

和厚朴酚对嗜水气单胞菌气溶素表达的抑制作用

董靖 胥宁 刘永涛 张露珊 杨秋红 杨移斌 周顺 宋怿 艾晓辉

THE INHIBITORY EFFECT OF HONOKIOL ON AEROLYSIN SECRETION BY *AEROMONAS HYDROPHILA*

DONG Jing, XU Ning, LIU Yong-Tao, ZHANG Lu-Shan, YANG Qiu-Hong, YANG Yi-Bin, ZHOU Shun, SONG Yi, AI Xiao-Hui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.066>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

白藜芦醇抑制嗜水气单胞菌毒力作用研究

RESVERATROL INHIBITS GROWTH, VIRULENCE AND BIOFILM FORMATION OF *AEROMONAS HYDROPHILA*

水生生物学报. 2019, 43(4): 861–868 <https://doi.org/10.7541/2019.102>

嗜水气单胞菌感染青鱼肝脏的蛋白质组学分析

QUANTITATIVE PROTEOMICS ANALYSIS OF LIVER OF BLACK CARP *MYLOPHARYNGODON PICEUS* UNDER *AEROMONAS HYDROPHILA* INFECTION

水生生物学报. 2019, 43(2): 330–339 <https://doi.org/10.7541/2019.041>

AmoA、AmoE和AmoF蛋白在嗜水气单胞菌铁载体合成中的作用研究

ROLE OF AMOA, AMOE, AND AMOF PROTEINS FOR SIDEROPHORE SYNTHESIS OF *AEROMONAS HYDROPHILA*

水生生物学报. 2019, 43(3): 486–493 <https://doi.org/10.7541/2019.060>

翘嘴鲌病原嗜水气单胞菌分子特征及LAMP检测方法的建立

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ESTABLISHMENT OF LAMP DETECTION METHOD OF PATHOGENIC *AEROMONAS HYDROPHILA* ISOLATED FROM *SINIPERCA CHUATSI*

水生生物学报. 2017, 41(6): 1225–1231 <https://doi.org/10.7541/2017.152>

嗜水气单胞菌cpxRA缺失株构建及生物学特性研究

CONSTRUCTION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS ANALYSIS OF *CPXRA* MUTANT IN *AEROMONAS HYDROPHILA*

水生生物学报. 2018, 42(1): 1–10 <https://doi.org/10.7541/2018.001>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.066

和厚朴酚对嗜水气单胞菌气溶素表达的抑制作用

董靖¹ 胥宁¹ 刘永涛¹ 张露珊¹ 杨秋红¹
杨移斌¹ 周顺¹ 宋恽² 艾晓辉¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 420223; 2. 中国水产科学研究院, 北京 100039)

摘要: 为了研究不同浓度和厚朴酚对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)致病力的影响, 筛选抗嗜水气单胞菌感染的天然化合物, 通过溶血试验、免疫印迹试验、荧光定量PCR试验和动物试验进行了研究。结果发现, 和厚朴酚能在亚抑菌浓度下降低嗜水气单胞菌培养物上清中的溶血活性; 蛋白免疫印迹试验发现和厚朴酚能降低嗜水气单胞菌气溶素的分泌; 荧光定量PCR试验进一步表明和厚朴酚与嗜水气单胞菌共培养后降低了气溶素编码基因的转录而降低气溶素的分泌。此外, 通过动物试验发现和厚朴酚治疗能显著提高斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)嗜水气单胞菌感染模型的存活率。以上研究表明, 和厚朴酚能通过降低气溶素编码基因的转录而降低嗜水气单胞菌的致病力, 和厚朴酚是一种潜在的新型抗嗜水气单胞菌感染的先导化合物。

关键词: 嗜水气单胞菌; 气溶素; 和厚朴酚; 感染

中图分类号: S917.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)03-0541-05

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种常见的条件性致病菌, 广泛存在于自然界中, 可引起水生动物、陆生动物和人的多种感染性疾病^[1]。嗜水气单胞菌是淡水养殖的主要病原菌之一, 常引起养殖鱼类的严重疾病, 是严重威胁水产养殖业健康发展的重要病原菌^[2]。长期以来, 水产养殖动物嗜水气单胞菌感染的治疗主要依赖于抗菌药物, 但由于抗菌药物的长期不合理使用导致嗜水气单胞菌出现了严重的耐药性^[3]。此外, 化学抗菌药物在水产养殖中的广泛使用对水环境造成了一定程度的污染^[4]。近年来研究表明, 嗜水气单胞菌的致病力与其分泌的外毒素密切相关, 因此抗毒力策略成为近年来研究抗嗜水气单胞菌感染药物的新途径^[5]。

嗜水气单胞菌能分泌多种毒力因子, 包括溶血素、气溶素和肠毒素等。气溶素是嗜水气单胞菌分泌的主要毒力因子, 与嗜水气单胞菌的致病性密切相关, 是鉴别致病性嗜水气单胞菌的标志^[6]。气溶素具有溶血性、肠毒性和细胞毒性, 成熟的气溶素能结合到真核细胞表面特定的糖蛋白受体, 插入

细胞膜的脂质双分子层并形成具有孔道的七聚体, 破坏细胞的渗透压平衡并导致细胞死亡^[7]。气溶素对多种真核动物细胞敏感。研究发现, 敲除气溶素基因的嗜水气单胞菌相比较野生型其致病力显著下降甚至消失^[8]。因此, 气溶素成为研究抗嗜水气单胞菌感染药物的新靶标。

和厚朴酚是中药厚朴的主要成分之一, 具有抗菌、抗炎、抗氧化和抗癌等多种生物学活性^[9]。然而和厚朴酚对嗜水气单胞菌毒力因子表达的影响尚无报道。本研究发现和厚朴酚在亚抑菌浓度下通过抑制嗜水气单胞菌气溶素编码基因的转录降低气溶素的分泌, 降低嗜水气单胞菌的致病力, 从而提高斑点叉尾鲟嗜水气单胞菌感染模型的存活率。

1 材料与方法

1.1 菌株与实验动物

嗜水气单胞菌XS-91-4-1由中国科学院水生生物研究所李爱华研究员馈赠; 健康斑点叉尾鲟(200±10) g由本实验室饲养。

收稿日期: 2019-04-18; 修订日期: 2019-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(31702368); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46)资助 [Supported by the National Nature Science Foundation of China (31702368); China Agriculture Research System (CARS-46)]

作者简介: 董靖(1985—), 男, 助理研究员; 主要从事水产药理学研究。E-mail: dongjing@yfi.ac.cn

通信作者: 艾晓辉(1968—), 男, 研究员; 主要从事水产药理学研究。E-mail: aixh@yfi.ac.cn

1.2 试验材料

和厚朴酚、恩诺沙星(含量>98%)购自中国食品药品检定研究院; TaKaRa RNA PCR kit (AMV)和SYBR Premix Ex Taq购自TaKaRa公司; 兔抗气溶素多克隆抗体由本实验室制备保存; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG二抗购自鼎国生物公司; 脱纤维羊血购自南京茂捷微生物科技有限公司。

1.3 试验方法

最小抑菌浓度(MIC)的测定 采用美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的肉汤微量稀释法测定和厚朴酚、恩诺沙星对嗜水气单胞菌XS-91-4-1的最小抑菌浓度^[10]。

生长曲线 将嗜水气单胞菌XS-91-4-1在BHI液体培养基中培养至对数生长前期($A_{600}=0.3$, 28℃), 将培养菌分别置于6个50 mL的锥形瓶中, 每瓶20 mL, 分别加入不同浓度(1、2、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$)的和厚朴酚, 在28℃条件下继续培养5h, 每30min取菌液测定一次 OD_{600} 的吸收值, 不加药物的锥形瓶设置为阴性对照组。

溶血试验 将嗜水气单胞菌XS-91-4-1在BHI液体培养基中培养至对数生长前期($A_{600}=0.3$, 28℃), 将培养菌分别置于5个50 mL的锥形瓶中, 每瓶10 mL菌液, 分别加入浓度为0、1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$ 的和厚朴酚, 在28℃条件下继续培养至 $A_{600}=0.5$ 时高速离心($8000\times g$, 1min)收集上清液。向收集的上清液中加入终浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的胰蛋白酶在室温反应10min以激活上清液中的气溶素。向1.5 mL离心管中加入100 μL 激活的上清液, 875 μL 溶血缓冲液, 25 μL 脱纤维绵羊红细胞, 充分混匀, 在37℃条件下孵育20min后 $10000\times g$ 离心1min, 取上清液测定 OD_{543} 的吸收值。去离子水作为阳性对照(100%溶血组), 溶血缓冲液作为阴性对照(0溶血组), 每组样品的吸光度与阳性对照的比值作为溶血百分比, 每个浓度组均开展3个独立的重复试验。

免疫印迹试验 将嗜水气单胞菌XS-91-4-1在BHI液体培养基中培养至对数生长前期($A_{600}=0.3$, 28℃), 将培养菌分别置于5个50 mL的锥形瓶中, 每瓶10 mL菌液, 分别加入浓度为0、1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$ 的和厚朴酚, 在28℃条件下继续培养至 $A_{600}=1.5$ 时高速离心($8000\times g$, 1min)收集上清。培养物上清做SDS-PAGE电泳后采用湿法转膜仪将蛋白转印至0.45 μm 的PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭2h, 抗嗜水气单胞菌气溶素抗体常温孵育1h, HRP标记的羊抗兔IgG二抗常温孵育1h, 采用ECL发光液检测上清液中气溶素的含量。

荧光定量PCR试验 将嗜水气单胞菌XS-91-4-1在BHI液体培养基中培养至对数生长前期($A_{600}=0.3$, 28℃), 将培养菌分别置于5个50 mL的锥形瓶中, 每瓶10 mL菌液, 分别加入浓度为0、1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$ 的和厚朴酚, 在28℃条件下继续培养至 $A_{600}=1.5$ 时高速离心($8000\times g$, 1min)收集菌体。菌体采用天根细菌总RNA提取试剂盒提取菌体RNA, 采用TaKaRa RNA PCR kit(AMV)试剂盒合成cDNA, SYBR Premix Ex Taq试剂盒进行荧光定量PCR试验, 通过 $\Delta\Delta C_t$ 法分析气溶素编码基因的表达水平, 以16S rRNA作为内参。每个药物浓度组均开展3个独立的重复试验。

斑点叉尾鲷嗜水气单胞菌感染模型 60尾健康斑点叉尾鲷分别置于3个200 L的玻璃缸中, 每组20尾, 保持水温为28℃, 溶氧5.5—5.7 mg/L, 攻毒前暂养7d。嗜水气单胞菌XS-91-4-1菌株在BHI培养基中培养至对数生长中期($A_{600}=1.0$), 将菌液离心, 菌体用无菌PBS洗涤2次后用麦氏比浊管重悬至 1.5×10^8 CFU/mL, 阳性对照组和治疗组每条鱼腹腔注射200 μL 稀释好的菌液, 阴性对照组腹腔注射200 μL 无菌PBS。治疗组于感染后6h后口灌20 mg/kg的和厚朴酚, 每12h一次, 连续给药3d, 每天观察并记录各组鱼的死亡情况。

统计分析 体外试验数据来自3个独立的试验结果, 以Mean $\pm$ SD表示, 应用SPSS 14.0软件对不同处理组数据进行差异显著性检验; 存活率应用Prism 5.0软件进行log-rank分析。0.01< P <0.05代表差异显著, P <0.01代表差异极显著。

2 结果

2.1 和厚朴酚对嗜水气单胞菌生长的影响

最小抑菌浓度试验结果表明和厚朴酚、恩诺沙星对嗜水气单胞菌XS-91-4-1的MIC分别为32和4 $\mu\text{g/mL}$, 该结果提示和厚朴酚对嗜水气单胞菌XS-91-4-1有一定的抑菌活性, 而该菌株对恩诺沙星呈现一定程度的耐药。当采用不同浓度梯度的和厚朴酚与该菌株共培养后发现, 和厚朴酚浓度在16 $\mu\text{g/mL}$ 以下时对嗜水气单胞菌XS-91-4-1的生长几乎无影响(图1), 该结果提示和厚朴酚在亚抑菌浓度下对嗜水气单胞菌的生长无抑制作用。

2.2 和厚朴酚抑制嗜水气单胞菌上清液的溶血活性

通过溶血试验发现和厚朴酚能剂量依赖性的降低和厚朴酚与嗜水气单胞菌XS-91-4-1菌株共培养上清液的溶血活性。当和厚朴酚的浓度分别为1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$ 时, 嗜水气单胞菌培养物上清的

溶血活性从无药物处理组的83.65%分别下降至65.33%、55.27%、36.48%和18.95% (图2)。

2.3 和厚朴酚抑制嗜水气单胞菌气溶素的表达

通过溶血试验表明, 和厚朴酚处理后可以降低嗜水气单胞菌培养物上清的溶血活性, 为了进一步证实该抑制作用是否由于和厚朴酚处理后抑制了嗜水气单胞菌气溶素的表达而导致的, 本研究通过蛋白免疫印迹试验分析了共培养上清液中气溶素的含量。不同浓度和厚朴酚与嗜水气单胞菌共培养后能降低其培养物上清液中气溶素的表达量 (图3)。

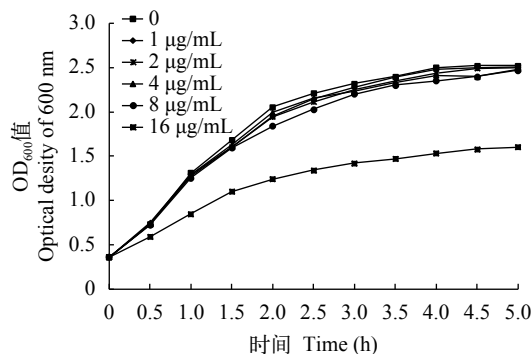


图1 和厚朴酚与嗜水气单胞菌共培养后的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *A. hydrophila* co-cultured with different concentrations of honokiol

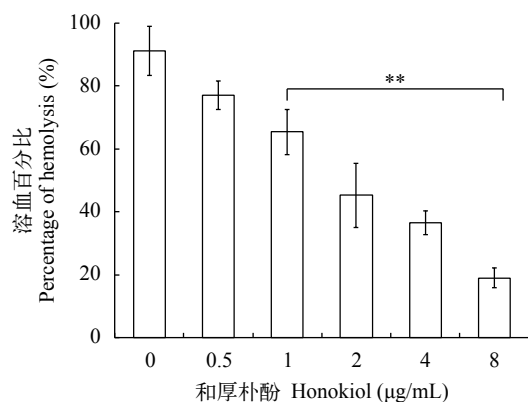


图2 和厚朴酚与嗜水气单胞菌XS-91-4-1共培养上清的溶血活性

Fig. 2 Hemolytic activity of supernatants of *A. hydrophila* XS-91-4-1 co-cultured with honokiol

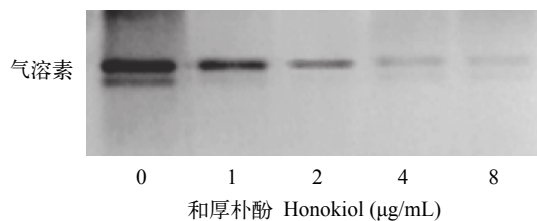


图3 嗜水气单胞菌培养物上清中气溶素的表达量

Fig. 3 Expression of aerolysin in *A. hydrophila* supernatant

2.4 和厚朴酚抑制嗜水气单胞菌aerA基因的转录

嗜水气单胞菌气溶素是由aerA编码的蛋白, 本研究通过荧光定量PCR法分析了和厚朴酚对嗜水气单胞菌气溶素编码基因转录的影响。如图4所示, 与空白组相比, 和厚朴酚处理后嗜水气单胞菌aerA基因的转录降低, 当药物浓度为8 µg/mL时aerA基因的转录下调了5.26倍。

2.5 和厚朴酚治疗能降低斑点叉尾鲷感染模型的死亡率

根据体外试验结果发现和厚朴酚能显著降低气溶素的表达, 提示其对斑点叉尾鲷嗜水气单胞菌感染模型有潜在的治疗作用。治疗试验发现, 阳性对照组8d内存活率为10%(图5), 感染鱼出现了体表溃疡等症状; 口灌20 mg/kg和厚朴酚的试验鱼存活率为70%(图5); 阴性对照组存活率为100%(图5); 与阳性对照组相比, 和厚朴酚治疗后其存活率显著提高。该结果表明, 和厚朴酚对斑点叉尾鲷嗜水气单胞菌感染具有良好的治疗效果。

3 讨论

抗生素是20世纪医学上最伟大的发现之一, 成

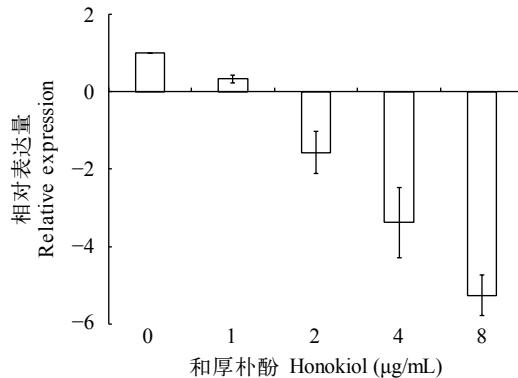


图4 和厚朴酚对aerA基因表达的影响

Fig. 4 The effect of honokiol on the expression of aerA gene

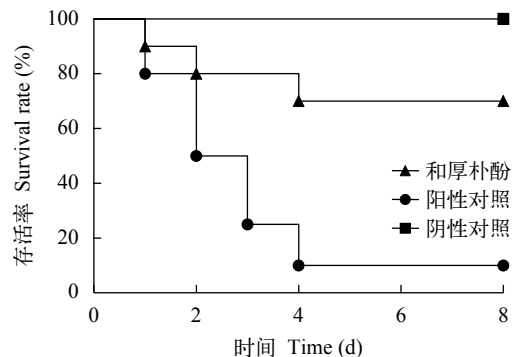


图5 和厚朴酚对斑点叉尾鲷嗜水气单胞菌感染模型的治疗作用

Fig. 5 The protective effect of honokiol against *A. hydrophila* infection in a channel catfish model

为治疗动物和人类细菌性感染的主要手段,有力保障了人类健康和养殖业的健康发展^[11]。自青霉素应用于临床治疗细菌性感染后,大量的抗生素被相继发现^[12]。尽管抗菌药物的发现和使用为临床治疗细菌性感染做出了巨大贡献,但由于长期的不合理使用导致了大量耐药菌甚至多重耐药菌的产生^[13]。自20世纪60年代开始,化学抗菌药物在水产养殖中的应用日益广泛,但随后也带来了严重的耐药性问题,对人类的健康也造成了潜在的威胁^[14]。因此,亟待研发新的抗菌药物以应对耐药菌感染的挑战。抗毒力药物是近年来研究的热点之一,该类药物不会对病原菌的生存造成选择性压力,因此不易导致耐药菌的产生^[15]。

成孔毒素(Pore-forming toxins, PFTs)在细菌致病过程中其重要作用,是一种潜在的抗毒力药物研究靶标,如金黄色葡萄球菌溶血素、肺炎链球菌溶血素和嗜水气单胞菌气溶素等^[16]。Chakraborty等^[8]构建了嗜水气单胞菌气溶素缺失菌株,通过他们的研究发现,气溶素缺失后该菌株对中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞毒性显著下降,对小鼠动物模型的致病剂量显著上升,而回补菌株又获得了与野生型菌株类似的致病力。Rama等^[17]研究发现,迷迭香酸能通过抑制群体感应系统降低嗜水气单胞菌毒力因子的表达而降低其致病力。杜娜等^[18]研究发现,腹腔注射气溶素抗血清对异育银鲫嗜水气单胞菌感染有较好的保护作用。以上研究表明,气溶素可以作为研究抗嗜水气单胞菌感染药物研究的靶标。

和厚朴酚是一种木质素类化合物,通过最小抑菌浓度测定发现其具有一定的抗菌活性。但通过生长曲线试验发现,和厚朴酚在亚抑菌浓度下(8 $\mu\text{g/mL}$ 及以下浓度)对受试嗜水气单胞菌的生长没有影响。Meng等^[19]研究发现,和厚朴酚与李斯特杆菌(*Listeria monocytogenes*)共培养后能通过抑制其溶血素编码基因转录而降低其溶血素在培养物上清中的表达量,从而降低李斯特杆菌的致病力。但和厚朴酚对嗜水气单胞菌气溶素表达的抑制作用尚未有报道。通过本研究发现,1 $\mu\text{g/mL}$ 以上浓度的厚朴酚对嗜水气单胞菌共培养物上清的溶血活性有极显著的抑制作用;蛋白免疫印记和荧光定量PCR试验发现和厚朴酚能通过抑制气溶素编码基因的转录而降低上清液中气溶素的含量。陈江凤等^[20]研究了碳酸氢钠对嗜水气单胞菌气溶素基因表达的影响,发现添加碳酸氢钠能降低气溶素基因等毒力因子的表达,从而提高嗜水气单胞菌对斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)的致死剂

量。但该研究中碳酸氢钠的剂量较高,如作为内服制剂在动物体内难以达到有效浓度。本试验在体外研究部分为了提高和厚朴酚的溶解性将其溶解在二甲基亚砜(DMSO)中,制备了浓度为40960 $\mu\text{g/mL}$ 的储液;体内试验时采用40% PEG400作为溶剂制备了和厚朴酚乳化剂,当给斑点叉尾鲷灌服20 mg/kg剂量时取得了显著($P=0.0019$)的治疗效果^[21]。因此,厚朴酚可以作为治疗斑点叉尾鲷耐药性嗜水气单胞菌感染的候选药物。

参考文献:

- [1] Kozaki S, Asao T, Kamata Y, et al. Characterization of *Aeromonas sobria* hemolysin by use of monoclonal antibodies against *Aeromonas hydrophila* hemolysins [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(8): 1782-1786.
- [2] Pridgeon J W, Klesius P H. Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009 [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 94(3): 249-253.
- [3] Zhang G L, Lü L Q. Directional induction of antibiotics-resistant *Aeromonas hydrophila* and analysis of its multiple drug resistance [J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(6): 56-63. [张国亮, 吕利群. 高度耐药嗜水气单胞菌的定向诱导及其交叉耐药性分析 [J]. *淡水渔业*, 2016, 46(6): 56-63.]
- [4] Ruan Y F, Chen J M, Guo C S, et al. Distribution characteristics of typical antibiotics in surface water and sediments from freshwater aquaculture water in Tianjin suburban areas, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(12): 2586-2593. [阮悦斐, 陈继森, 郭昌胜, 等. 天津近郊地区淡水养殖水体的表层水及沉积物中典型抗生素的残留分析 [J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(12): 2586-2593.]
- [5] Ljungh A, Wadstrom T. *Aeromonas* toxins [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 1981, 15(3): 339-354.
- [6] Li W Y, Zhang W W, Ma X J, et al. Research progress of relevant virulence genes of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(9): 5060-5061, 5064. [李文艳, 张伟伟, 马秀娟, 等. 嗜水气单胞菌相关毒力基因的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(9): 5060-5061, 5064.]
- [7] Li S S, Guo L X, Jiang S X, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of aerolysin gene of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbiology*, 2008(5): 700-704. [李寿崧, 郭立新, 江树勋, 等. 嗜水气单胞菌气溶素基因的克隆与序列分析 [J]. *微生物学通报*, 2008(5): 700-704.]
- [8] Chakraborty T, Huhle B, Hof H, et al. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydro-*

- phila*-associated systemic infections [J]. *Infection and Immunity*, 1987, **55**(9): 2274-2280.
- [9] Lin L, Ding Y. Recent pharmacological development and advances of honokiol [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2011, **27**(1): 110-113. [林琳, 丁一. 和厚朴酚最新药理学研究进展与评述 [J]. 中药药理与临床, 2011, **27**(1): 110-113.]
- [10] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-eighth Edition: Approved Standard M07-A8. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.
- [11] Shi X M, Wang S L. Antibiotic resistance in environment of animal farms [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, **34**(8): 1234-1245. [史晓敏, 王少林. 食品动物养殖环境中细菌耐药性研究进展 [J]. 生物工程学报, 2018, **34**(8): 1234-1245.]
- [12] Clatworthy A E, Pierson E, Hung D T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy [J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, **3**(9): 541-548.
- [13] Shoop W L, Xiong Y, Wiltsie J, *et al.* Anthrax lethal factor inhibition [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(22): 7958-7963.
- [14] Li A H. Antibacterial drugs used in aquaculture and drug resistance of fish bacterial pathogens [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9**(1): 87-91. [李爱华. 水产养殖中使用的抗菌药物及细菌耐药性 [J]. 中国水产科学, 2002, **9**(1): 87-91.]
- [15] Rasko D A, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, **9**(2): 117-128.
- [16] Los F C, Randis T M, Aroian R V, *et al.* Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2013, **77**(2): 173-207.
- [17] Rama Devi K, Srinivasan R, Kannappan A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and virulence factor production in *Aeromonas hydrophila* [J]. *Biofouling*, 2016, **32**(10): 1171-1183.
- [18] Du N. Drug-resistance analysis of *Aeromonas hydrophila* and study on immunoprotective of antiserum of aerolysin [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013: 50-54. [杜娜. 嗜水气单胞菌耐药性分析及气溶素抗血清的免疫保护性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 50-54.]
- [19] Meng R, Zhao Z, Guo N, *et al.* Effect of honokiol on exotoxin proteins listeriolysin O and p60 secreted by *Listeria monocytogenes* [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, **64**(12): 1474-1480.
- [20] Chen J F, Wang G J, Yu E M. Effect of sodium bicarbonate on the pathogenicity and expression of main related virulence genes in *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, **26**(2): 197-202. [陈江凤, 王广军, 郁二蒙. 碳酸氢钠对嗜水气单胞菌致病性及其主要毒力相关基因表达的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2017, **26**(2): 197-202.]
- [21] Liu L, Bao G J. Study on influence of three kinds of emulsifiers on inhibitory effect of magnolol on growth and acid production of *Streptococcus mutans in vitro* [J]. *Chongqing Medicine*, 2013, **42**(14): 1568-1570. [刘琳, 包广洁. 3种乳化剂对厚朴酚抑制变形链球菌生长及产酸作用影响的体外研究 [J]. 重庆医学, 2013, **42**(14): 1568-1570.]

THE INHIBITORY EFFECT OF HONOKIOL ON AEROLYSIN SECRETION BY *AEROMONAS HYDROPHILA*

DONG Jing¹, XU Ning¹, LIU Yong-Tao¹, ZHANG Lu-Shan¹, YANG Qiu-Hong¹,
YANG Yi-Bin¹, ZHOU Shun¹, SONG Yi² and AI Xiao-Hui¹

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: To investigate the effects of honokiol on the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and identify novel drugs against infections caused by *A. hydrophila*, hemolytic assay, Western-Blotting, real-time PCR and animal assay were performed. The results showed that honokiol could inhibit the hemolytic activity of *A. hydrophila* by inhibiting the expression of aerolysin in a co-culture model with sub-inhibitory concentrations. The real-time PCR results revealed that honokiol could suppress the transcription of aerolysin encoding gene *aerA*. Moreover, honokiol treatment could significantly increase the survival rate of the channel catfish infected with *A. hydrophila*. These results demonstrate that honokiol could reduce the pathogenicity of *A. hydrophila* by inhibiting the transcription of *aerA* gene, and that Honokiol is a promising candidate of the novel drug against *A. hydrophila* infections.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; Aerolysin; Honokiol; Infection