏菌感染会导致 NLRP3 炎症小体及其上游 TLR4/MyD88 通路过度激活，而抑制其激活有助于减少沙门氏菌感染引起的组织损伤和炎症反应。最近研究发现，后生元可抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起 NLRP3 炎症小体 ASC 的激活，减少 IL-1 β 释放^[8]。

植物乳杆菌是一种广泛应用于医药、食品和畜牧业等领域的益生菌，大量研究表明其具有抗氧化、抗炎和提高免疫功能等作用^[9]。近期已有

研究发现,植物乳杆菌后生元可抑制病原菌和提高机体免疫功能,例如植物乳杆菌的代谢产物在体外可抑制单增李斯特菌的生长^[10]。Jeong 等^[11] 研究报道了植物乳杆菌的灭活菌体可通过增加细胞因子 IL-6、TNF- α 并增强巨噬细胞的活性提高免疫功能。本实验室前期研究发现,植物乳杆菌后生元(代谢产物)在体外对沙门氏菌的生长及致病性具有较强抑制效果^[12],但其是否在动物体内具有类似效果尚不明确,且作用机制有待阐明。因此本研究旨在探究不同剂量的植物乳杆菌后生元缓解小鼠沙门氏菌感染的作用效果,从调控 NLRP3 炎症小体通路角度阐述其分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) HJZW08 (CGMCC 23777), 浙江惠嘉生物科技股份有限公司提供;鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* Typhimurium) (CGMCC 50115), 本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

MRS 培养基、LB 培养基、SS 固体培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水, 上海碧云天生物技术有限公司; 氯仿、异丙醇、TRIzol 和荧光定量试剂盒, 杭州浩克生物技术有限公司; ELISA 试剂盒, 南京奥青生物技术有限公司; 偏磷酸、4%多聚甲醛, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸标准品, 生工生物工程(上海)股份有限公司。气相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; 恒温培养箱, 杭州灏凯生物技术有限公司; 真空冷冻干燥机, 上海贺帆仪器有限公司。

1.2 后生元的制备

取出冻存于 -80°C 的植物乳杆菌, 在 MRS 培养基中 37°C 静置培养过夜进行复苏, 再以 1:50 扩培 48 h 得到菌液 (OD_{600} 为 1.650, 稀释涂板测得菌数为 5×10^8 CFU/mL), $8\ 000\times g$ 离心 10 min 取上清, 再用 $0.22\ \mu\text{m}$ 过滤器过滤得无细胞培养上清 (cell-free supernatant, CFS), 分装保存在 -80°C 备用 (小鼠试验灌胃的 CFS 来源于同一批)。采用真空冷冻干燥机冻干 CFS, 在冷冻 -45 到 30°C 、真空度 10 Pa 条件下持续 30 h 冻干, 称重计算得到 CFS 浓度为 40 mg/mL。

1.3 动物实验设计

60 只 C57BL/6 雄性小鼠购于杭州医学院 [生产许可证为: SCXK(浙)2019-0002], 购买批号为: 20220901Abzz0100018156, 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级, 5 周龄, 饲喂 SPF 级饲料 [科澳协力(天津)饲料有限公司]。本研究严格遵从实验动物相关伦理准则操作, 并通过浙江农林大学实验动物伦理委员会批准 (伦理编号为: ZAFUAC2022025)。小鼠在浙江农林大学实验动物房分笼饲养适应 7 d, 自由饮水、采食, 光线 12 h 明暗自由转换, 环境温度控制在 $(21\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。适应期结束后, 小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只, 分组如下: 对照组 (Control); 沙门氏菌组 (ST); 低剂量 CFS+ 沙门氏菌组 (CFS-L+ST); 中剂量 CFS+ 沙门氏菌组 (CFS-M+ST); 高剂量 CFS+ 沙门氏菌组 (CFS-H+ST)。即后生元预饲组小鼠分别灌胃 50、100 和 200 μL 的 CFS (冷冻干燥后分别为 2、4 和 8 mg), 灌胃浓度参考实验室前期研究^[13] 及预试验, 其余组小鼠灌胃 200 μL MRS, 每 3 d 称重, 持续 21 d。在第 22 天, 禁食 12 h 后, Control 组小鼠灌胃 100 μL PBS, 剩余组灌胃 100 μL 浓度为 3×10^9 CFU/mL 的 ST。感染 3 d 后称重采样, 样品保存于 -80°C 备用。

1.4 指标测定

1.4.1 沙门氏菌移位测定

取小鼠结肠、肝脏、脾脏和脑组织, 采用 10 倍稀释涂布法在 SS 固体平板中 37 °C 恒温培养 24 h, 统计平板上产生的黑色菌落形成单元 (colony forming unit, CFU) 计算沙门氏菌在各组织中的数量。

1.4.2 小鼠脾脏和结肠形态学观察

取脾脏、结肠中段, 4% 的多聚甲醛固定后脱水、包埋、切片和苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 光学显微镜下观察各组织器官形态。

1.4.3 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清炎症因子

通过 ELISA 试剂盒检测血清炎症因子 (包括 IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6 和 IL-10)。

1.4.4 挥发性脂肪酸测定

取小鼠粪便于 2 mL 离心管中, 加入无菌水 (1:3, 质量体积比) 并在漩涡振荡器上溶解混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液

置于 1.5 mL 离心管, 之后加入 25% 偏磷酸 (1:5, 体积比) 充分混匀, 置于 4 °C 冰箱过夜。4 °C、12 000 r/min 再次离心 10 min, 上清液经 0.22 μ m 过滤器过滤后转入进样瓶待测。用气相色谱仪检测乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸的含量。

1.4.5 荧光定量 PCR 检测 mRNA 相对表达量

利用 TRIzol 试剂盒 (Abclonal 公司) 提取总 RNA, 再按照说明书反转录为 cDNA 并储存到 -80 °C 备用。PCR 反应体系: 2 \times Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 5 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 μ L, DEPC 水 3.6 μ L, cDNA (50 ng/ μ L) 1 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 熔解曲线由仪器自动设置。以 β -actin 作为内参基因, 对 NLRP3 炎症小体和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路基因定量分析, 并用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算所需基因相对表达量。引物由杭州擎科生物技术有限公司合成, 具体见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

Gene names	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Accession number
<i>TLR4</i>	GCATGGATCAGAACTCAGCAA	GAGAGGTGGTGTAAAGCCATGC	NM_021297.3
<i>MyD88</i>	GAAGTCGCGCATCGAGGA	GGCCACCTGTAAAGGCTTCT	NM_010851.3
<i>TAK1</i>	CCTGGCTTCTCCGGAAACAT	CCACACAGTACTCCACCACC	NM_001410482.1
<i>TRAF6</i>	AGCGCTGCAGTGAAAGATGA	TCCCGTAAAGCCATCAAGCA	NM_001303273.1
<i>NF-κB</i>	GGGTCACCCATGGCACC	GGCGATGGGTTCCTGCTTG	NM_001410442.1
<i>NLRP3</i>	ATTACCCGCCCCGAGAAAGG	CATGAGTGTGGCTAGATCCA	XM_036156549.1
<i>ASC</i>	TGGAGTCGTATGGCTTGGAG	TGTCCTTCAGTCAGCACACT	NM_023258.4
<i>caspase-1</i>	ACTCGTACACGTCTTGCCCTC	CTGGGCAGGCAGCAAATTC	NM_009807.2
<i>GSDMD</i>	TGCGTGTGACTCAGAAGACC	CAAACAGGTCATCCCCACGA	NM_026960.4
<i>IL-1β</i>	ACCTAGCTGTCAACGTGTGG	TCAAAGCAATGTGCTGGTGC	NM_008361.4
<i>IL-18</i>	CCTTTGAGGCATCCAGGACA	GGGAACAGCCAGTGTTCAGT	NM_008360.2
<i>β-actin</i>	CTGTCCCTGTATGCCTCTG	ATGTCACGCACGATTCC	NM_007393.5

1.5 统计学分析

试验数据通过 Excel 初步统计整理, 结果采用 SPSS 26.0 软件分析, 试验各组之间的差异采用单因素方差分析, Duncan's 检验法进行多重比较, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 结果均以平均值 \pm 标准误表示, 用 GraphPad Prism 9 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 探究不同剂量 CFS 对小鼠体重增长及感染 ST 后体重的影响

CFS 饲喂小鼠体重增长变化由图 1A 可知, CFS-L、CFS-M 组小鼠体重增长与 Control 组小鼠无显著差异, CFS-H 组小鼠体重增长缓慢, 在第 3、9、12 和 15 天显著低于对照组 ($P < 0.05$)。小鼠感染 ST 后体重损失由图 1B 可

知, 与 ST 组相比, Control、CFS-L+ST 和 CFS-M+ST 组小鼠体重损失显著下降 ($P < 0.05$), CFS-L+ST 组小鼠体重损失虽有降低但差异并不明显 ($P > 0.05$)。

2.2 探究不同剂量 CFS 对小鼠沙门氏菌移位的影响

由图 2 可知, 不同剂量 CFS 预饲可显著降低小鼠感染 ST 后各组织的细菌移位。具体而言, 沙门氏菌攻毒后, 结肠中 ST 组沙门氏菌含量为 1.5×10^5 CFU/g, 而 CFS 预处理组均可显著降低沙门氏菌数量 ($P < 0.05$), 分别为 1×10^5 、 0.5×10^5 和 0.4×10^5 CFU/g, 并且 CFS-M+ST 和 CFS-H+ST 预处理组清除沙门氏菌能力显著优于 CFS-L+ST ($P < 0.05$)。在肝脏、脾脏和脑中, 与 ST 组相比, 低、中、高剂量 CFS 预处理组细菌数量也均显著降低 ($P < 0.05$)。

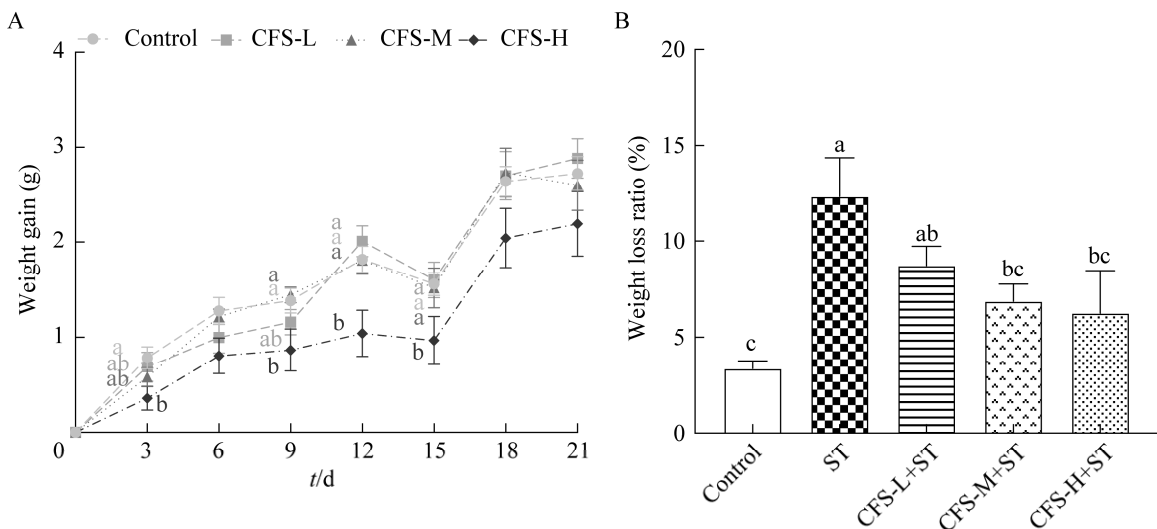


图 1 小鼠体重增长及感染 ST 后体重损失

Figure 1 The effect of different dosages of CFS in weight gain and weight loss ratio after challenged with ST in mice. A: The growth curves of different groups in mice. B: The weight loss ratio after challenged with ST in mice. Different letters (a, b, and c) indicate statistical significance ($P < 0.05$). The same below.

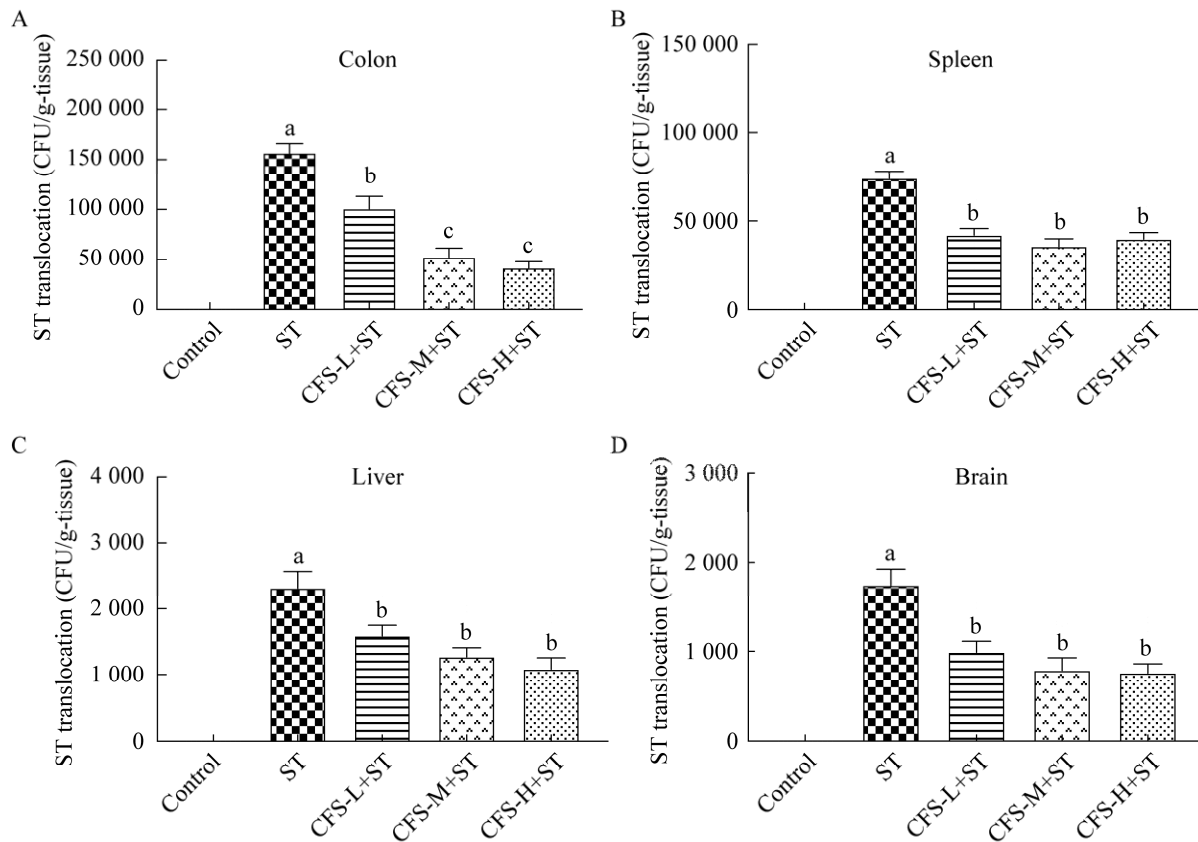


图 2 不同剂量 CFS 对小鼠沙门氏菌移位的影响

Figure 2 The effect of different dosages of CFS in the bacterial translocation of ST in mice.

2.3 探究不同剂量 CFS 对小鼠组织病理学的影响

由图 3A 可知, 感染沙门氏菌后 ST 组结肠的肠绒毛坏死, 肠上皮细胞受损脱落, 而 CFS-L+ST 和 CFS-H+ST 组的损伤较 ST 有所减轻, CFS-M+ST 组切片损伤并不明显。由图 3B 可知, ST 组脾脏肿胀、出血, 骨髓、红髓分界不清, CFS-L+ST 脾脏肿胀, CFS-H+ST 有出血, 但与 ST 组相比较轻, 而 CFS-M+ST 组小鼠脾脏损失较轻, 整体几乎与 Control 组一致。

2.4 探究不同剂量 CFS 对小鼠粪便挥发性脂肪酸含量的影响

由图 4 可知, 与 Control 组相比, ST 感染后

挥发性脂肪酸含量均有下降。与 ST 组相比, CFS-M+ST 组的 SCFAs 含量均有升高的趋势, CFS-H+ST 组乙酸、丙酸和丁酸含量也有升高的趋势, CFS-L+ST 组的丁酸有下降的趋势, 但差异均不显著($P > 0.05$)。

2.5 探究不同剂量 CFS 对 ST 感染小鼠炎症因子的影响

由图 5 可知, 与 Control 相比, ST 组 IL-1 β 和 IL-6 显著升高($P < 0.05$)。与 ST 组相比, CFS-M+ST 组 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 显著降低($P < 0.05$), IL-4 和 IL-10 水平显著升高($P < 0.05$); 而 CFS-H+ST 组 IL-4 显著升高和 IL-6 显著降低($P < 0.05$), IL-1 β 和 TNF- α 均有降低、IL-10 升高的趋势但无显著差异($P > 0.05$)。

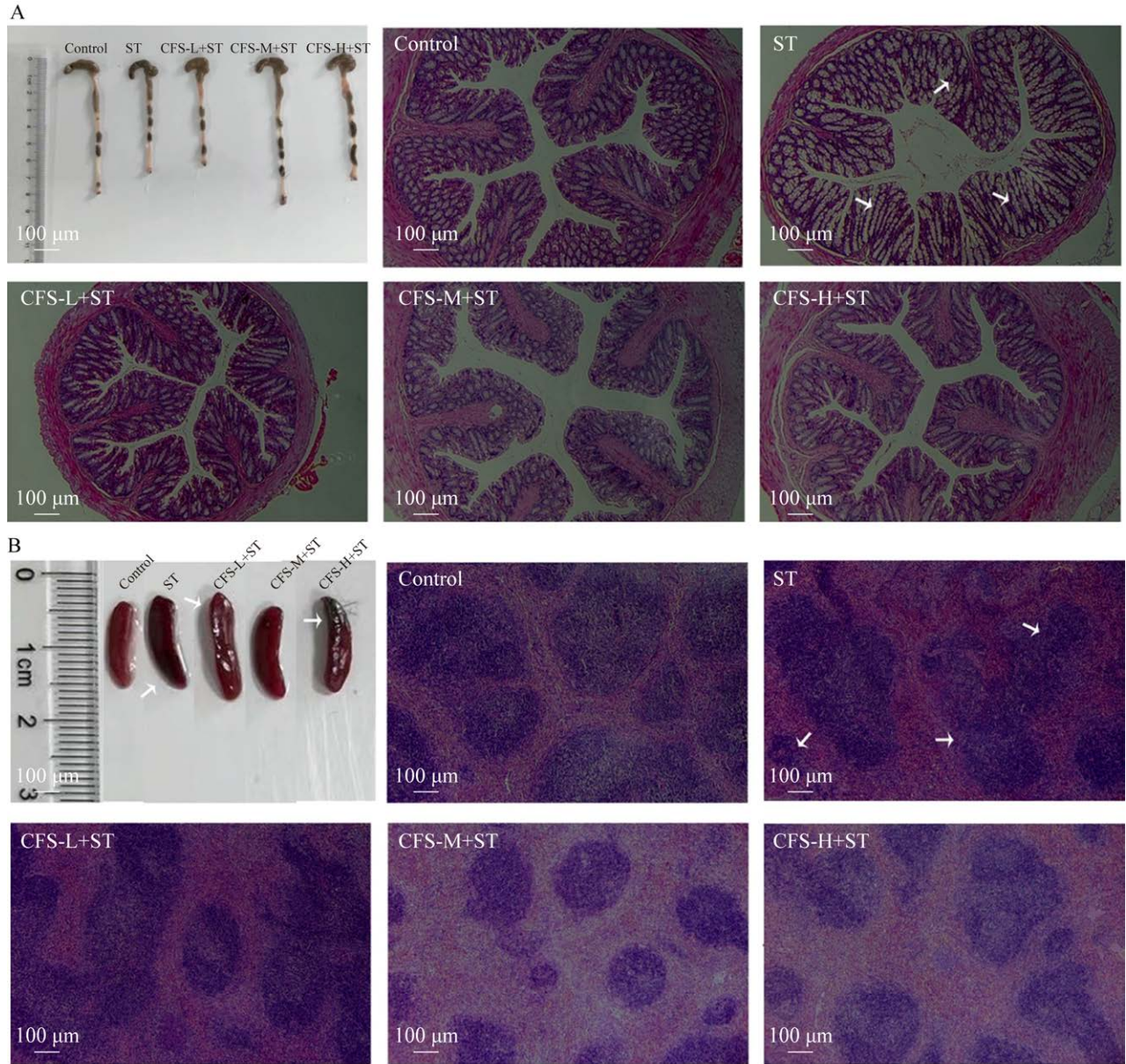


图3 小鼠结肠和脾脏组织病理学观察结果

Figure 3 The effect of different dosages of CFS on the damage of colon and spleen in mice challenged with ST. A: Representative photomicrographs of colon tissue. B: Representative photomicrographs of spleen tissue. Histomorphology analysis of colon and spleen using HE staining. 100×magnification.

2.6 探究不同剂量 CFS 对 ST 感染小鼠 NLRP3 炎症小体基因表达的影响

由图6可知,与Control组相比,ST组回肠黏膜 NLRP3 炎症小体 NLRP3、ASC、*caspase-1*、*GSDMD* 和 *IL-18* 的表达量显著升高

($P < 0.05$), *IL-1 β* 表达量有升高的趋势,但并无显著差异 ($P > 0.05$)。与 ST 组相比, CFS-M+ST、CFS-H+ST 组炎症小体 NLRP3、ASC、*caspase-1* 和 *GSDMD* 的表达量显著降低 ($P < 0.05$), CFS-H+ST 组 *IL-18* 的表达量显著降

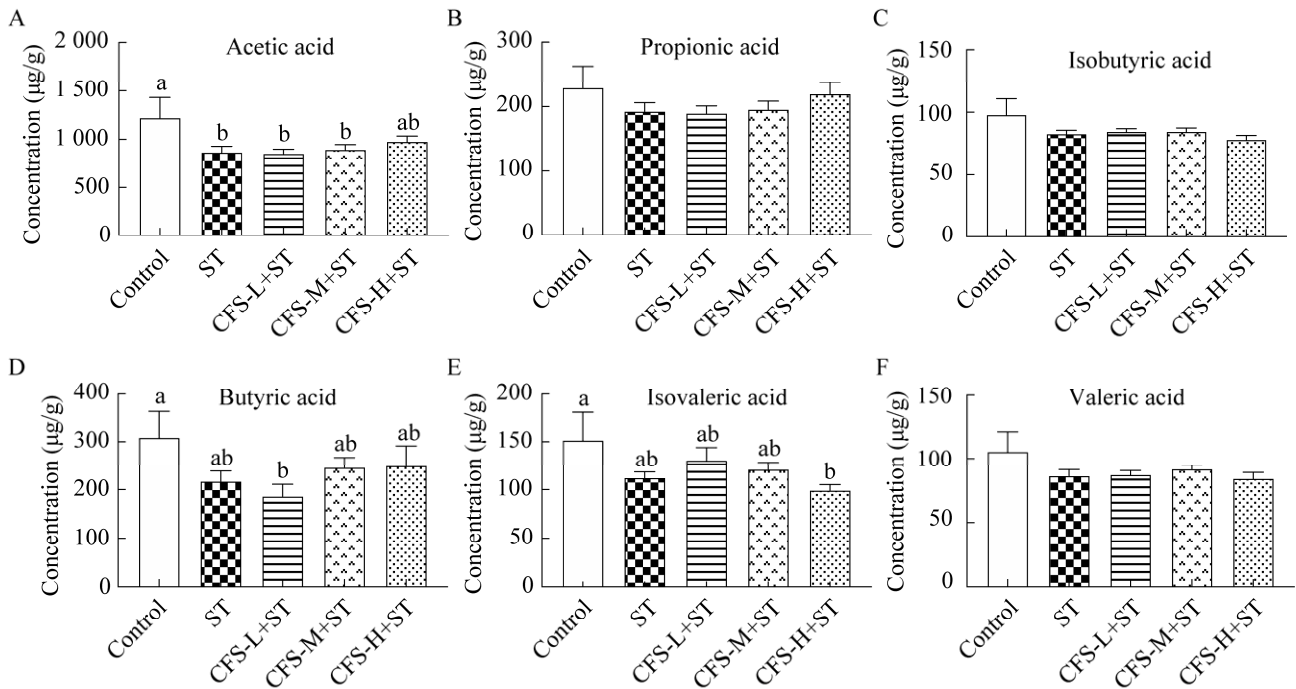


图 4 不同剂量 CFS 对小鼠粪便短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)含量的影响
Figure 4 The effect of different dosages of CFS on fecal SCFAs content in mice.

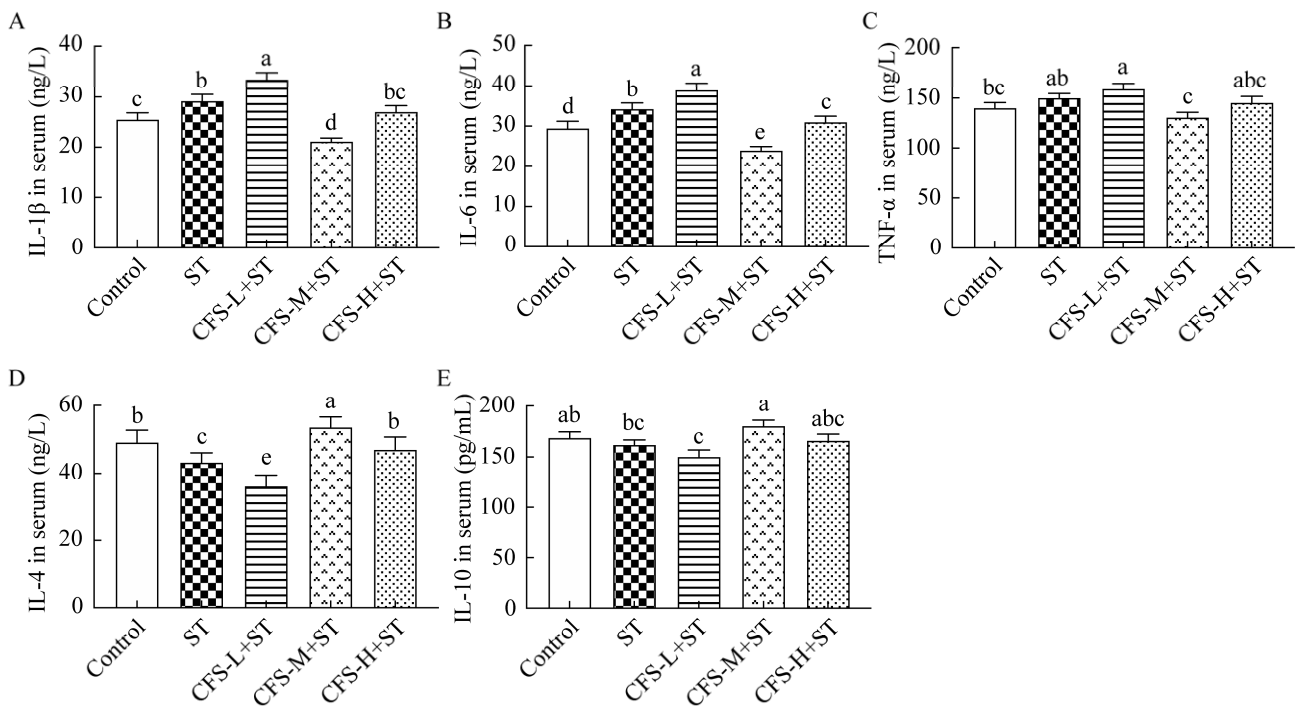


图 5 不同剂量 CFS 对 ST 感染小鼠炎症因子的影响
Figure 5 The effect of different dosages of CFS on inflammatory factors in ST infected mice. A: IL-1β. B: IL-6. C: TNF-α. D: IL-4. E: IL-10.

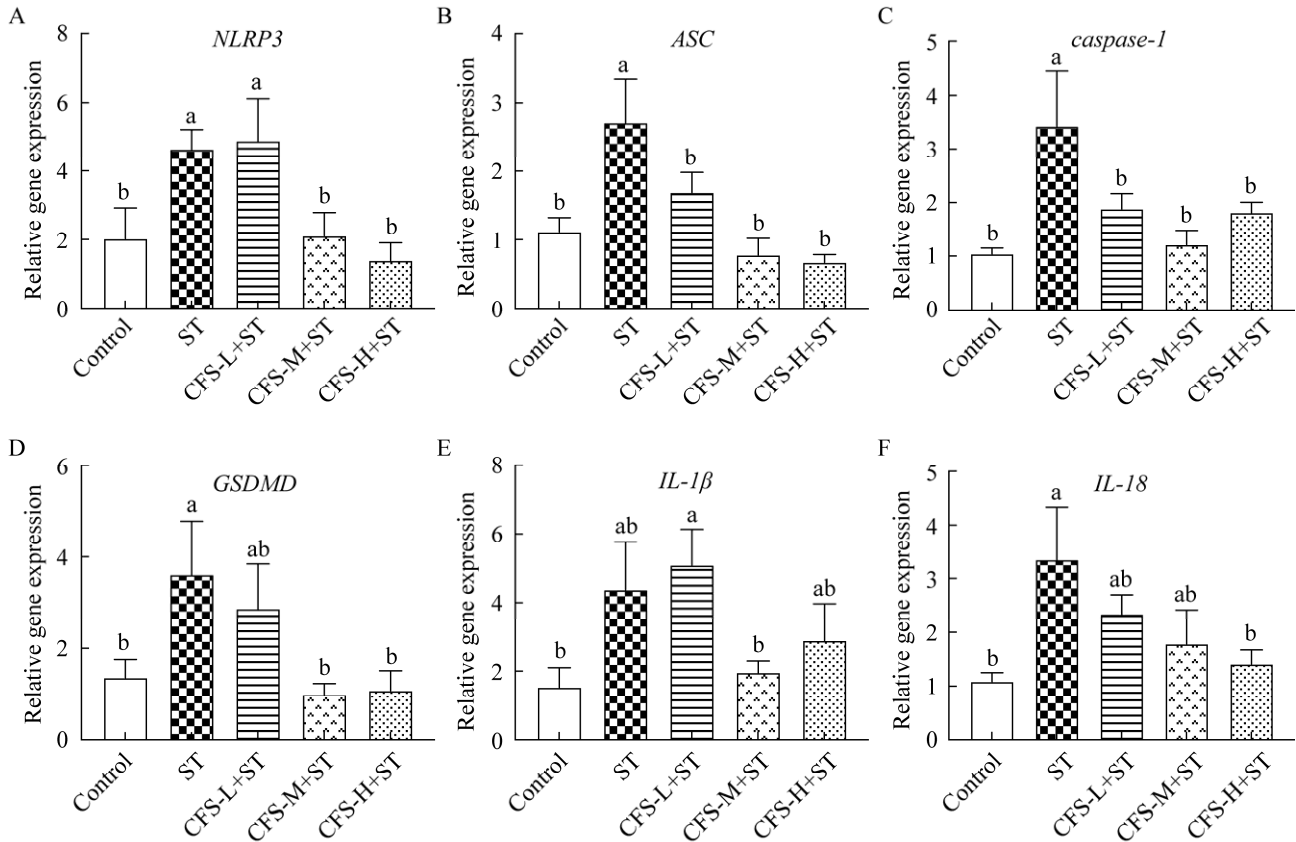


图 6 不同剂量 CFS 对 ST 感染小鼠 NLRP3 炎症小体基因表达的影响

Figure 6 The effect of different dosages of CFS on NLRP3 inflammasome mRNA expression in ST infected mice.

低($P<0.05$), 而 CFS-M+ST 组 *IL-18* 和 CFS-H+ST 组 *IL-1β* 表达量均有降低的趋势, 但并无显著差异 ($P>0.05$)。与 CFS-L+ST 组相比, CFS-M+ST 组 *IL-1β* 显著下降 ($P<0.05$), CFS-M+ST 和 CFS-H+ST 组的 *NLRP3* 显著下降 ($P<0.05$), *ASC*、*caspase-1*、*GSDMD* 和 *IL-18* 均有降低的趋势, 但差异不显著 ($P>0.05$)。以上表明中、高剂量的 CFS 均可通过 NLRP3 炎症小体缓解 ST 感染引起的炎症反应, 且中剂量组效果最佳。

2.7 探究不同剂量 CFS 对 ST 感染小鼠 TLR4/MyD88/NF-κB 通路基因表达的影响

由图 7 可知, 与 Control 组相比, ST 组

MyD88、*TRAF6* 和 *NF-κB* 的表达量显著升高 ($P<0.05$), *TLR4* 和 *TAK1* 表达水平有升高的趋势, 但并无显著差异 ($P>0.05$)。与 ST 组相比, CFS-M+ST、CFS-H+ST 组 *MyD88*、*TRAF6* 和 *NF-κB* 的表达量显著降低 ($P<0.05$), CFS-M+ST 组 *TAK1* 的表达量显著降低 ($P<0.05$), CFS-M+ST、CFS-H+ST 组 *TLR4* 表达量有降低的趋势, 但无显著差异 ($P>0.05$)。表明中、高剂量的 CFS 可通过 NLRP3 上游 TLR4/MyD88/NF-κB 通路进一步缓解 ST 感染引起的炎症反应, 且中剂量组效果更好。

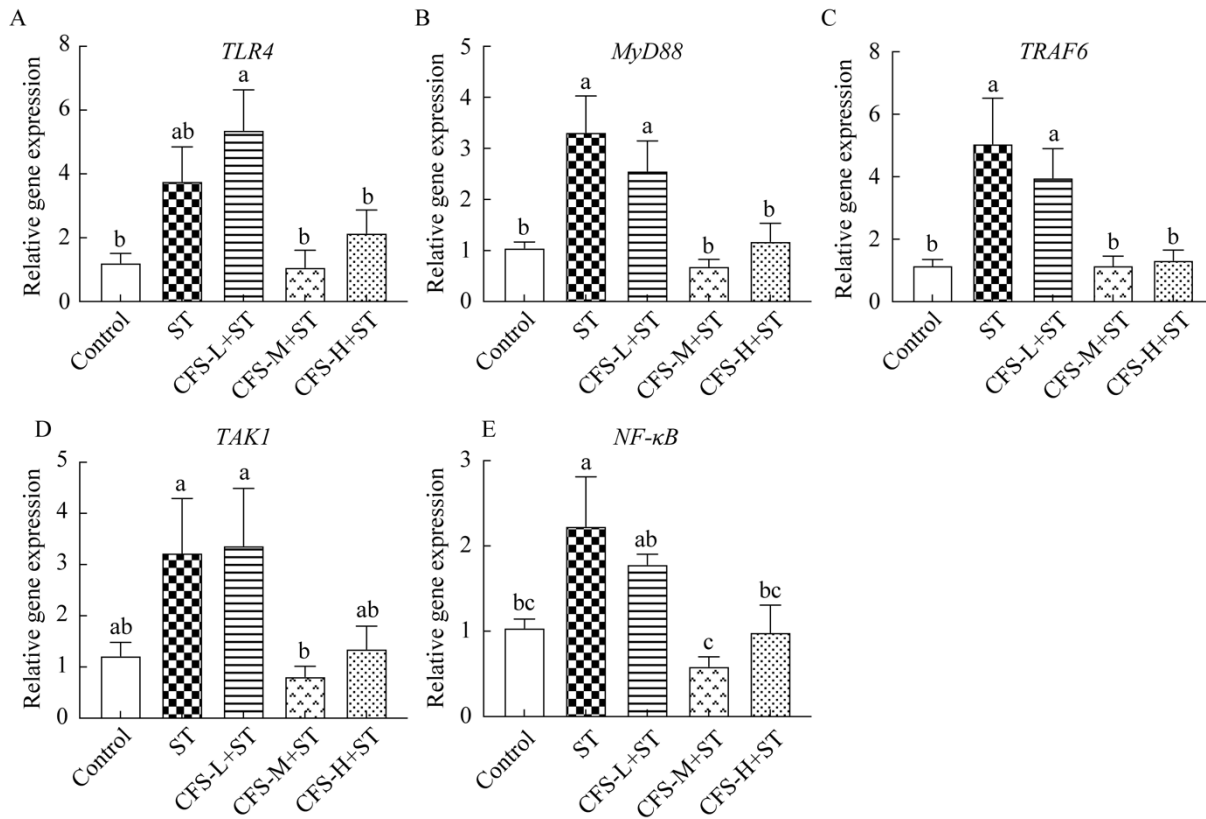


图 7 不同剂量 CFS 对 ST 感染小鼠 TLR4/MyD88/NF-κB 通路基因表达的影响

Figure 7 The effect of different dosages of CFS on TLR4/MyD88/NF-κB mRNA expression in ST infected mice.

3 讨论

沙门氏菌是一种食源性病原菌，感染后会致腹泻、肠炎和败血症等，严重威胁着人和动物的健康。据报道，我国的畜禽屠宰厂沙门氏菌检出率居高不下，最高检出率达到 36.7%，沙门氏菌污染严重^[14]。后生元是指对宿主健康有益的无生命微生物和/或其成分的制剂^[15]。近年来研究发现，后生元具有与益生菌类似甚至更优的抗菌、抗炎及免疫调节作用^[16]。例如在结肠炎小鼠模型中，青春双歧杆菌的后生元比菌体能发挥出更强的肠道菌群调控作用^[3]。此外，相对于益生菌，后生元在安全性方面更具有优势^[17]。本研究发现植物乳杆菌后生元可介导

NLRP3 炎症小体及其上游 TLR4/MyD88/NF-κB 通路的基因表达减少炎症反应以缓解沙门氏菌感染。

沙门氏菌感染通常会引引起体重下降和组织损伤。在本试验中，CFS 预处理阶段高剂量 CFS 组小鼠体重增长缓慢，并在第 3、9、12 和 15 天显著低于对照组，而低、中剂量组不受影响，推测可能是高剂量 CFS 引起小鼠食欲下降，摄食量降低。这与 Humam 等^[18]的研究结果类似，在肉鸡的日粮中添加 0.2%、0.4%、0.6% 和 0.8% 的后生元，其作用效果随剂量的升高而升高，在 0.6% 时达到最佳，提示后生元的作用可能存在一定的剂量效应。沙门氏菌侵入机体后，在肠道黏附、侵染肠上皮细胞，经过大量繁殖随着血

液循环侵入组织脏器并引起病理变化^[19]。本研究中 ST 感染后结肠、肝、脾和脑含量明显增多,但在预饲 CFS 后组织器官中沙门氏菌含量显著降低,这一结果与 Kaur 等^[20]研究结果相似。另外本研究发现,与 ST 组小鼠相比,预饲不同剂量的 CFS 各组体重损失幅度降低,表明 CFS 可缓解沙门氏菌感染引起的体重损失,并且中、高剂量 CFS 表现出明显的缓解作用,可能由于 CFS 中某些活性物质能够抑制沙门氏菌生长^[12],但其机制仍需进一步明确。此外,本研究 HE 染色结果显示,ST 组小鼠肠绒毛断裂、肠上皮细胞损伤脱落,脾脏组织损伤等病变;而预饲不同剂量 CFS 组小鼠结肠结构完整,肠绒毛以及脾脏损伤较轻,而中剂量组结果近似于对照组。在 Oliveira 等^[21]研究结果中,后生元预饲小鼠有效缓解沙门氏菌感染导致的肠道和脾脏等组织的损伤与本研究结果相似,并且有研究发现植物乳杆菌后生元可提高动物肠道屏障功能^[22]。以上表明 CFS 可能通过改善肠道屏障缓解沙门氏菌感染导致的病理损伤。

短链脂肪酸是肠道微生物的代谢产物,可通过发酵不可消化的碳水化合物产生,能降低肠道内 pH 值,维持肠道屏障完整性,并为其提供能量。有研究发现 SCFAs 抑制沙门氏菌生长^[23],Liu 等^[24]研究发现植物乳杆菌可通过增加粪便丙酸含量显著降低沙门氏菌的致病性。本研究结果显示 ST 感染显著降低了小鼠粪便中乙酸水平,这可能由于 ST 感染改变了肠道菌群,导致产生乙酸水平降低,而中剂量 CFS 组乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸水平变化均表现升高趋势。Wu 等^[25]研究中也发现类似的结果,植物乳杆菌后生元预饲小鼠显著提升了沙门氏菌感染后粪便乙酸与丙酸浓度,推测中剂量 CFS 可能通过增加 SCFAs 的产生来抵抗沙门氏菌感染,但具体作用机制仍需进一步研究。

沙门氏菌到达肠道后破坏肠道屏障并引发炎症。据报道,细胞因子在炎症发生过程中发挥着重要作用,IL-1 β 可使肠上皮细胞更容易发生损伤导致沙门氏菌入侵^[26],而 TNF- α 过度表达将损伤肠上皮细胞、促进上皮细胞凋亡产生炎症^[27],IL-6 在慢性炎症中发挥促炎作用^[28]。IL-10 是一种 Th2 型抗炎细胞因子,可缓解肠道炎症引起的组织损伤^[29]。Chen 等^[30]研究发现沙门氏菌攻毒后 IL-1 β 、IL-6 促炎因子在体内迅速增加,而 IL-10 分泌降低,这与本研究结果一致,ST 组的促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 均升高,IL-4 和 IL-10 减少,但预饲中剂量的 CFS 组小鼠显著降低了 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量,增加了 IL-4 和 IL-10 的分泌。Huang 等^[31]研究也得到了相似的结果,使用后生元降低了沙门氏菌引起的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 分泌。Shi 等^[32]研究中同样发现沙门氏菌感染后布氏乳杆菌可发挥调节炎症相关细胞因子(IL-6 和 IL-10)的作用改善肠道炎症。以上表明中剂量的 CFS 可通过调控促炎因子或抗炎因子的分泌缓解沙门氏菌感染。

NLRP3 炎症小体在肠道稳态中发挥着重要作用,研究表明在感染和代谢过程中激活 NLRP3 炎症小体对宿主免疫防御有很大帮助,但过度激活产生 IL-1 β 和 IL-18 会导致炎症^[33]。研究发现沙门氏菌感染后可激活 NLRP3 炎症小体^[34],NLRP3 被激活后调控 ASC 引起 caspase-1 分泌 IL-1 β 和 IL-18 导致炎症^[35]。通过检测回肠黏膜中 NLRP3、ASC、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 和 IL-18 表达水平,发现与 ST 组相比,中剂量 CFS 中上述基因表达均受到抑制,与 Wu 等^[25]的研究结果一致,推测其可能抑制 NLRP3 炎症小体通路缓解炎症。为进一步明确 CFS 的抗炎作用机制,本研究探究了 NLRP3 上游关键信号通路,即 TLR4/MyD88/NF- κ B。TLR4 作为

一种位于细胞表面的跨膜蛋白, 可感知胞外 LPS 刺激并迅速传递信号给 MyD88 从而激活 NF- κ B^[36], 当 TLR4 识别沙门氏菌产生的 LPS 后迅速在机体内启动一系列炎症反应, 比如 NF- κ B 信号通路激活后调控 NLRP3 炎症小体^[35], Chen 等^[7]研究发现沙门氏菌感染后, 激活了 TLR4/MyD88 通路的表达, 进一步导致 NLRP3 炎症小体表达量增加。在本研究中, 进一步检测了 TLR4 通路的表达水平, 当 ST 侵染后回肠黏膜中 TLR4/MyD88 通路表达量增加, 而中剂量 CFS 可显著减少 TLR4/MyD88 信号通路基因相对表达量, 进而减少下游 *NLRP3* 基因表达, 从而减少 IL-1 β 和 IL-18 的释放, 与 Chen 等的^[7]研究一致, 此外 Yu 等^[37]研究结果表明, TLR4 通路可抑制 NLRP3 炎症小体的表达缓解炎症, 这与本团队的研究结果一致。综上所述中剂量的 CFS 可通过减少 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路激活并降低 NLRP3 炎症小体基因表达以此缓解沙门氏菌感染小鼠的炎症反应。

4 结论

植物乳杆菌后生元 CFS 可通过抑制 NF- κ B 通路介导的 NLRP3 炎症小体缓解小鼠沙门氏菌感染和炎症反应, 并且预饲中剂量 CFS 效果最佳。本研究明确了后生元抵抗沙门氏菌的作用机制, 进一步为后生元实际应用提供科学依据。

参考文献

- [1] GE HJ, LIN C, XU YP, HU MZ, XU ZZ, GENG SZ, JIAO XA, CHEN X. A phage for the controlling of *Salmonella* in poultry and reducing biofilms[J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 269: 109432.
- [2] RITTER P, KOHLER C, von AH U. Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9(1): 1-9.
- [3] ZHANG T, ZHANG WQ, FENG CJ, KWOK LY, HE QW, SUN ZH. Stronger gut microbiome modulatory effects by postbiotics than probiotics in a mouse colitis model[J]. *npj Science of Food*, 2022, 6: 53.
- [4] CHANEY WE, NAQVI SA, GUTIERREZ M, GERNAT A, JOHNSON TJ, PETRY D. Dietary inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae*-derived postbiotic is associated with lower *Salmonella enterica* burden in broiler chickens on a commercial farm in Honduras[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(3): 544.
- [5] LU A, MAGUPALLI VG, RUAN J, YIN Q, ATIANAND MK, VOS MR, SCHRÖDER GF, FITZGERALD KA, WU H, EGELMAN EH. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes[J]. *Cell*, 2014, 156(6): 1193-1206.
- [6] HE AQ, JI R, SHAO J, HE CY, JIN M, XU YZ. TLR4-MyD88-TRAF6-TAK1 complex-mediated NF- κ B activation contribute to the anti-inflammatory effect of V8 in LPS-induced human cervical cancer SiHa cells[J]. *Inflammation*, 2016, 39: 172-181.
- [7] CHEN SY, LI Y, CHU BX, YUAN LX, LIU N, ZHU YH, WANG JF. *Lactobacillus johnsonii* L531 alleviates the damage caused by *Salmonella* Typhimurium via inhibiting TLR4, NF- κ B, and NLRP3 inflammasome signaling pathways[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1983.
- [8] DU X, RODRIGUEZ J, WEE J. Dietary depositbiotics reduce cytotoxicity and inflammation induced by crystalline silica in an *in vitro* RAW 264.7 macrophage mol[J]. *Foods*, 2022, 11(6): 877.
- [9] 伊婷, 乔家运, 李玉鹏, 李海花. 植物乳杆菌对小鼠体重、炎症反应及肠道健康的影响[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(4): 2668-2676.
YI T, QIAO JY, LI YP, LI HH. Effects of *Lactobacillus plantarum* on body weight, inflammatory response and intestinal health of mice[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(4): 2668-2676 (in Chinese).
- [10] HOSSAIN MI, MIZAN MFR, ROY PK, NAHAR S, TOUSHIK SH, ASHRAFUDOUILLA M, JAHID IK, LEE J, HA SD. *Listeria monocytogenes* biofilm inhibition on food contact surfaces by application of postbiotics from *Lactobacillus curvatus* B.67 and *Lactobacillus plantarum* M.2[J]. *Food Research International*, 2021, 148: 110595.
- [11] JEONG M, KIM JH, YANG H, KANG SD, SONG S, LEE D, LEE JS, PARK JHY, BYUN S, LEE KW. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* KCTC 13314BP enhances phagocytic activity and immunomodulatory

- effects *via* activation of MAPK and STAT3 pathways[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(8): 1248-1254.
- [12] 李东昱, 胡爱心, 黄雯霞, 舒鑫, 刘金松, 张瑞强, 许英蕾, 杨彩梅, 吴艳萍. 植物乳杆菌培养上清对不同血清型沙门氏菌的抑制效果及作用机理[J]. *微生物学报*, 2023, 63(1): 220-232.
- LI DY, HU AX, HUANG WX, SHU X, LIU JS, ZHANG RQ, XU YL, YANG CM, WU YP. Inhibitory mechanism of *Lactobacillus plantarum* culture supernatant on *Salmonella* of different serotypes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(1): 220-232 (in Chinese).
- [13] WU YP, WANG Y, HU AX, SHU X, HUANG WX, LIU JS, WANG BK, ZHANG RQ, YUE M, YANG CM. *Lactobacillus plantarum*-derived postbiotics prevent *Salmonella*-induced neurological dysfunctions by modulating gut-brain axis in mice[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 946096.
- [14] 李月华, 赵格, 赵建梅, 刘俊辉, 王君玮. 欧盟、美国及国内畜禽屠宰环节沙门氏菌监控现状[J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(6): 69-75.
- LI YH, ZHAO G, ZHAO JM, LIU JH, WANG JW. Discussion on the monitoring status of *Salmonella* during livestock and poultry slaughtering in EU, the United State and China[J]. *China Animal Health Inspection*, 2021, 38(6): 69-75 (in Chinese).
- [15] SALMINEN S, COLLADO MC, ENDO A, HILL C, LEBEER S, QUIGLEY EMM, SANDERS ME, SHAMIR R, SWANN JR, SZAJEWSKA H, VINDEROLA G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(9): 649-667.
- [16] EVANGELISTA AG, CORRÊA JAF, SANTOS JVG, MATTÉ EHC, MILEK MM, BIAUKI GC, COSTA LB, LUCIANO FB. Cell-free supernatants produced by lactic acid bacteria reduce *Salmonella* population *in vitro*[J]. *Microbiology*, 2021, 167(11): 001102.
- [17] ABBASI A, RAD AH, GHASEMPOUR Z, SABAH I, KAFIL HS, HASANNEZHAD P, SAADAT YR, SHAHBAZI N. The biological activities of postbiotics in gastrointestinal disorders[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(22): 5983-6004.
- [18] HUMAM AM, LOH TC, FOO HL, IZUDDIN WI, ZULKIFLI I, SAMSUDIN AA, MUSTAPHA NM. Supplementation of postbiotic RI11 improves antioxidant enzyme activity, upregulated gut barrier genes, and reduced cytokine, acute phase protein, and heat shock protein 70 gene expression levels in heat-stressed broilers[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(3): 100908.
- [19] 关红, 赵俊利, 赵红霞, 李志芳, 丁月霞, 石瑞丽. 内蒙古地区奶牛源沙门氏菌的分离、鉴定及其对小鼠的致病性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(6): 224-229.
- GUAN H, ZHAO JL, ZHAO HX, LI ZF, DING YX, SHI RL. Study on identification and pathogenicity of *Salmonella* isolates from dairy cattles in Inner Mongolia[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(6): 224-229 (in Chinese).
- [20] KAUR A, CHOPRA K, KAUR IP, RISHI P. *Salmonella* strain specificity determines post-typhoid central nervous system complications: intervention by *Lactiplantibacillus plantarum* at gut-brain axis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1568.
- [21] OLIVEIRA S, CAMPOS LL, AMARAL M, GALOTTI B, RICCI MF, VITAL KD, SOUZA RO, UETANABARO APT, JUNQUEIRA MS, SILVA AM, FERNANDES SO, CARDOSO V, NICOLI J, MARTINS F. Evaluation of a functional craft wheat beer fermented with *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 to treat *Salmonella* Typhimurium infection in mice[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023, 15(5): 1180-1192.
- [22] IZUDDIN WI, LOH TC, FOO HL, SAMSUDIN AA, HUMAM AM. Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 9938.
- [23] LAMAS A, REGAL P, VÁZQUEZ B, CEPEDA A, FRANCO CM. Short chain fatty acids commonly produced by gut microbiota influence *Salmonella enterica* motility, biofilm formation, and gene expression[J]. *Antibiotics*, 2019, 8(4): 265.
- [24] LIU JS, GU ZN, SONG FF, ZHANG H, ZHAO JX, CHEN W. *Lactobacillus plantarum* ZS2058 and *Lactobacillus rhamnosus* GG use different mechanisms to prevent *Salmonella* infection *in vivo*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 299.
- [25] WU YP, HU AX, SHU X, HUANG WX, ZHANG RQ, XU YL, YANG CM. *Lactobacillus plantarum* postbiotics trigger AMPK-dependent autophagy to suppress *Salmonella* intracellular infection and NLRP3

- inflammasome activation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2023, 238(6): 1336-1353.
- [26] LI Y, LIU MF, ZUO ZY, LIU J, YU X, GUAN Y, ZHAN RH, HAN QJ, ZHANG J, ZHOU RB, SUN R, TIAN ZG, ZHANG C. TLR9 regulates the NF- κ B-NLRP3-IL-1 β pathway negatively in *Salmonella*-induced NKG2D-mediated intestinal inflammation[J]. *The Journal of Immunology*, 2017, 199(2): 761-773.
- [27] YANG M, LIN HB, GONG S, CHEN PY, GENG LL, ZENG YM, LI DY. Effect of *Astragalus* polysaccharides on expression of TNF- α , IL-1 β and NFATc4 in a rat model of experimental colitis[J]. *Cytokine*, 2014, 70(2): 81-86.
- [28] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014, 6(10): a016295.
- [29] 曾兴宇, 吴宇梁, 李雪, 周锡红, 熊霞, 印遇龙. 饲养密度和栏舍面积对仔猪生长性能、肠道健康和免疫功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(8): 5013-5022.
- ZENG XY, WU YL, LI X, ZHOU XH, XIONG X, YIN YL. Effects of stocking density and floor area on growth performance, intestinal health and immune function of piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(8): 5013-5022 (in Chinese).
- [30] CHEN CY, TSEN HY, LIN CL, YU B, CHEN CS. Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the *Salmonella* invasion and inflammation of broiler chicks[J]. *Poultry Science*, 2012, 91(9): 2139-2147.
- [31] HUANG FC, HUANG SC. The combined beneficial effects of postbiotic butyrate on active vitamin D₃-orchestrated innate immunity to *Salmonella colitis*[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(10): 1296.
- [32] SHI Y, PENG H, LIAO Y, LI J, YIN Y, PENG H, WANG L, TAN Y, LI C, BAI H, MA C, TAN W, LI X. The prophylactic protection of *Salmonella* Typhimurium infection by *Lentilactobacillus buchneri* GX0328-6 in mice[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2023: 1-19.
- [33] ZHEN Y, ZHANG H. NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 276.
- [34] QU Y, MISAGHI S, NEWTON K, MALTZMAN A, IZRAEL-TOMASEVIC A, ARNOTT D, DIXIT VM. NLRP3 recruitment by NLRC4 during *Salmonella* infection[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(6): 877-885.
- [35] HE Y, HARA H, NÚÑEZ G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [36] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [37] YU R, JIANG S, TAO Y, LI P, YIN J, ZHOU Q. Inhibition of HMGB1 improves necrotizing enterocolitis by inhibiting NLRP3 via TLR4 and NF- κ B signaling pathways[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(8): 13431-13438.