



冬凌草甲素对嗜水气单胞菌体外抑菌效果及作用机制

缪玉佳¹, 陈杰豪¹, 梁天雨¹, 陈际唯¹, 梁超¹, 黄小丽²,
陈德芳², 汪开毓¹, 耿毅¹, 欧阳萍^{1*}

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130;

2. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 通过测定冬凌草甲素对嗜水气单胞菌的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)、最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 和对细菌生长的影响, 及其对菌体形态、电导率、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性、蛋白质和 DNA 的影响, 探究冬凌草甲素对耐药性嗜水气单胞菌的体外抑菌作用及其机制。结果显示, 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌具有明显抑制作用, MIC 为 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MBC 为 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当 2MIC 浓度的冬凌草甲素作用于嗜水气单胞菌 CW 株 8、16 h 后, 菌体变形, 细胞壁和细胞膜分离, 细胞质空化。与对照组相比, 药物组菌悬液电导率显著升高, 并且在冬凌草甲素作用 6 h 后达到 5.66%。冬凌草甲素作用 8 h 后嗜水气单胞菌的 LDH 活性降低了 20.8%, 可溶性蛋白含量显著降低。DAPI 染色结果显示, 药物组荧光密度和强度均较对照组弱。DNA 外渗量结果显示, 较对照组上升了 (29.32 \pm 1.02) mg/L。研究表明, 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌具有较强的抗菌作用, 主要通过增加细胞膜的通透性, 干扰蛋白质代谢进而抑制细菌的生长繁殖。

关键词: 嗜水气单胞菌; 冬凌草甲素; 抑菌机制; 菌体形态

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 为气单胞菌属的革兰氏阴性短杆菌, 广泛存在于水环境及土壤中, 也是一种受到世界范围关注的人-畜-鱼共患的病原^[1-2]。Bulger 等^[3]于 1966 年最早报道了嗜水气单胞菌存在感染人的情况, 目前该菌被认为是一种潜在的食源性病原。嗜水气单胞菌产生的一些毒力因子是造成急性胃肠炎, 特别是儿童急性腹泻暴发的潜在原因之一^[4]。黑天鹅、大羚羊、鸭等多种动物^[5-7]也能被自然感染, 主要表现为败血症, 水生动物如草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲤 (*Cyprinus carpio*) 等

感染可引起规模化养殖鱼类的暴发性疾病并造成巨大的经济损失^[8-9]。抗生素作为一类廉价高效的药物, 广泛应用于嗜水气单胞菌病的防控与治疗。然而, 抗生素的误用和滥用不仅在环境中形成药物残留, 而且导致耐药或多重耐药菌株出现。刘训猛等^[10]对来自江西省鱼源的 92 份分离株进行了耐药率检测, 发现分离的嗜水气单胞菌中出现对喹诺酮类、氨基糖苷类和大环内酯类耐药的菌株, 总体表现出耐药谱广、耐药性高的特征^[11]。因此, 为防止临床上出现治疗嗜水气单胞菌感染陷入无药可用的处境, 迫

收稿日期: 2020-09-13 修回日期: 2020-11-07

资助项目: 农业农村部渔药创制重点实验室开放基金 (201702); 四川省科技厅应用基础项目 (21YYJC2011)

第一作者: 缪玉佳 (照片), 从事动物医学研究, E-mail: 1599677845@qq.com

通信作者: 欧阳萍, E-mail: ouyang.ping@live.cn



切需要研发低耐药、无残留且无选择压力的药物。

中药的有效成分不但具备优良体外抗菌作用,还具有抗真菌、抗病毒及提高免疫力等功效,可以替代抗生素或与抗生素联合应用^[12]。探究中药单体的抑菌机理,对促进抗菌药物的发展及应用具有重要意义。冬凌草甲素(oridonin)是唇形科(Labiatae)植物冬凌草(*Rabdosia rubescens*)的活性成分之一,有抗肿瘤、抗菌、抗炎和抗氧化等多种药理作用,具有较大的潜在应用价值^[13-14]。研究表明,冬凌草甲素可以抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及甲、乙型溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)的生长^[15],但作用机制尚不清楚。本实验通过冬凌草甲素在体外对嗜水气单胞菌的菌体形态、细胞膜通透性、蛋白质和DNA代谢的作用,研究其抑菌机理,为开发安全、高效的抗耐药性嗜水气单胞菌的药物研发提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和主要试剂

嗜水气单胞菌CW (GenBank: MN428791)分离自濒死的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*),对庆大霉素、新霉素、阿莫西林和四环素耐药,由四川农业大学水生动物疾病实验室鉴定并保存^[16]。冬凌草甲素(HPLC纯度>98%; CAS no. 104-55-2)购于成都瑞芬思有限公司,溶于二甲基亚砜(DMSO, Sigma-Aldrich, 美国)中,制成质量浓度为40.96 mg/mL的原液备用。乳酸脱氢酶测定试剂盒购于南京建成生物工程有限公司。

1.2 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌抑菌效果的测定

采用二倍稀释法^[17]测定冬凌草甲素对嗜水气单胞菌的MIC(最低抑菌浓度, minimum inhibitory concentration)和MBC(最低杀菌浓度, minimum bactericidal concentration)值。在96孔板中,对冬凌草甲素进行连续二倍稀释,使其终浓度分别为1024、512、256、128、64、32、16和8 $\mu\text{g/mL}$,再向每个孔加入 1×10^8 CFU/mL的菌液5 μL ,设置只加入菌液的阳性对照和加入DMSO的溶剂对照组。在28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置培养24 h后,观察每个孔的澄清程度,肉眼可见无菌生长的冬凌草甲素的最低浓度为该药对CW株的MIC值。

根据MIC的结果,取20 μL 澄清孔中的培养液在LB固体琼脂培养基中进行涂布。于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h,观察平板中菌落的生长情况,以不生长菌落或生长菌落数低于5个所对应的冬凌草甲素的最小浓度为MBC值。所有实验均重复3次。

1.3 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌生长的影响

为了确定冬凌草甲素对嗜水气单胞菌CW株生长的影响,采用分光光度法^[18-20]分别建立经过和未经药物处理的CW的生长曲线。将过夜培养的CW菌悬液按1%的比例接入200 mL的LB液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min振荡培养至 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 为0.3,平均分装在4个锥形瓶内。实验组加入终浓度分别为1/2MIC、MIC、2MIC的冬凌草甲素,对照组加入同体积的DMSO,置于28 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min振荡培养。分别于0、1、2、4、6、8、10、12、20和24 h取样,用分光光度计测量此时的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值,并制作生长曲线。

1.4 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌菌体形态的影响

向处于对数期的CW菌株($\text{OD}_{600\text{ nm}}=1.0$)中加入终浓度为2MIC的药物,充分混匀,置于28 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min恒温摇床中培养。于4、8和16 h取样。4 h的培养物在4500 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心10 min,弃上清液,用无菌PBS(pH=7.4)重悬洗涤3次,离心收集沉淀物。沉淀经2.5%戊二醛固定液充分固定,制片,进行扫描电子显微镜观察(scanning electron microscopy, SEM)^[21]。为进一步观察药物对细菌内部结构的作用,取8和16 h的样品按上述透射电镜样本制作方法进行相同处理,制片后进行透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察^[22]。

1.5 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌膜通透性的影响

参照Yuan等^[17]的方法测定菌悬液的电导率。即将对数期的菌株CW($\text{OD}_{600\text{ nm}}=1.0$)用无菌PBS洗涤3次,离心弃去上清液,用无菌的5%葡萄糖溶液将菌体重悬为 1×10^7 CFU/mL的菌悬液,实验组加入终浓度为2MIC的冬凌草甲素,对照组用相同体积的DMSO处理,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养。于0、1、2、4、6和8 h取样,离心收集上清液并立即测定电导率。

1.6 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌乳酸脱氢酶(LDH)活性的影响

将培养至对数期 ($OD_{600\text{ nm}}=1.0$) 的 CW 菌液与终浓度为 2MIC 的冬凌草甲素混合均匀, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 150 r/min 恒温振荡培养, 加入相同体积的 DMSO 为对照组。分别在 0、1、2、4、6 和 8 h 取样, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 离心收集下层沉淀。将沉淀重悬于 1 mL 无菌 PBS 中, 用超声破碎仪对菌体进行破碎, 离心收集上清液, 使用乳酸脱氢酶测定试剂盒对上清液的 LDH 活性进行测定。

1.7 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌可溶性蛋白的影响

将 100 mL 处于对数期的菌液, 均匀分装于 2 只锥形瓶中。加入冬凌草甲素使其终浓度为 2MIC, 并设置 DMSO 的溶剂对照组, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 150 r/min 共培养。于 4、8、16 和 24 h 取样, 离心后用无菌 PBS 洗涤 3 次, 离心弃上清液, 再用 1 mL 无菌 PBS 重悬下部沉淀, 用超声破碎仪破碎菌体, 离心收集上清液。取 $40\text{ }\mu\text{L}$ 上清液与 $10\text{ }\mu\text{L}$ $5\times$ 蛋白上样缓冲液混匀, 煮沸 10 min。选用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 电泳完毕后使用考马斯亮蓝 R250 染色过夜, 煮沸脱色, 并在凝胶成像仪中成像。

1.8 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌 DNA 外渗量的影响

将 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 1.0 的 CW 菌悬液离心, 用无菌 PBS 洗涤 2 次, 重悬于无菌 PBS 液中使菌浓度达到 1×10^6 CFU/mL。向菌悬液中加入终浓度为 2MIC 的冬凌草甲素, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 150 r/min 恒温培养箱中培养。对照组用相同体积的 DMSO 处理。于 0、1、2、4、6 和 8 h 取样, 4500 r/min 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 收集上清液。使用微量分光光度计测定上清液的 $OD_{260\text{ nm}}$ 值, 计算 DNA 含量, 并以时间为横坐标, DNA 含量为纵坐标作图。

1.9 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌 DNA 的影响

在培养至对数期的 CW 菌液中, 加入终浓度为 2MIC 冬凌草甲素, 对照组用同体积的 DMSO 处理, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 150 r/min 振荡培养。于 0、2、4 和 8 h 进行采样, 用无菌 PBS 洗涤离心 3 次后, 收

集沉淀。用 4% 的多聚甲醛处理下部沉淀 10 min, 重新悬浮于 1 mL 的无菌 PBS 中。取 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, $10\text{ }\mu\text{g/mL}$) 染料和菌液各 $500\text{ }\mu\text{L}$ 混合均匀, 在黑暗中静置 10 min。样品在 8000 r/min 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 3 min, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 去除 DAPI 染料残渣。样品重新悬浮于 $200\text{ }\mu\text{L}$ 无菌 PBS 中, 取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 样品滴于无菌载玻片上涂抹均匀, 在荧光显微镜下进行观察。

1.10 数据分析

每个实验重复 3 次, 使用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行差异显著性分析 (t 检验)。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 MIC 和 MBC 的测定

冬凌草甲素浓度 $\geq 256\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 培养基澄清透明, 表明在该浓度下 CW 的生长繁殖被抑制。取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 培养物在 LB 培养基中均匀涂布培养, 24 h 后 $512\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以及更高浓度的冬凌草甲素作用后无菌落生长, 实验结果显示冬凌草甲素对嗜水气单胞菌 CW 株的 MIC 和 MBC 值分别为 256 和 $512\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌生长曲线测定

冬凌草甲素对嗜水气单胞菌 CW 株生长的影响如图 1 所示。CW 快速进入对数生长期并保持较高的浓度, 8~10 h 进入稳定缓慢增长的阶段。 $1/2\text{MIC}$ 浓度 ($128\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的冬凌草甲素延缓了菌株 CW 进入稳定期的时间, 对生长有一定抑制作用; MIC 浓度 ($256\text{ }\mu\text{g/mL}$) 和 2 MIC 浓度 ($512\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的冬凌草甲素对嗜水气单胞菌的生长具有明显的抑制作用。

2.3 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌菌体形态的影响

冬凌草甲素对嗜水气单胞菌 CW 菌体形态的影响如图版所示。对照组的 SEM 观察可见菌体光滑完整、边界清晰 (图版-1), 冬凌草甲素 ($512\text{ }\mu\text{g/mL}$) 作用 4 h 后菌体变形, 表面出现明显缺损和坍塌 (图版-2)。TEM 观察结果显示, 对照组的菌体结构清晰、形态饱满、细胞膜细胞壁完整、原生质体分布均匀 (图版-3, 5); 经冬凌草甲素 ($512\text{ }\mu\text{g/mL}$) 处理 8 和 16 h 后, 随着时间推移,

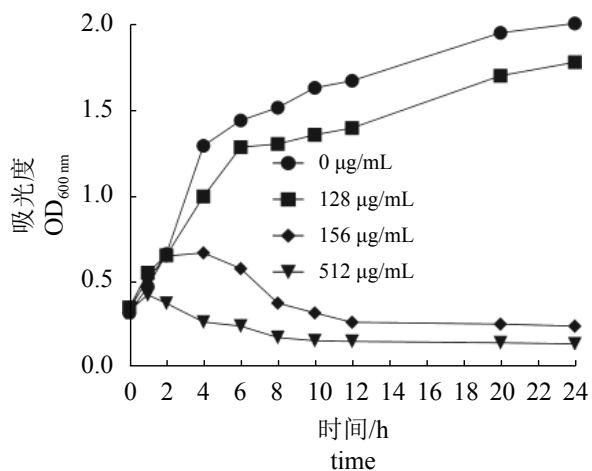


图1 不同浓度的冬凌草甲素对嗜水气单胞菌CW株生长的影响

Fig. 1 Effect of oridonin at different concentrations on the growth of CW strain

越来越多细菌变形、细胞膜细胞壁分离，细胞内容物流失，出现内部空化现象(图版-4, 6)。

2.4 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌膜通透性的影响

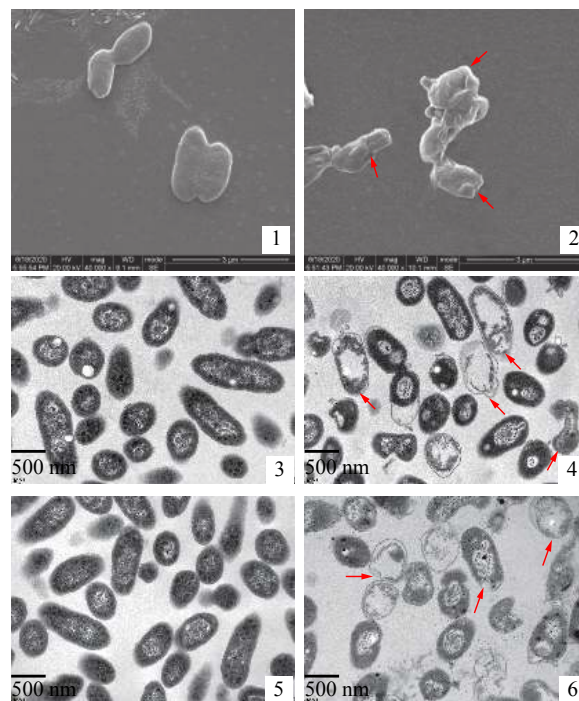
对冬凌草甲素与嗜水气单胞菌CW株共培养后的电导率变化进行测量，药物组电导率在0~6 h有明显提高，在6 h时达到最大值5.66%，8 h开始下降，与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。结果表明冬凌草甲素能够显著增加嗜水气单胞菌CW细胞膜的通透性(图2)。

2.5 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌LDH活性的影响

LDH是生物代谢中的一种重要酶^[23]，冬凌草甲素和嗜水气单胞菌共培养1和2 h后，LDH的活性开始下降，在4、6和8 h后，药物组LDH的活性明显低于对照组($P < 0.05$)，LDH的活性较对照组分别降低了10.9%、8.3%和20.8%($P < 0.05$)。研究结果证实冬凌草甲素可降低嗜水气单胞菌LDH的活性(图3)。

2.6 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌可溶性蛋白的影响

通过SDS-PAGE测定了冬凌草甲素对嗜水气单胞菌可溶性蛋白的影响，对照组可溶性蛋白在各个时间点条带无明显变化(图4通道1、3、5、7)。与对照组比较，冬凌草甲素作用后蛋白条带颜色变浅、数目减少(图4通道2、4、6、8)，作用时间越长蛋白浓度越低，有些蛋白条带(25~



图版 冬凌草甲素(512 µg/mL)不同作用时间对菌体细胞形态结构的影响

1. 4 h 对照组 SEM 观察；2. 冬凌草甲素(512 µg/mL)作用 4 h 后 SEM 观察菌体形态；3. 8 h 对照组 TEM 观察；4. 冬凌草甲素(512 µg/mL)作用 8 h 后 TEM 观察菌体形态；5. 16 h 对照组 TEM 观察；6. 冬凌草甲素(512 µg/mL)作用 16 h 后 TEM 观察菌体形态

Plate Morphology of *A. hydrophila* cells observed by a scanning electron microscope(SEM) and a transmission electron microscope (TEM)

1. untreated *A. hydrophila* cells after 4 h (SEM). 2. *A. hydrophila* cells treated with oridonin (512 µg/mL) for 4 h (SEM). 3. Untreated *A. hydrophila* cells after 8 h (TEM). 4. *A. hydrophila* cells treated with oridonin (512 µg/mL) for 8 h (TEM). 5. Untreated *A. hydrophila* cells after 16 h (TEM). 6. *A. hydrophila* cells treated with oridonin (512 µg/mL) for 16 h (TEM)

50 ku)甚至消失，表明冬凌草甲素对嗜水气单胞菌可溶性蛋白的表达具有明显抑制作用。

2.7 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌DNA外渗量的影响

为了研究冬凌草甲素对嗜水气单胞菌细胞膜完整性的影响，冬凌草甲素与嗜水气单胞菌CW株共培养2、4、6和8 h后对DNA外渗量进行了测定^[17]。对照组的DNA外渗量在各个时间点都维持在一个较低的水平(图5)。2MIC浓度冬凌草甲素作用1 h后DNA外渗量较对照组上升了(29.32±1.02) mg/L ($P < 0.01$)，随后稳定在29.6~31.1 mg/L(图5)。因此，冬凌草甲素能增加嗜水气单胞菌CW株细胞膜的通透性，提高DNA的外渗量。

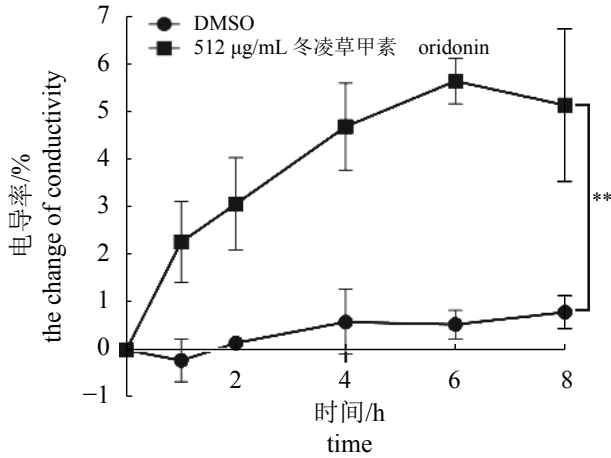


图 2 冬凌草甲素 (512 µg/mL) 对嗜水气单胞菌电导率的影响

“***”表示差异极显著 ($P<0.01$), 下同

Fig. 2 Effect of oridonin (512 µg/mL) on the conductivity of CW strain

“***”indicates most significant differences ($P<0.01$), the same below

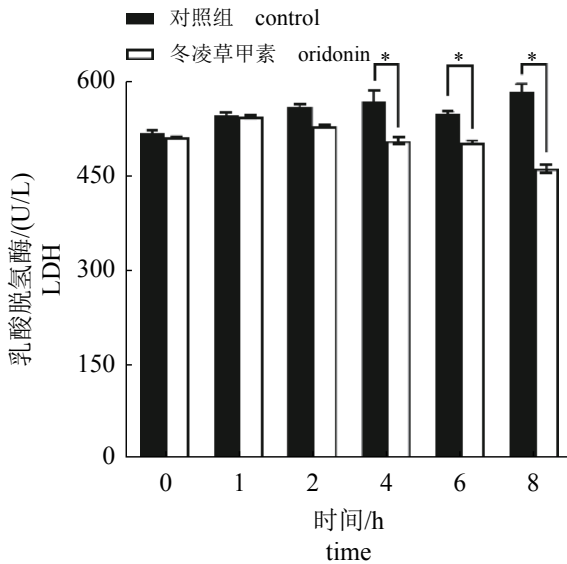


图 3 冬凌草甲素 (512 µg/mL) 对嗜水气单胞菌 CW 株 LDH 活性的影响

“*”表示差异显著 ($P<0.05$)

Fig. 3 Effect of oridonin on the LDH activity of CW strain

“*”indicates significant differences ($P<0.05$)

2.8 冬凌草甲素对嗜水气单胞菌 DNA 影响的 DAPI 染色观察

DAPI 可以透过完整的细胞膜与细胞内 DNA 双链结合, 在紫外线激发下呈现特定的荧光, 核酸量越大, 荧光强度越强^[24]。为研究冬凌草甲素

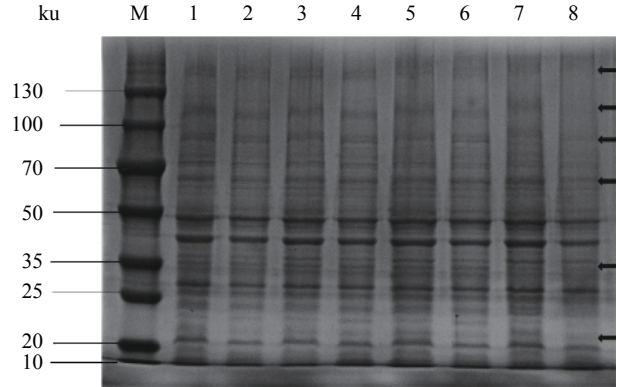


图 4 冬凌草甲素 (512 µg/mL) 对嗜水气单胞菌可溶性蛋白质的影响

M. Marker; 1、3、5 和 7 分别为对照组在 4、8、16 和 24 h 的泳道; 2、4、6 和 8 分别为冬凌草甲素 (512 µg/mL) 作用 4、8、16 和 24 h 的泳道

Fig. 4 Effect of oridonin (512 µg/mL) on soluble protein of CW strain

M. Marker; lanes 1, 3, 5 and 7 untreated cells for 4, 8, 16 and 24 h, respectively; lanes 2, 4, 6 and 8 treated cells with 512 µg/mL oridonin for 4, 8, 16 and 24 h, respectively

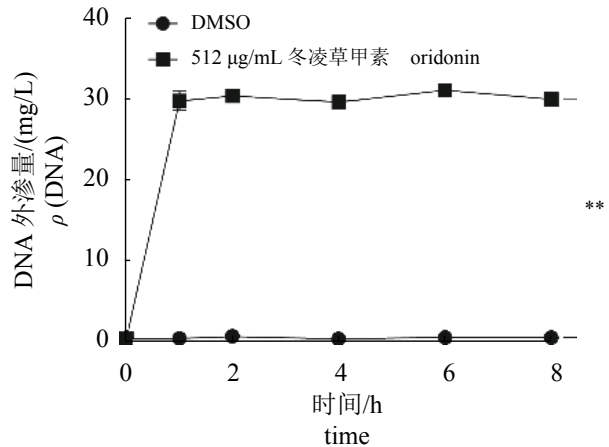


图 5 冬凌草甲素 (512 µg/mL) 对 CW DNA 外渗量的影响

Fig. 5 Effect of oridonin (512 µg/mL) on DNA exosmosis amount of CW strain

对嗜水气单胞菌 DNA 的影响, 共培养 0、2、4 和 8 h 后进行 DAPI 染色观察, 与对照组相比, 实验组的荧光强度随着作用时间延长而逐渐减弱 (图 6), 实验组中的核酸含量要明显低于对照组, 可能由于冬凌草甲素作用后嗜水气单胞菌细胞膜通透性升高导致胞内核酸流失。

3 讨论

细菌耐药性问题日趋严重, 目前尚无细菌

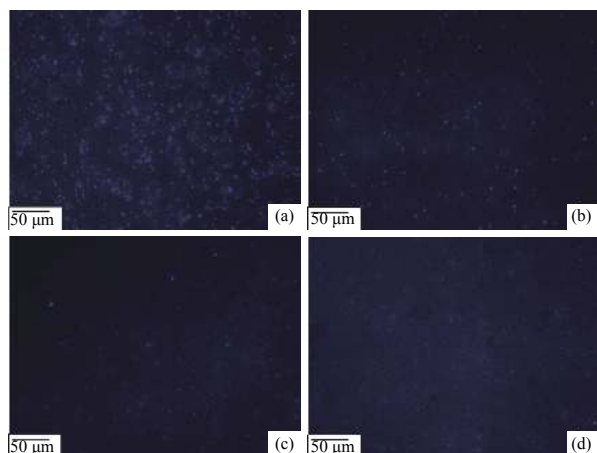


图6 冬凌草甲素(512 µg/mL)对嗜水气单胞菌作用后 DAPI 染色观察

(a) 0 h 对照组; (b) 冬凌草甲素(512 µg/mL)处理 2 h; (c) 冬凌草甲素(512 µg/mL)处理 4 h; (d) 冬凌草甲素(512 µg/mL)处理 8 h

Fig. 6 Fluorescence intensity of *A. hydrophila* DNA after being treated or untreated with oridonin

(a) untreated cells, (b) cells treated with oridonin (512 µg/mL) for 2 h, (c) cells treated with oridonin (512 µg/mL) for 4 h, (d) cells treated with oridonin (512 µg/mL) for 8 h

对中药抗菌有效成分耐药的报道^[25]。我国传统中草药宝库包含繁多的药物, 中药单体的药理研究和应用具有广阔的前景。前期研究发现, 冬凌草甲素药理作用广泛, 可以抑制多种细菌如金黄色葡萄球菌的生长繁殖^[15,26-27]。本实验研究了冬凌草甲素对耐药性嗜水气单胞菌的抑菌机制, 为以冬凌草甲素作为替代药物控制耐药性嗜水气单胞菌感染提供理论和实验基础。

冬凌草甲素能够抑制嗜水气单胞菌 CW 株的生长繁殖, MIC 和 MBC 值分别为 256 和 512 µg/mL。生长曲线显示冬凌草甲素作用后生长速率从对数生长期开始显著降低, MIC 和 2MIC 浓度能够抑制嗜水气单胞菌生长。细胞膜具有一定的选择通透性, 是隔开菌体胞质和外界环境的屏障, 保证了细菌内环境的稳定^[28]。许多中药单体成分如小檗碱、肉桂醛等的抑菌机制均与细胞膜通透性有关^[16,22]。冬凌草甲素与嗜水气单胞菌共培养后, SEM 观察可见菌体缺损变形, TEM 可见菌体细胞壁和细胞膜分离、菌体破碎、细胞质流失, 出现空化现象。另一方面, 冬凌草甲素作用后菌悬液的电导率明显升高, 该结果与 Yuan 等^[17]关于冬凌草甲素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的电导率结果一致。这说明冬凌草甲素可以增加细菌细胞壁、细胞膜的通透性, 造

成大量内容物外流, 从而干扰细菌的生长和代谢。

蛋白质是生命活动的基础, 大多数可溶性蛋白质是参与细菌各种代谢活动的酶, 能够调节细菌的渗透压, 保证细菌正常生命活动的进行^[28]。SDS-PAGE 结果显示药物作用后可溶性蛋白含量明显减少, 纠敏等^[29]也证实冬凌草甲素能显著降低金黄色葡萄球菌的可溶性蛋白。LDH 是一种在细菌无氧代谢中有重要作用的蛋白酶^[24], 关于 LDH 研究表明, 冬凌草甲素作用后 LDH 的活性较对照组逐渐降低, 该变化与 SDS-PAGE 结果一致, 说明了冬凌草甲素能够干扰细菌蛋白质代谢。

DNA 作为一种生物大分子, 一般不会透过细胞壁和细胞膜渗出到胞外环境中, DNA 外渗量可以反映细胞膜结构的完整程度。DNA 外渗量增加表明冬凌草甲素能增加细菌细胞膜、细胞壁的通透性。DAPI 是一种可以穿透活细胞细胞膜与 DNA 特异性结合的荧光染料, 被广泛应用于组织学、分析细胞学和生物化学中^[30]。样品中核酸含量越大, 结合的荧光染料越多, 显示的荧光亮度就越强^[31]。DAPI 染色结果显示随着作用时间的延长, 实验组的荧光密度和强度均降低, 该结果与 DNA 外渗量大的结果一致, 推测细菌细胞膜和细胞壁通透性升高使胞内核酸含量降低。已有研究表明类黄酮化合物能显著干扰 DNA 拓扑异构酶的活性, 进而抑制核酸合成^[32], 但冬凌草甲素对核酸的具体作用机制还需进一步的研究。

已有的临床试验表明, 冬凌草无明显毒副作用, 可以用于治疗炎症, 对于急慢性咽炎、牙龈炎、扁桃体炎均有较好的疗效^[33-34]。陈珊^[3]报道了冬凌草提取物对局部烧伤动物模型的外用治疗安全有效, 对正常皮肤感染和深层感染均有较好的抗感染效果。目前, 中草药防治水产动物疾病具有广阔前景^[35], 本研究表明, 冬凌草甲素具有治疗耐药性嗜水气单胞菌疾病的潜力, 但需进一步进行动物实验对其安全性和治疗效果进行评估。

4 结论

冬凌草甲素对耐药性嗜水气单胞菌具有抑制作用, 通过破坏菌体形态, 改变细胞膜的通透性, 干扰菌体正常的生长代谢来抑制细菌生长。因此, 冬凌草甲素可作为治疗耐药性嗜水

气单胞菌感染的潜在药物, 今后需要通过动物实验评估该药的安全性和有效性。

参考文献 (References):

- [1] Rasmussen-Ivey C R, Figueras M J, McGarey D, *et al.* Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1337.
- [2] FernAndez-Bravo A, Figueras M J. An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 129.
- [3] Bulger R J, Sherris J C. The clinical significance of *Aeromonas hydrophila*. Report of two cases[J]. *Archives of Internal Medicine*, 1966, 118(6): 562-564.
- [4] Pal M, Ayele Y, Durglishilvi N. Emerging role of *Aeromonas hydrophila* as a foodborne pathogen of public health concern[J]. *EC Microbiology*, 2020, 16(5): 55-58.
- [5] 单云芳, 钟震宇, 李俊芳. 黑天鹅嗜水气单胞菌与肠致病性大肠埃希菌混合感染的诊断[J]. *野生动物学报*, 2021, 42(1): 245-248.
- Shan Y F, Zhong Z Y, Li J F. Diagnosis of the death of black swan caused by mixed infection of *Aeromonas hydrophila* and *Enteropat*[J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2021, 42(1): 245-248 (in Chinese).
- [6] 刘真超. 一例大羚羊感染嗜水气单胞菌的诊断[J]. *农业灾害研究*, 2020, 10(1): 22-23, 40.
- Liu Z C. Diagnosis of *Aeromonas hydrophila* infection in *Tragelaphus oryx*[J]. *Journal of Agricultural Catastrophology*, 2020, 10(1): 22-23, 40 (in Chinese).
- [7] 陈国权, 吴征卓, 姚碧琼, 等. 鸭源致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定与生物学特性分析[J]. *中国家禽*, 2020, 42(4): 34-40.
- Chen G Q, Wu Z Z, Yao B Q, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics analysis of pathogenic *Aeromonas hydrophila* from ducks[J]. *China Poultry*, 2020, 42(4): 34-40 (in Chinese).
- [8] 徐先栋, 付辉云, 饶毅, 等. 草鱼暴发性出血病病原分离、毒力基因检测与药敏分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(3): 350-358.
- Xu X D, Fu H Y, Rao Y, *et al.* The virulence characteristics and drug susceptibility of outbreak hemorrhage disease pathogen isolated from grass carp *Ctenopharyngodon idyllus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(3): 350-358 (in Chinese).
- [9] Rasmussen-Ivey C R, Hossain M J, Odom S E, *et al.* Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1615.
- [10] 刘训猛, 方苹, 陈静, 等. 江苏省渔源性嗜水气单胞菌耐药性分析[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(8): 110-114.
- Liu X M, Fang P, Chen J, *et al.* Analysis on drug resistance of fishery-source *Aeromonas hydrophila* in Jiangsu Province[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(8): 110-114 (in Chinese).
- [11] 任亚林, 李耘, 韩刚, 等. 水产品中嗜水气单胞菌耐药性研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(5): 759-765.
- Ren Y L, Li Y, Han G, *et al.* Research advances in drug resistance of *Aeromonas hydrophila* in fishery[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(5): 759-765 (in Chinese).
- [12] 翟贵星, 陆璐, 陈代杰, 等. 中药化合物的抗菌及增效作用[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(12): 1366-1370.
- Zhai G X, Lu L, Chen D J, *et al.* Antimicrobial and synergistic effects of traditional Chinese medicine compounds[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019, 44(12): 1366-1370 (in Chinese).
- [13] Yang Y C, Lin P H, Wei M C. Production of oridonin-rich extracts from *Rabdosia rubescens* using hyphenated ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(10): 3323-3332.
- [14] Li D H, Han T, Xu S T, *et al.* Antitumor and antibacterial derivatives of oridonin: a main composition of Dong-Ling-Cao[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 575.
- [15] 刘净, 梁敬钰, 谢韬. 冬凌草研究进展[J]. *海峡药学*, 2004, 16(2): 1-7.
- Liu J, Liang J Y, Xie T. Development of *Rabdosia rubescens* Hara[J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2004, 16(2): 1-7 (in Chinese).

- [16] Yin L Z, Chen J H, Wang K Y, *et al.* Study the antibacterial mechanism of cinnamaldehyde against drug-resistant *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 145: 104208.
- [17] Yuan Z W, Ouyang P, Gu K X, *et al.* The antibacterial mechanism of oridonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2019, 57(1): 710-716.
- [18] 吴海霞. 银杏种仁抑菌蛋白及其抑菌机制研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2014.
- Wu H X. Study on antimicrobial activity and mechanism of protein from *Ginkgo biloba* seeds[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2014(in Chinese).
- [19] 何学文, 戴雨芸, 李欣越, 等. 肉桂醛体外对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌机制[J]. *江西农业大学学报*, 2020, 42(1): 150-156.
- He W X, Dai Y Y, Li X Y, *et al.* Antibacterial mechanism of cinnamaldehyde on *Salmonella typhimurium in vitro*[J]. *Journal of Jiangxi Agricultural University*, 2020, 42(1): 150-156 (in Chinese).
- [20] 刘唤明, 孙力军, 王雅玲, 等. 纳豆菌抗菌脂肽对副溶血弧菌的抑菌机理探讨[J]. *食品科学*, 2012, 33(15): 201-205.
- Liu H M, Sun L J, Wang Y L, *et al.* Antibacterial mechanism of lipopeptide from *Bacillus natto* against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Food Science*, 2012, 33(15): 201-205 (in Chinese).
- [21] Zhang J, Ye K P, Zhang X, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 7: 2094.
- [22] Zhang Y T, Feng R Z, Li L X, *et al.* The antibacterial mechanism of terpinen-4-ol against *Streptococcus agalactiae*[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(9): 1214-1220.
- [23] 梁秉绍, 杨丽媛, 董慧, 等. 金黄色葡萄球菌LDH多克隆抗体制备及其交叉反应性[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(33): 6436-6439.
- Liang B S, Yang L Y, Dong H, *et al.* Preparation of polyclonal antibody against lactate dehydrogenase of *Staphylococcus aureus* and research of its cross reactivity[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(33): 6436-6439 (in Chinese).
- [24] 许雅苹, 郑晓辉, 房纯正, 等. DAPI染色法在流式细胞术中去除死细胞影响的探讨[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(9): 1660-1664, 1674.
- Xu Y P, Zheng X H, Fang C Z, *et al.* A methodology study on elimination the influence of dead cells stained with DAPI[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2019, 19(9): 1660-1664, 1674 (in Chinese).
- [25] 刘昊, 王秀东, 曹凯捷, 等. 中药及其有效成分抗细菌耐药性的研究进展[J]. *现代畜牧兽医*, 2019, 9: 54-57.
- Liu H, Wang X D, Cao K J, *et al.* Advances in research on antibacterial resistance of traditional Chinese medicine and its effective components[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, 9: 54-57 (in Chinese).
- [26] 冯卫生, 李红伟, 郑晓珂, 等. 冬凌草化学成分研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17(23): 2003-2007.
- Feng W S, Li H W, Zheng X K, *et al.* Progress in studies of chemical compositions from *Isodon rubescens*[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2008, 17(23): 2003-2007 (in Chinese).
- [27] 李钦, 冯卫生. 冬凌草化学成分、药理作用及开发研究进展[J]. *河南中医学院学报*, 2003, 18(6): 31-33.
- Li Q, Feng W S. The latest development of researches on the chemical constituents and pharmacological activity of *Rabdosia rubescens* (Heml.) Hara[J]. *Journal of Henan University of Chinese Medicine*, 2003, 18(6): 31-33 (in Chinese).
- [28] 袁中伟, 谷可欣, 张天翼, 等. 松萝酸对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2019, 54(4): 22-29.
- Yuan Z W, Gu K X, Zhang T Y, *et al.* Antibacterial mechanism of usnic acid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2019, 54(4): 22-29 (in Chinese).
- [29] 纠敏, 闫鹏, 闫国庆, 等. 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(7): 202-206.

- Jiu M, Yan P, Yan G Q, *et al.* Antibacterial mechanism of rubescensine a against *Staphylococcus aureus*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(7): 202-206 (in Chinese).
- [30] Schoor S, Lung S C, Sigurdson D, *et al.* Fluorescent staining of living plant cells[M]//Yeung E C T, Stasolla C, Sumner M J, *et al.* Plant microtechniques and protocols. Cham: Springer, 2015: 153-165.
- [31] 王海涛, 王倩, 谢明杰. 大豆异黄酮对金黄色葡萄球菌的抑菌机制研究[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(7): 2586-2591.
- Wang H T, Wang Q, Xie M J. Anti-bacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(7): 2586-2591 (in Chinese).
- [32] Górnaiak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2019, 18(1): 241-272.
- [33] 陈姗. 以冬凌草提取物为主成分的局部抗菌外用药的研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2013.
- Chen S. Research on a topical external antibacterial agent mainly containing extracts of *Rabdosia rubescens*[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2013(in Chinese).
- [34] Chen S, Liu J R, Zhang H D. Efficacy of rabdosia rubescens in the treatment of gingivitis[J]. *Journal of Huazhong University of science and Technology[Medical Sciences]*, 2009, 29(5): 659-663.
- [35] 徐晓津, 李秀华, 马一帆, 等. 复方中草药及其与抗生素联用对斜带石斑鱼溶藻弧菌病的治疗效果[J]. *水产学报*, 2019, 43(5): 1338-1346.
- Xu X J, Li X H, Man Y F, *et al.* Effects of traditional Chinese compound prescription and antibiotics treating in *Vibrio alginolyticus* diseases of *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(5): 1338-1346 (in Chinese).

Antibacterial mechanism of oridonin against *Aeromonas hydrophila* *in vitro*

MIAO Yujia¹, CHEN Jiehao¹, LIANG Tianyu¹, CHEN Jiwei¹, LIANG Chao¹, HUANG Xiaoli²,
CHEN Defang², WANG Kaiyu¹, GENG Yi¹, OUYANG Ping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. College of Animal Science, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* is known as a common pathogen of human, animal and fish worldwide, which is of great significance to aquaculture and public health. Currently, antibiotics as a kind of high effective and widely used medicine are used in the prevention, control and treatment of *A. hydrophila* infections. However, abuse of antibiotics caused the problem of drug-resistant strains. New sustainable drugs to control bacterial infection needed to be studied. In recent years, the active ingredients extracted from traditional Chinese herbal medicine have excellent antibacterial effects *in vitro*, not easy to develop drug resistance and being able to reverse the properties of bacterial resistance. And these characteristics merit attention. The objective of this study is to analyze the potential inhibitory mechanism of oridonin against *A. hydrophila*, to provide a theoretical basis for the control of drug-resistant *A. hydrophila* infection using oridonin as an alternative drug. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and the effect of growth curve were measured in this study. Morphological changes in *A. hydrophila* following oridonin treatment were determined with scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The effects of lactate dehydrogenase (LDH) and soluble proteins were detected by lactic dehydrogenase kits and polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Electrical conductivity was analysed to study oridonin effects on cell membrane. Effect of oridonin on *A. hydrophila* cell membrane was measured based on electrical conductivity. Oridonin had definite inhibitory activity on *A. hydrophila*, and the MIC and MBC values of oridonin were 256 µg/mL and 512 µg/mL, respectively. After treating *A. hydrophila* (CW) with 2 MIC oridonin, SEM images showed the surface roughness and collapse of the bacteria, and TEM images showed that the structure of the bacteria was damaged, the cell membrane and cell wall were separated, and the cytoplasm showed vacuolation, while the control group showed no significant changes. 6 h later, the conductivity level of oridonin-treated *A. hydrophila* CW reached by 5.66% ($P < 0.05$), indicating that oridonin changed cell membrane and wall permeability of CW strain. The results of content of LDH showed that oridonin reduced the formation of LDH by 20.8% ($P < 0.05$). SDS-PAGE results show that the soluble protein content was lower compared with the control group, indicating that oridonin inhibited the protein metabolism of bacteria. It was shown that density and intensity of fluorescence decreased and DNA exosmosis level improved by (29.32 ± 1.02) mg/L ($P < 0.01$). Thus, the decrease of DNA content caused by oridonin affected the cell membrane and cell wall. The results demonstrated that oridonin could inhibit the growth of *A. hydrophila* significantly by increasing the permeability of cell membrane and affecting the metabolism of protein.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; oridonin; antibacterial mechanism; cell morphology

Corresponding author: OUYANG Ping. E-mail: ouyang.ping@live.cn

Funding projects: Open Project of State Key Laboratory of Fishery Drug Development (201702); Project of Sichuan Science and Technology Department (21YYJC2011)