

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19020

秦皮素的抑菌作用及其对嗜水气单胞菌毒力的影响

朱璐丹^{1,2}, 陈凯², 习丙文², 谢骏^{1,2,3}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 为探讨中草药单体秦皮素对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)生长和毒力的影响, 实验测定了秦皮素对嗜水气单胞菌最低抑菌浓度(MIC)、生长曲线、生物膜以及脂肪酶活性、运动性、蛋白酶活性和溶血性等毒力相关因子的影响。结果表明, 秦皮素对嗜水气单胞菌具有明显的抑制效果, MIC 为 128 $\mu\text{g/mL}$; 秦皮素浓度大于 16 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对嗜水气单胞菌的生物膜形成有显著促进作用($P<0.05$); 秦皮素浓度大于 8 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对嗜水气单胞菌的脂肪酶活性有显著降低作用($P<0.05$); 秦皮素浓度为 2~8 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对嗜水气单胞菌的运动性和溶血性无显著影响($P>0.05$), 但能降低嗜水气单胞菌蛋白酶活性($P<0.05$)。秦皮素对嗜水气单胞菌有一定的抑菌作用, 但期望通过低浓度秦皮素实现对嗜水气单胞菌的防治仍有待进一步研究。

关键词: 秦皮素; 嗜水气单胞菌; 抑菌作用; 毒力

中图分类号: 941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)05-0984-09

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)隶属于气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属, 是一种人、畜及水生动物共患的条件致病菌^[1]。嗜水气单胞菌感染对象遍及软体动物^[2]、甲壳动物^[3]、鱼类^[4-5]、两栖类^[6]、爬行类^[7]、禽类^[8]等。除能感染各种动物外, 嗜水气单胞菌也能感染人类, 人类可因致病性嗜水气单胞菌感染而发生腹泻、食物中毒、继发性感染等^[9]。嗜水气单胞菌给人类健康带来威胁的同时, 更对水产养殖业造成了巨大的经济损失, 已引起了国内外的高度重视。

近年来, 在抗生素耐药问题日益严重的情况下, 中草药及其提取物在水产动物病害防治过程中表现出的不易产生耐药性、毒副作用小、不易残留、能提高鱼体免疫力等诸多优良特点, 引起人们的广泛关注^[10]。从中草药中研制开发新型渔药已成为水产养殖过程中防治疾病的新方向, 具

有重要的经济价值、社会价值及生态价值^[11]。

目前, 中草药及其提取物在水产养殖细菌性疾病防治领域的相关研究越来越多。许多研究表明, 黄连^[12-14](*Coptis chinensis*)、五倍子^[13-15](*Rhus chinensis*)、大黄^[13](*Rheum palmatum*)、乌梅(*Fuctus Mume*)^[13]、诃子^[14](*Chebulae fructus*)、丁香^[15](*Syzygium aromaticum*)等中草药对嗜水气单胞菌均有明显的抑菌作用。

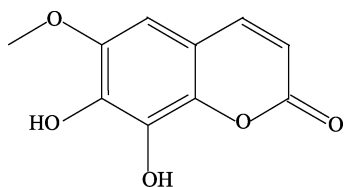
秦皮素(fraxetin)是一种天然的简单香豆素类化合物, 别名白蜡树内酯, 化学名为 7, 8-二羟基-6-甲氧基香豆素, 其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5$, 相对分子质量为 208.16。秦皮素自然状态下为浅黄色片状结晶, 熔点为 228℃, 达到熔点时变为棕色, 在 150℃时会变为黄色, 溶于乙醇及盐酸水溶液, 微溶于沸水, 难溶于乙酸^[16]。秦皮素的结构式如图 1 所示。

收稿日期: 2019-02-12; 修订日期: 2019-03-11.

基金项目: 农业农村部现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45).

作者简介: 朱璐丹(1995-), 女, 硕士研究生, 从事水产动物病害与防治研究. E-mail: zld6720@foxmail.com

通信作者: 谢骏(1966-), 研究员. E-mail: xiej@ffrc.cn

图1 秦皮素结构式^[16]Fig. 1 The structure formula of fraxetin^[16]

秦皮素具有较好的抑菌效果,对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[16]、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)^[17]、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)^[18]等都有较好的抑制作用,但目前尚无关于秦皮素对嗜水气单胞菌抑菌作用的相关报道。该研究以嗜水气单胞菌为供试菌株,通过研究秦皮素对嗜水气单胞菌的抑菌作用,以及秦皮素在非抑菌浓度下对嗜水气单胞菌的毒力影响等来探讨秦皮素的抑菌机制,为秦皮素应用于防治水产养殖病害提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株和培养条件

实验所使用的嗜水气单胞菌株由本实验室分离。菌株保存在-80℃甘油管中,使用前在血平板上划线,28℃过夜培养,挑取单克隆。

1.2 试剂和主要设备

主要试剂:秦皮素(98%)和三氯乙酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。二甲基亚砜(DMSO)购自碧云天生物技术有限公司。营养肉汤(nutrient broth, NB)购自青岛海博生物技术有限公司。吐温80购自生工生物工程(上海)有限公司。Azocasein 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

主要仪器:全波长酶标仪(Multiskan G, Thermo Scientific),高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 秦皮素对嗜水气单胞菌的最低抑菌浓度(MIC)的测定

最低抑菌浓度的测定参照汪业菊^[16]所述的方法,并对试验方法进行调整。将秦皮素溶解于DMSO配置成母液,稀释备用。取嗜水气单胞菌于NB培养基中过夜培养(28℃, 180 r/min),将其稀释至浓度为 1×10^5 cfu/mL的菌悬液。取198 μL

菌悬液、2 μL不同浓度的供试药液,使药液在培养液中的终浓度为256 μg/mL、128 μg/mL、64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL,对应加在无菌的96孔微量培养板中,设置不添加秦皮素的空白对照组和添加等量DMSO的溶剂对照组。培养箱28℃培养24 h后,全波长酶标仪测定菌液OD₆₀₀值确定秦皮素的MIC值。实验重复3次,取平均值。

1.4 秦皮素对嗜水气单胞菌生长曲线的影响试验

将秦皮素溶解于DMSO配置成母液,稀释备用。取嗜水气单胞菌于NB培养基中过夜培养(28℃, 180 r/min),将其稀释至浓度为 1×10^7 cfu/mL的菌悬液。菌液按1%的接种量转接至含秦皮素(浓度分别为256 μg/mL、128 μg/mL、64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL)的NB培养基中;设置培养基内不添加秦皮素的空白对照组和添加等量DMSO的溶剂对照组;摇床中(28℃、180 r/min)培养。

在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、22 h、24 h、26 h,取菌液于全波长酶标仪测定OD₆₀₀。实验重复3次,取平均值。

以时间为横坐标,OD₆₀₀为纵坐标,绘制实验组和对照组的生长曲线。

1.5 秦皮素对嗜水气单胞菌生物膜形成的影响试验

根据Vasudevan等^[19]的结晶紫染色法检测菌株生物膜,并对试验方法进行调整。菌液按1%的接种量转接至含有秦皮素浓度分别为64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL的NB培养基中,设置空白对照组和DMSO溶剂对照组。充分混匀后,转入至无菌的96孔微量培养板中,28℃静置培养72 h,测定OD₆₀₀值,吸出菌液,同时用无菌PBS清洗培养孔后,先后用200 μL 99%甲醇固定15 min,1%结晶紫溶液染色20 min;干燥后加入200 μL 30%冰醋酸溶解结晶紫。用全波长酶标仪测定培养孔中溶液的OD₅₇₀值,试验重复3次,各试验组设置3个重复。由于不同试验组细菌生长存在差异,每个样品孔测得的OD₅₇₀值需要消除细菌浓度造成的差异;生物膜OD₅₇₀(相对值)=OD₅₇₀(测量值)/OD₆₀₀(细菌浓度值)。

1.6 秦皮素对嗜水气单胞菌脂肪酶活性的影响试验

脂肪酶活性的测定基本参照 Yang 等^[20]的方法,并略作调整。NB 培养基添加体积分数为 1% 的吐温 80 和 1.5% 琼脂,121℃ 高压灭菌 20 min,待冷却至 55℃ 时,实验组加入秦皮素母液,使药液的终浓度为 8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL,对照组加入等量 DMSO,轻轻摇匀,尽量避免气泡的产生,倾注平板,凝固后,将细菌重悬液浓度调为 1×10^7 cfu/mL,取 4 μL 细菌重悬液点种在平板上,在恒温培养箱(28℃)培养 48 h 后分别测量菌落和白色沉淀环的直径,沉淀环与菌落直径之比即为细菌脂肪酶活性。

1.7 秦皮素对嗜水气单胞菌运动性的影响

按照 Yang 等^[20]所述的方法并略微调整。NB 培养基添加 0.5% 琼脂粉,121℃ 高压灭菌 20 min,待冷却至 55℃ 时,实验组加入秦皮素,使药液的终浓度为 8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL,对照组加入等量 DMSO,轻轻摇匀,倾注平板,凝固以后,取 4 μL 细菌重悬液,细菌重悬液浓度调为 1×10^7 cfu/mL,点种在平板上,在恒温培养箱(28℃)培养 48 h 后测定菌落的直径,细菌的运动能力与菌落的直径呈正相关关系。

1.8 秦皮素对嗜水气单胞菌蛋白酶活性的影响

参见 Chu 等^[21]的检测方法,并稍加调整。将秦皮素溶解于 DMSO 配置成母液,稀释备用。取嗜水气单胞菌于 NB 培养基中过夜培养(28℃、180 r/min),将其稀释至浓度为 1×10^7 cfu/mL 的菌悬液。菌液按 1% 的接种量转接至含秦皮素(秦皮素质量浓度分别为 8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL)的 NB 培养基中;设置培养基内不添加秦皮素的空白对照组和添加等量 DMSO 的溶剂对照组;摇床中(28℃、180 r/min)培养 24 h。将培养液离心,过滤除菌,取得上清液。

取 150 μL 上述上清液转入 2 mL 无菌离心管中,加入 1 mL 0.3% 偶氮酪蛋白(azocasein) (Tris-HCl 配制, pH 7.5),振荡混匀,在 37℃ 恒温水浴锅中温育 30 min 后,加入 500 μL 预冷的三氯乙酸(体积分数为 10%),终止反应,室温放置 10 min 后,12000 g,4℃ 离心 10 min,取 100 μL 上清液,移至

96 孔酶标板中,每孔加入 100 μL 1 mol/L NaOH(中和三氯乙酸),在全波长酶标仪中低速振荡 10 s 后测定 OD₄₀₀。

1.9 秦皮素对嗜水气单胞菌溶血性的影响

按照 Luo 等^[22]的方法,并稍加改进。将鱼红细胞用无菌 PBS 洗涤 3 次(4℃,2000 r/min),参照 5% 绵羊血细胞溶液制备方法,制备成 4% 鱼红细胞溶液。取 100 μL 上述 1.8 中上清液于 2 mL 离心管中,加入 100 μL 4% 红细胞和 800 μL 无菌生理盐水,37℃ 孵育 30 min,5000 r/min 离心 10 min,取 200 μL 上清液至酶标板中,在全波长酶标仪中测定 OD₅₄₀ 值。阴性对照为无菌生理盐水,阳性对照为蒸馏水(溶血性为 100%),所得到 OD₅₄₀ 值按照以下公式进行计算,计算公式为: (样品 OD₅₄₀-阴性对照 OD₅₄₀)/(阳性对照 OD₅₄₀-阴性对照 OD₅₄₀)。

1.10 数据处理

所有实验数据均用 Excel 2010 进行统计,计算平均值与标准差,所有结果均以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。并使用 SPSS 24.0 统计软件包中的单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 氏多重比较,检验各组间的差异,不同的大小写字母表示各组之间差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 秦皮素对嗜水气单胞菌的最低抑菌浓度

空白组和溶剂对照组嗜水气单胞菌的菌液浓度无显著性差异($P > 0.05$),说明 1% 的 DMSO 添加量不影响嗜水气单胞菌生长。秦皮素浓度为 128 μg/mL 和 256 μg/mL 时,培养 24 h 后,培养液澄清透明,嗜水气单胞菌不生长,因此,秦皮素对嗜水气单胞菌的最低抑菌浓度为 128 μg/mL。秦皮素对嗜水气单胞菌的抑制效果呈浓度依赖性抑制,在秦皮素浓度为 16 μg/mL、32 μg/mL、64 μg/mL 时,均能显著抑制嗜水气单胞菌生长($P < 0.05$)。秦皮素浓度为 8 μg/mL 时,对嗜水气单胞菌的生长没有显著抑制效果(图 2)。

2.2 不同浓度秦皮素对嗜水气单胞菌生长曲线的影响

空白对照组和溶剂对照组的生长曲线基本重

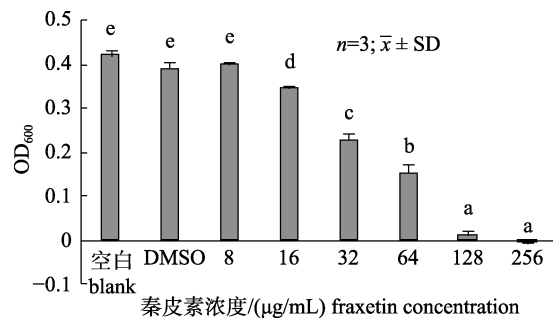


图 2 秦皮素对嗜水气单胞菌的最低抑菌浓度
柱形图上方字母不同表示差异显著($P<0.05$).
Fig. 2 Minimum inhibitory concentration of fraxetin on *Aeromonas hydrophila*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

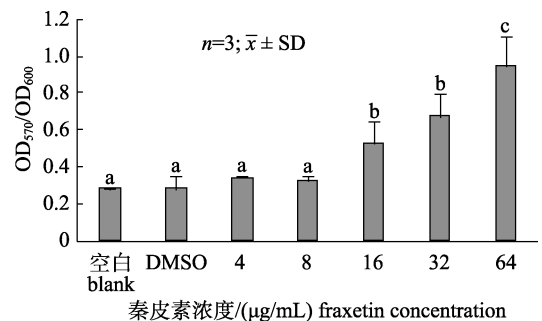


图 4 秦皮素对嗜水气单胞菌生物膜形成的影响
柱形图上方字母不同表示差异显著($P<0.05$).
Fig. 4 Effects of fraxetin on biofilm formation against *Aeromonas hydrophila*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

合, 曲线呈“S”形, 有明显的迟缓期、对数生长期和稳定期, 说明在 NB 培养基里添加 1% 的 DMSO 不影响嗜水气单胞菌的生长。秦皮素浓度小于 8 µg/mL 时对嗜水气单胞菌的生长没有显著影响 ($P>0.05$)。在秦皮素浓度大于 32 µg/mL 时, 明显抑制了嗜水气单胞菌的生长 ($P<0.05$), 菌株进入对数生长期的时间出现了明显的延迟, 且生长平台期菌液浓度明显低于对照组。秦皮素浓度大于 64 µg/mL 时, 嗜水气单胞菌不生长(图 3)。

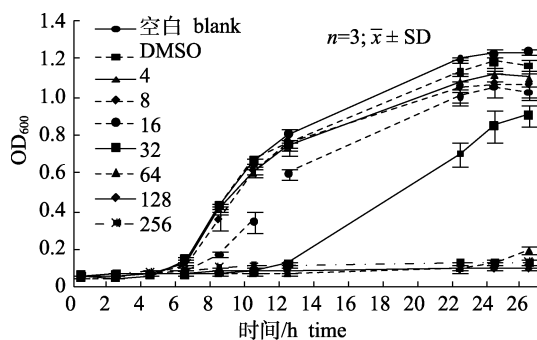


图 3 不同秦皮素浓度(µg/mL)下嗜水气单胞菌的生长曲线
Fig. 3 Growth curve of *Aeromonas hydrophila* under different concentrations of fraxetin (µg/mL)

2.3 秦皮素对嗜水气单胞菌生物膜的影响

空白对照组和溶剂对照组的生物膜形成无显著性差异 ($P>0.05$), 说明 1% 的 DMSO 添加量对嗜水气单胞菌生物膜的形成无影响。秦皮素大于 16 µg/mL 时, 对嗜水气单胞菌的生物膜形成有显著促进作用 ($P<0.05$)。且随着秦皮素浓度增加, 对生物膜形成的促进作用越明显(图 4)。

2.4 秦皮素在非抑菌浓度下对嗜水气单胞菌毒力的影响

空白对照组和溶剂对照组对嗜水气单胞菌脂肪酶活性的影响无显著性差异 ($P>0.05$), 说明以 1% 添加量的 DMSO 作为溶剂对嗜水气单胞菌脂肪酶活性无影响。在非抑菌浓度下, 8 µg/mL 秦皮素对嗜水气单胞菌的脂肪酶活性有显著性降低作用 ($P<0.05$), 而浓度为 2 µg/mL 和 4 µg/mL 的秦皮素对嗜水气单胞菌脂肪酶活性无显著影响 ($P>0.05$) (图 5)。

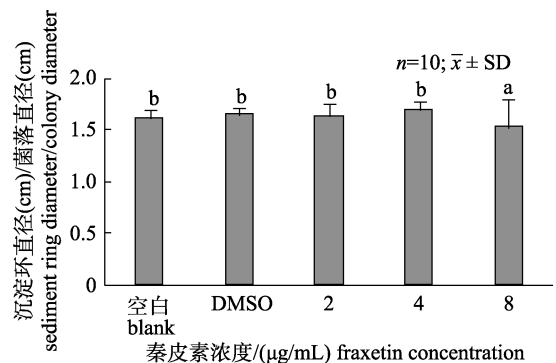


图 5 秦皮素对嗜水气单胞菌脂肪酶活性的影响
柱形图上方字母不同表示差异显著($P<0.05$).
Fig. 5 Effect of fraxetin on lipase activity of *Aeromonas hydrophila*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

空白对照组和溶剂对照组的嗜水气单胞菌菌落直径无显著性差异 ($P>0.05$), 说明以 1% DMSO 作为溶剂不影响嗜水气单胞菌的运动性。当秦皮素浓度为 2 µg/mL、4 µg/mL 和 8 µg/mL 时, 和溶剂 DMSO 组均无显著性差异 ($P>0.05$), 即在非抑

菌浓度下, 秦皮素对嗜水气单胞菌的运动性无显著影响(图 6)。

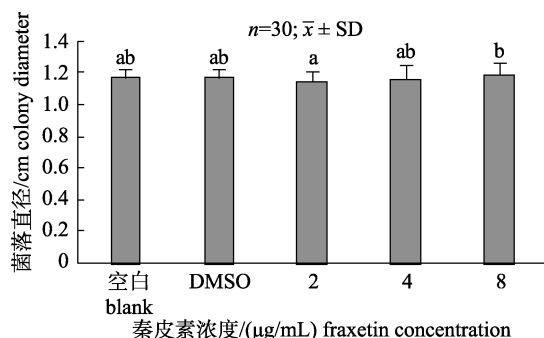


图 6 秦皮素对嗜水气单胞菌运动性的影响
柱形图上方字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 6 Effect of fraxetin on the motility of *Aeromonas hydrophila*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

空白对照组和溶剂对照组嗜水气单胞菌的蛋白酶活性无显著性差异($P>0.05$), 说明添加 DMSO 对嗜水气单胞菌蛋白酶活性无影响。秦皮素浓度为 8 μg/mL 时, 对嗜水气单胞菌的蛋白酶活性有降低作用但差异不显著($P>0.05$)。秦皮素浓度为 2 μg/mL 和 4 μg/mL 时, 能显著降低嗜水气单胞菌蛋白酶活性($P<0.05$, 图 7)。

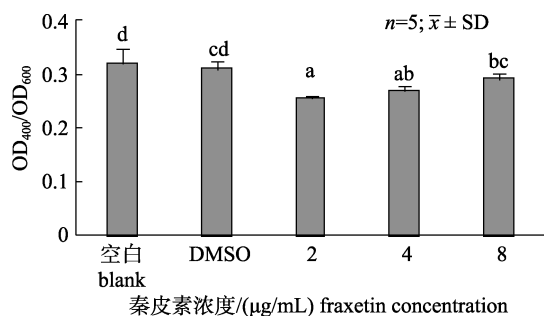


图 7 秦皮素对嗜水气单胞菌蛋白酶活性的影响
柱形图上方字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 7 Effect of fraxetin on the proteinase activity of *Aeromonas hydrophila*
Different letters on the column indicate significant difference ($P<0.05$).

空白对照组和溶剂对照组的嗜水气单胞菌溶血性无显著性差异($P>0.05$)。秦皮素浓度为 2 μg/mL、4 μg/mL 和 8 μg/mL 时和溶剂 DMSO 组均无显著性差异($P>0.05$), 即在非抑菌浓度下, 秦皮素对嗜水气单胞菌的溶血性无影响(图 8)。

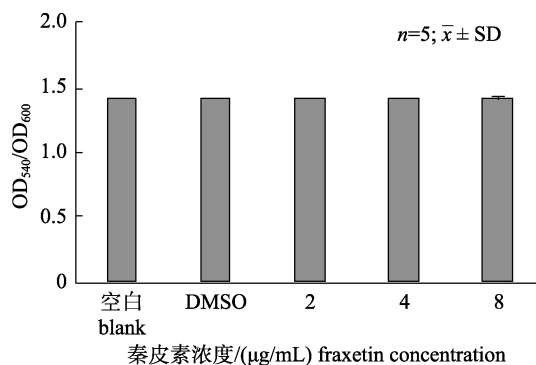


图 8 秦皮素对嗜水气单胞菌溶血性的影响

Fig. 8 Effect of fraxetin on the hemolytic activity of *Aeromonas hydrophila*

3 讨论

目前, 主要是通过药物控制嗜水气单胞菌引起的病害, 其中抗生素因其效果好、见效快、使用方便、价格低廉等优点, 在水产养殖病害的防治中被广泛使用。但随着养殖环境的不断恶化, 动物机体的免疫功能下降, 细菌引起的病害越发严重, 不合理使用抗生素不仅导致嗜水气单胞菌耐药率大大增强^[23-24], 而且已有研究证实某些养殖水体中的嗜水气单胞菌对多种药物产生了交叉耐药^[25-26]。因此, 迫切需要研究和开发低毒且不容易产生耐药性的抗菌药物。

近年来, 许多结构简单的、天然的、合成或半合成的香豆素类化合物对动物致病菌的抑菌(杀菌)活性得到了广泛研究^[20]。Céspedes 等^[27]研究结果表明, C-7 和 C-8 可能是香豆素类化合物拥有抗菌活性的重要位点, 且 7, 8-二羟基-6-甲氧基香豆素的抑菌活性优于 7, 8-二羟基香豆素。因此, 本研究选取 7, 8-二羟基-6-甲氧基香豆素—秦皮素, 研究其对嗜水气单胞菌的抑菌作用。

现有研究证明秦皮素对金黄色葡萄球菌^[16]、大肠埃希菌^[17]、霍乱弧菌^[18]等不同细菌都有明显的抑菌效果, 秦皮素对金黄色葡萄球菌^[16]、大肠埃希菌^[17]和霍乱弧菌^[18]的 MIC 分别为 10 μg/mL、40 μg/mL 和 25 μg/mL。本研究结果表明, 秦皮素对嗜水气单胞菌的 MIC 为 128 μg/mL, 说明秦皮素对嗜水气单胞菌抑菌作用相对较弱, 这可能是物种差异所致。而另一些研究中发现, 没食子酸^[28]和绿原酸^[29]对嗜水气单胞菌的 MIC 均为 250 μg/mL, 相

比较而言, 秦皮素抑菌效果较好, 可能是由于不同中草药成分抑菌效果不同。彭金菊等^[30]采用水提法制备秦皮药液, 发现其对嗜水气单胞菌的 MIC 为 100 mg/mL; 而李春涛等^[31]发现秦皮水提液的 MIC 为 7.81 mg/mL, 之间的差异可能与后者将中草药原液的 pH 调至中性有关。秦皮水提液对嗜水气单胞菌的抑菌效果没有秦皮素好, 这可能是因为秦皮提取物中抑菌成分是由多种成分组成, 且刘丽梅等^[32]证实秦皮提取物中抑菌效果由高到低依次为秦皮素、秦皮乙素、秦皮甲素、秦皮苷。

生长曲线指定量描述液体培养基中微生物群体生长规律的曲线, 能够显示出细菌从开始生长到死亡的动态全过程。在细菌生长的各个时期中, 对数生长期的菌体繁殖速度最快, 生理代谢的各方面表现都非常活跃, 但此时细菌对外界环境因素也最为敏感^[33]。作者通过测定菌液 OD₆₀₀ 来绘制不同秦皮素浓度作用下, 嗜水气单胞菌的生长曲线, 并分析比较其生长曲线特点。生长曲线分析结果显示秦皮素浓度大于 16 µg/mL 时, 嗜水气单胞菌生长缓慢, 其进入对数生长期的时间也明显延长, 说明秦皮素对嗜水气单胞菌的生长有明显的抑制作用。李洋等^[34]发现熊果酸在亚抑菌浓度时, 金黄色葡萄球菌的生长曲线也有进入对数期时间延迟的现象; 但也有研究表明, 穿心莲内酯对铜绿假单胞菌^[35](*Pseudomonas aeruginosa*) 和猪链球菌^[36](*Streptococcus suis*) 生长无明显影响。说明不同中草药对细菌生长的影响机制并不一致, 中草药防治细菌性疾病的效果并非一定通过抑制细菌生长来实现, 而关于秦皮素抑制嗜水气单胞菌生长的机制需要进一步研究。生物膜是细菌生长过程中为适应生存环境而在生物或非生物表面生成的一种与游离菌相对应的存在形式^[37]。其形成能力受温度, 酸碱度, 起始菌液浓度, 钙、镁离子浓度等因素的影响^[38]。穿心莲内酯能够有效抑制猪链球菌生物膜的形成, 且这种抑制作用随药物剂量的增加而增强^[36]。而秦皮素对嗜水气单胞菌有抑菌作用时, 对嗜水气单胞菌生物膜的形成反而有一定的促进作用。喻华英等^[39]也发现夏枯草在抑制大肠埃希菌生长的同时, 对其生物

膜的生长具有促进作用, 两者结果相似。这可能是因为秦皮素抑制嗜水气单胞菌生长时, 对其生物膜有一定的刺激作用, 具体机制还需进一步探讨。

病原菌的致病与其产生的毒力因子密切相关, 从发病水生动物病灶分离得到的嗜水气单胞菌均有气溶素和胞外蛋白酶等毒力因子的检出, 目前学者们认为嗜水气单胞菌致病是由多种毒力因子共同作用的结果^[40]。鉴于直接杀灭或抑制细菌生长的抗生素类药物对细菌耐药的选择压力较大^[26], 本研究开展了非抑菌浓度下, 秦皮素对嗜水气单胞菌抑菌作用的研究, 拟通过秦皮素干预嗜水气单胞菌致病力, 进而达到防治嗜水气单胞菌感染的目的。研究结果表明秦皮素对嗜水气单胞菌的脂肪酶活性、运动性和溶血性基本没有抑制作用, 仅对嗜水气单胞菌的蛋白酶活性具有一定的抑制作用。

综上所述, 秦皮素对嗜水气单胞菌的 MIC 为 128 µg/mL, 具有一定的抑菌功效。而在非抑菌浓度下, 秦皮素对嗜水气单胞菌毒力的抑制作用有限, 单从药物与细菌之间的作用效果而言, 以低浓度秦皮素用于嗜水气单胞菌的防治意义不大, 但是由于药物在体内的作用不单单只是影响病原微生物, 其对宿主也存在影响, 而鉴于中草药在机体调节方面的复杂性, 因此判定低浓度秦皮素是否能用于鱼体嗜水气单胞菌的防治, 仍有待进一步补充体内试验数据。

参考文献:

- [1] Zhou Y, Zhou Q B. A review of the method in prevent and control the harm of *Aeromonas hydrophila*[J]. Biological Disaster Science, 2012, 35(2): 126-133, 141. [周宇, 周秋白. 嗜水气单胞菌防控技术研究进展[J]. 生物灾害科学, 2012, 35(2): 126-133, 141.]
- [2] Grizzle J M, Brunner C J. Infectious diseases of freshwater mussels and other freshwater bivalve mollusks[J]. Reviews in Fisheries Science, 2009, 17(4): 425-467.
- [3] Ma X R, Xue H, Tang J Q. Isolation, identification and drug susceptibility test of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Aquaculture, 2012, 33(8): 45-47. [马小荣, 薛晖, 唐建清. 克氏原螯虾致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产养殖, 2012, 33(8): 45-47.]
- [4] Liang L G, Xie J. Isolation and identification, virulence fac-

- tor detection, and susceptibility test of pathogen *Aeromonas hydrophila* isolated from *Mylopharyngodon piceus*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2013, 32(12): 3236-3242. [梁利国, 谢骏. 青鱼病原嗜水气单胞菌分离鉴定、毒力因子检测及药敏试验[J]. 生态学杂志, 2013, 32(12): 3236-3242.]
- [5] Zhao J, Wang L. Changes in serum indices of *Schizothorax prenanti* challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fisheries Science, 2015, 34(3): 178-181. [赵静, 王利. 齐口裂腹鱼感染嗜水气单胞菌后血清指标的变化[J]. 水产科学, 2015, 34(3): 178-181.]
- [6] Meng Y, Zeng L B, Yang Y Q, et al. Isolation and identification of the ascitesis disease pathogen of giant salamander, *Andrias davidianus*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science), 2009, 37(3): 77-81. [孟彦, 曾令兵, 杨焱清, 等. 大鲵腹水病病原菌的分离与鉴定研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(3): 77-81.]
- [7] Chen X Z, Gong Y Q, Kong F D, et al. Study on *Aeromonas hydrophila* collected from the cultured *Crocodilus porosus*[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2003, 42(3): 369-373. [陈信忠, 龚艳清, 孔繁德, 等. 湾鳄(*Crocodilus porosus* Schneider)嗜水气单胞菌研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(3): 369-373.]
- [8] Pan X C, Ling Z S, Zhang Q, et al. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from chickens[J]. China Animal Quarantine, 2003, 20(9): 23-25. [潘学昌, 凌宗师, 张群, 等. 肉鸡中嗜水气单胞菌分离与鉴定[J]. 中国动物检疫, 2003, 20(9): 23-25.]
- [9] Yang S M, Wang M S. *Aeromonas hydrophila* and its pathogenesis to humans[J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2006, 10(5): 511-514. [杨守明, 王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(5): 511-514.]
- [10] Niu Z W, Fan H L, Lyu X L, et al. Meta analysis on antibacterial effects of four kinds of traditional Chinese medicines on *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(1): 144-150. [牛志伟, 范华龙, 吕小丽, 等. 4 种中药对嗜水气单胞菌抑菌效果的 Meta 分析[J]. 南方农业学报, 2017, 48(1): 144-150.]
- [11] Zhang L, Yang X, Li X Y, et al. Application of Chinese herbal medicine in prevention and treatment of fish diseases[J]. Agriculture and Technology, 2018, 38(3): 132-135. [张亮, 杨星, 李小义, 等. 中草药在鱼病防治中的应用[J]. 农业与技术, 2018, 38(3): 132-135.]
- [12] He A H, Zhang X, Tao L L, et al. *In vitro* antibacterial activity of 6 Chinese herbal medicines against 4 pathogens of freshwater fish[J]. South China Fisheries Science, 2011, 7(2): 73-76. [何爱华, 张曦, 陶琳丽, 等. 6 种中草药对 4 种淡水鱼致病菌体外抑菌作用的研究[J]. 南方水产科学, 2011, 7(2): 73-76.]
- [13] Zhang H B, Yang G F. Killing ability of 12 Chinese herb medicines to bacterium *Aeromonas hydrophila*[J]. Fisheries Science, 2006, 25(1): 16-18. [张海宾, 杨桂芳. 12 种中草药对嗜水气单胞菌杀伤能力的研究[J]. 水产科学, 2006, 25(1): 16-18.]
- [14] Xiao H, Su Z X, Shan J J, et al. Experimental research on anti-bacterial effect of 16 kinds of Chinese herbal medicine on *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 2(3): 53-56. [肖辉, 苏振霞, 单娟娟, 等. 16 种中草药提取物对嗜水气单胞菌的体外抑菌实验[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(3): 53-56.]
- [15] Cao H F, Song J F, Li G Q, et al. Study on bacteriostatic action of Chinese herbal medicine on *Aeromonas hydrophila* ST-3-3[J]. Guiding Journal of TCM, 2007, 13(5): 86-88. [曹红峰, 宋靖芳, 李国庆, 等. 中草药对嗜水气单胞菌 ST-3-3 抑菌作用的研究[J]. 中医药导报, 2007, 13(5): 86-88.]
- [16] Wang Y J. Antibacterial mechanism of fraxetin on *Staphylococcus aureus*[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2012: 8-11. [汪业菊. 秦皮素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性及其机制研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2012: 8-11.]
- [17] Liu S, Xie K P, Zou D, et al. A preliminary study: inhibitory mechanism of fraxetin on *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26(10): 1123-1126. [刘爽, 谢鲲鹏, 邹丹, 等. 秦皮素对大肠埃希菌作用机制的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(10): 1123-1126.]
- [18] Yang L, Yao X Y, Ding W. The advances on antibacterial activity of coumarins[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(2): 332-338. [杨亮, 姚晓远, 丁伟. 香豆素类化合物的抑菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(2): 332-338.]
- [19] Vasudevan P, Nair M K M, Annamalai T, et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 92(1-2): 179-185.
- [20] Yang Q, Anh N D Q, Bossier P, et al. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 584.
- [21] Chu W H, Zhou S X, Zhu W, et al. Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 5446.
- [22] Luo G, Huang L X, Su Y Q, et al. *flr A*, *flr B* and *flr C* regulate adhesion by controlling the expression of critical virulence genes in *Vibrio alginolyticus*[J]. Emerging Microbes & Infections, 2016, 5(8): e85.
- [23] Li A H, Cai T Z, Wu Y S, et al. Investigation on drug resistance of fish bacterial pathogen—*Aeromonas hydrophila* in China[J]. Microbiology China, 2001, 28(1): 58-63. [李爱华,

- 蔡桃珍, 吴玉深, 等. 我国鱼类病原——嗜水气单胞的耐药性研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 58-63.]
- [24] Tong Z W, Zhang L Q, Wang W H, et al. Analysis the infection and antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2008, 20(1): 75-76. [童照威, 张龙琪, 王伟洪, 等. 嗜水气单胞菌感染现状及耐药分析[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(1): 75-76.]
- [25] Cai L J, Xu B Q, Lin Q C. Comparison and analysis of drug resistance to moribund bacterium *Aeromonas hydrophila* isolated from aquatic animals[J]. Fisheries Science, 2011, 30(1): 42-45. [蔡丽娟, 许宝青, 林启存. 水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J]. 水产科学, 2011, 30(1): 42-45.]
- [26] Wang M Z, Chen C F, Liu Z X, et al. *In vitro* study on drug-resistance characteristics of *Aeromonas hydrophila* to tetracyclines and fluoroquinolones[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(1): 89-93. [王美珍, 陈昌福, 刘振兴, 等. 嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类药物的耐药性研究[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(1): 89-93.]
- [27] Céspedes C L, Avila J G, Martínez A, et al. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(10): 3521-3527.
- [28] Lu J, Wang Z N, Chen R, et al. *In vitro* antibacterial activity of several Chinese medicine monomers and antibiotics on *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(6): 1128-1132. [卢静, 王振宇, 陈锐, 等. 几种中药单体和抗生素对嗜水气单胞菌及温和气单胞菌的体外抑菌活性研究[J]. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1128-1132.]
- [29] Wang H L, Zhang L S, Zhang D S, et al. Study on antibacterial test of *Eucommia ulmoides* leaf extract on hemorrhagic pathogenic bacteria of carp[J]. Feed Industry, 2009, 30(12): 28-30. [王红连, 张凌裳, 张东升, 等. 杜仲叶提取物对鲫鱼出血性病原菌抑菌试验的研究[J]. 饲料工业, 2009, 30(12): 28-30.]
- [30] Peng J J, Ma Y, Luo W Y, et al. Antibacterial effects of 32 kinds of Chinese herbs and compounds against *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2009, 28(6): 5-7. [彭金菊, 马驿, 罗伟英, 等. 32 种中药及其复方对嗜水气单胞菌体外抑菌效果[J]. 中兽医医药杂志, 2009, 28(6): 5-7.]
- [31] Li C T, Chen X, Zhang Q Z, et al. Study on antibacterial effect of 100 Chinese herbal medicines on *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(2): 27-34. [李春涛, 陈霞, 张其中, 等. 100 种中草药体外抑杀嗜水气单胞菌的药效研究[J]. 淡水渔业, 2012, 42(2): 27-34.]
- [32] Liu L M, Wang R H, Chen L, et al. Comparative study on antibacterial action of coumarin monomer and ash bark from different origins[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2009, 16(5): 39-42. [刘丽梅, 王瑞海, 陈琳, 等. 不同基原秦皮、香豆素单体抗菌作用对比研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(5): 39-42.]
- [33] Zhou L. Antibacterial activity and mechanism of fraxetin on *Escherichia coli*[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2013: 8-10. [周磊. 秦皮素对大肠杆菌的抑菌作用机制[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2013: 8-10.]
- [34] Li Y, Xu S C, Liu G F, et al. The inhibition effects of ursolic acid on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2017, 33(2): 158-161. [李洋, 徐硕超, 刘广锋, 等. 熊果酸对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(2): 158-161.]
- [35] Li H T, Qin H M, Wang W H, et al. Effect of andrographolide on QS regulating virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006, 31(12): 1015-1017. [李洪涛, 覃慧敏, 王卫华, 等. 穿心莲内酯对铜绿假单胞菌 QS 毒力因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 1015-1017.]
- [36] Wang J Y, Jiang X W, Wang N, et al. Effect of andrographolide on the biofilm formation of *Streptococcus suis*[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2018, 49(3): 629-636. [王金玉, 姜晓文, 王娜, 等. 穿心莲内酯影响猪链球菌生物被膜形成[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(3): 629-636.]
- [37] Feng F, Qu Y P, Ma Y Z. Factors affecting the formation of *Aeromonas hydrophila* biofilm[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2018, 59(5): 871-874. [冯富, 曲业鹏, 马有智. 嗜水气单胞菌生物被膜形成的影响因素[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(5): 871-874.]
- [38] Mao X X, Qin Y X, Zou W Z, et al. Characteristics of biofilm formation of pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 371-378. [毛秀秀, 覃映雪, 邹文政, 等. 致病性嗜水气单胞菌生物膜的形成特性[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 371-378.]
- [39] Yu H Y, He J. Effects of five Chinese herbal medicines on the formation of *Escherichia coli* biofilm[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 45(7): 74-77. [喻华英, 何靖. 五味中草药对大肠杆菌生物膜形成的影响[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(7): 74-77.]
- [40] Qiu J Q, Yang X L, Cheng X J. Advances in the characteristics and pathogenic mechanisms of virulence factors in *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2009, 4(8): 616-619. [邱军强, 杨先乐, 程训佳. 嗜水气单胞菌毒力因子特性及作用机理研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(8): 616-619.]

In vitro* antibacterial effect of fraxetin on pathogenic *Aeromonas hydrophila

ZHU Ludan^{1,2}, CHEN Kai², XI Bingwen², XIE Jun^{1,2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: Currently, the strategies for prevention and treatment of bacterial diseases in fish are dominated by the use of drugs such as antibiotics. However, the overuse of antibiotics will continue to cause the development of resistant strains. This leads to ineffective treatment with antibiotics during disease breakouts in aquatic animals. Therefore, research into the development of antibiotics that are low in toxicity and not susceptible to resistance has become an urgent task. Increasing studies on Chinese herbal medicines and their extracts have been performed for the prevention and treatment of bacterial diseases in aquaculture. Fraxetin is a natural simple coumarin compound with good antibacterial effects and inhibitory effects against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Vibrio cholerae*. To provide evidence for the prevention and control of aquaculture diseases, we studied the antibacterial effect of fraxetin on *Aeromonas hydrophila* *in vitro* and on the virulence of pathogenic bacteria. Additionally, the minimum inhibitory concentration (MIC), growth curve, biofilm, lipase activity, motility, protease activity, and hemolysis were evaluated. We determined the MIC using the micro-broth method. The growth curve was determined by OD₆₀₀; biofilm formation was detected by crystal violet staining; bacterial liquid was spotted onto solid medium to determine lipase activity and motility; and the co-culture supernatant was collected to determine protease activity and hemolytic activity. The results showed that fraxetin had significantly inhibited *A. hydrophila*. The culture solution infected by *A. hydrophila* was clear and transparent after 24 h, when the concentration of fraxetin was 128 µg/mL and 256 µg/mL. Therefore, the MIC was 128 µg/mL. The inhibitory effect of fraxetin on *A. hydrophila* was concentration-dependent. Fraxetin significantly inhibited the growth of *A. hydrophila*, when its concentration was more than 16 µg/mL ($P<0.05$). At 8 µg/mL, fraxetin did not significantly inhibit the growth of *A. hydrophila* ($P>0.05$). The logarithmic growth phase was apparently delayed ($P<0.05$), and the concentration of bacterial solution in the plateau was significantly lower than that in the control group, when the concentration of fraxetin was more than 32 µg/mL. When the fraxetin concentration exceeded 16 µg/mL, *A. hydrophila* biofilm formation increased significantly ($P<0.05$). At 8 µg/mL, fraxetin reduced the lipase activity of *A. hydrophila* ($P<0.05$). It had a non-significant effect on the motility and hemolytic activity of *A. hydrophila* when the concentration of fraxetin was 2–8 µg/mL ($P>0.05$); however, fraxetin at these concentrations could decrease the protease activity of *A. hydrophila* ($P<0.05$). Fraxetin presented antibacterial activity against *A. hydrophila*; however, the inhibitory effect of fraxetin on *A. hydrophila* virulence was limited at non-bacterial concentrations. The prevention and control of *A. hydrophila* by low concentrations of fraxetin requires further study; as the drug affects the pathogenic microorganisms as well as the host, considering the complexity of the effects of Chinese herbal medicines in the body.

Key words: fraxetin; *Aeromonas hydrophila*; antibacterial effect; virulence

Corresponding author: XIE Jun. E-mail: xiej@ffrc.cn