

茶多酚对嗜水气单胞菌致病力的抑制作用

张德福¹, 闫天慧^{1,2}, 励建荣¹, 杨秋红², 艾晓辉², 董靖^{2*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013

²中国水产科学研究院长江水产研究所 武汉 420223)

摘要 针对嗜水气单胞菌污染水产品所致动物感染和消费者食源性疾病等问题, 筛选能够抑制嗜水气单胞菌致病力的天然产物茶多酚。溶血试验表明茶多酚对气溶素溶血活性具有直接抑制作用, 通过荧光热漂移和七聚体形成试验分析其作用机制。结果表明, 茶多酚虽在 128 $\mu\text{g/mL}$ 以下不抑制嗜水气单胞菌的生长, 但能在 1~8 $\mu\text{g/mL}$ 直接抑制其主要毒力蛋白气溶素的溶血活性。荧光热漂移和七聚体试验发现, 茶多酚通过与气溶素直接结合, 降低了气溶素七聚体的形成并抑制其活性。细胞试验结果表明, 4~8 $\mu\text{g/mL}$ 茶多酚能对气溶素导致的人肺癌上皮细胞死亡具有显著的保护作用。此外, 50 mg/kg 茶多酚治疗可使斑点叉尾鲷嗜水气单胞菌感染模型的存活率提高至 60%。综上, 茶多酚通过直接与气溶素结合, 抑制气溶素形成功能性七聚体而降低其活性, 从而显著降低嗜水气单胞菌的体内、外致病力。研究结果提示茶多酚可作为抗生素替代或辅助药物用于治疗嗜水气单胞菌相关感染。

关键词 嗜水气单胞菌; 气溶素; 茶多酚; 抗毒力; 水产品

文章编号 1009-7848(2024)01-0021-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.003

水产品是重要的动物蛋白来源之一^[1]。鱼肉具有低脂肪、低胆固醇、高蛋白质和富含人体必需微量营养素等优点, 有助于均衡营养和健康^[2]。水产养殖是全球发展最快的动物性食品生产部门, 在全球粮食安全中占有至关重要的地位^[3]。随着人们生活水平的提高和对水产品需求的增加, 水产养殖在世界范围内迅速发展。自 2000 年以来, 水产养殖方式趋向于集约化, 然而随着集约化养殖的发展, 各类传染性疾病在水产养殖中频繁暴发^[4], 不仅给养殖业带来巨大的经济损失, 还对水产品的食品安全和人类健康造成潜在威胁^[5]。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是广泛分布于淡水养殖环境中的一种人-畜-鱼共患致病菌, 已经成为一种重要的食源性病原菌。其既可以导致多种水产养殖动物患病, 还可以通过受污染的水、患病鱼等导致人类感染败血症、肠道感染、腹泻、皮肤病等疾病^[6]。目前, 已有从水环境、饮用水、废水甚至鱼、虾、肉、牛奶和蔬菜等多种食品中

分离出该菌的报道^[5]。控制嗜水气单胞菌导致的食源性疾病非常重要。

治疗细菌性感染主要依靠抗菌药物, 自 20 世纪 40 年代青霉素首次被用于治疗细菌性疾病以来, 抗菌药物在治疗细菌性感染中发挥着至关重要的作用^[6]。近几十年来, 由于抗菌药物的不规范使用等问题, 导致耐药性细菌的大量产生, 最终严重影响了其治疗效果, 甚至导致治疗失败。此外, 过量使用的抗菌药物在水产品中蓄积, 使残留超标, 水产品质量安全事件频发, 给水产养殖者和进出口贸易造成严重的经济损失^[7-8]。探索新的抗菌策略和研发新的抗菌药物, 是解决细菌耐药性问题和提高水产品质量安全的重要途径。近年来, 越来越多的研究机构将以抗菌或抑菌为目的的药物研发转向干预细菌感染过程。根据该思路产生了许多抗菌药物研发新策略, 其中抗毒力策略成为主要研究方向之一。抗毒力策略是以病原菌分泌的毒力蛋白为靶标, 研究能抑制其分泌或活性的药物, 实现控制病原菌感染的目的^[9]。

嗜水气单胞菌有多种毒力因子参与其致病力, 如气溶素、溶血素、肠毒素和生物被膜等。其中, 气溶素是嗜水气单胞菌分泌的一种蛋白毒素, 并且是嗜水气单胞菌主要的毒力因子之一, 具有溶血性、肠毒性和细胞毒性^[10]。气溶素的成孔机制

收稿日期: 2023-01-25

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2019YFD0901702); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31702368)

第一作者: 张德福, 男, 博士, 副教授

通信作者: 董靖 E-mail: dongjing@yfi.ac.cn

已被清晰阐述^[11],气溶素经胰蛋白酶或其它蛋白酶活化后,方具有活性,活化的气溶素可结合到上皮细胞等敏感细胞表面,并形成具有孔道结构的七聚体,从而破坏细胞膜的通透性屏障而导致细胞死亡^[11]。以气溶素为靶标进行药物筛选,有望成为抗耐药性嗜水气单胞菌感染药物研发的新路径。

茶多酚是存在于茶叶中多酚类物质的总称,包含儿茶素类、黄酮类、酚酸类等成分,其中儿茶素是其主体成分^[12]。大量学者对茶多酚的相关研究表明,茶多酚具有降脂、减肥、调血脂、杀菌、消炎、抗病毒、保肝、护肝等作用^[13]。余春燕等^[12]发现可以通过外源膳食补充茶多酚来预防人与动物的心肌相关疾病。张蒙等^[14]发现氧化型茶多酚可以通过改变高脂饮食老年大鼠的肠道微生物群落结构,从而改善大鼠的健康状况。朱娜等^[15]发现茶多酚中表没食子儿茶素没食子酸酯是抑菌的主要成分,并对饮用水具有一定消毒效果。为研究抗嗜水气单胞菌感染的天然药物,本研究通过生长曲线、溶血活性、荧光热漂移、七聚体形成和体内、外致病力评价等试验,研究了茶多酚的抗嗜水气单胞菌感染作用,为以茶多酚为主要成分的药物研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜水气单胞菌 XS-91-4-1 由本实验室保存;茶多酚、恩诺沙星,中国食品药品检定研究院;脱纤维羊血,南京茂捷微生物科技有限公司;乳酸脱氢酶检测试剂盒、活细胞/死细胞双染试剂盒、ECL 试剂盒,上海翌圣生物科技股份有限公司;纯化气溶素由本实验室通过原核表达纯化获得并保存;抗气溶素多克隆抗体由本实验室制备并保存。

1.2 仪器与设备

生化培养箱 (ZDS-1160)、恒温振荡培养箱 (ZHWHY-100B),上海智成分析仪器制造有限公司;摇床振荡器 (TS-1000),海门市其林贝尔仪器制造有限公司;酶标仪 (680),美国伯乐公司;分光光度计 (UV-1600PC),德润诚生物科技有限公司;高速微量离心机 (D2012),大龙兴创实验仪器北京有限公司;凝胶成像系统 (ChemiScope6000Exp),

上海勤翔科学仪器有限公司。

1.3 最小抑菌浓度测定

采用微量稀释法测定茶多酚、恩诺沙星 2 种药物对嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度 (MIC)^[16]。用 MHB 培养基对药物进行二倍稀释,茶多酚质量浓度由 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释至 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,恩诺沙星质量浓度由 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释至 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔中培养基体积为 100 μL 。嗜水气单胞菌 XS-91-4-1 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至对数生长中期,10 000 $\times g$ 离心 1 min 收集菌体,菌体经 PBS 洗涤后,用 MHB 调整浓度至为 5×10^5 CFU/mL。向每孔中加入 100 μL 菌液,并设置对照。以不长菌的孔中最低的药物浓度作为该药的 MIC。

1.4 生长曲线

从培养皿中无菌挑取 XS-91-4-1 单菌落,在 LB 液体培养基中培养过夜,次日按 1% 比例将培养好的菌液加入到 100 mL 新鲜的培养基中,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中继续振荡培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$ 。分别取 20 mL 菌液分装至 5 个玻璃锥形瓶中加入 128, 64, 32, 16, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的茶多酚,不加药物的菌液作为阴性对照。28 $^{\circ}\text{C}$ 继续振荡培养 5 h,用分光光度计每 30 min 记录 1 次 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 吸光值,绘制生长曲线。

1.5 溶血试验

1.5.1 嗜水气单胞菌培养物上清液的溶血试验

将嗜水气单胞菌 XS-91-4-1 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$,将菌液分装于 6 个无菌锥形瓶中,分别加入 16, 8, 4, 2, 1, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的茶多酚,28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养至嗜水气单胞菌与茶多酚共培养体系 $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.5$ 时,10 000 $\times g$ 离心 1 min 收集菌液上清。向菌液上清中加入胰蛋白酶 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在室温条件下作用 10 min,使菌液上清中的气溶素活化。

溶血试验在 1.5 mL 离心管中进行,溶血体系由 875 μL 溶血缓冲液,100 μL 胰蛋白酶处理后的菌液上清和 25 μL 脱纤维绵羊红细胞组成,充分混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中反应 15 min,然后通过离心 (10 000 $\times g$, 1 min) 去除未裂解的红细胞,取上清液用分光光度计测定 $\text{OD}_{543\text{nm}}$ 处的吸光值。将只加溶血缓冲液和红细胞的试验组作为阴性对照组,0.1% Triton X-100 处理的红细胞作为阳性对

照组。

1.5.2 纯化气溶素的溶血试验 根据之前的研究^[7]用纯化的气溶素测定茶多酚对气溶素溶血活性的影响。茶多酚与纯化气溶素的反应体系为1 mL,首先向离心管中加入溶血缓冲液975 μ L、纯化气溶素(5 μ g/mL)和终质量浓度分别为16,8,4,2,1,0 μ g/mL的茶多酚,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中10 min,使气溶素与药物充分反应,然后加入25 μ L脱纤维绵羊红细胞,充分混匀后,在37 $^{\circ}$ C反应15 min。

1.6 免疫印记试验

取1.5.1中激活的菌液上清作为免疫印迹试验样品,上清液用BCA总蛋白定量试剂盒测定样品中的总蛋白浓度。取适量样品与蛋白上样缓冲液混匀,在100 $^{\circ}$ C水浴锅中煮沸10 min,简短离心(3 000 \times g,1 min)后,取20 μ L样品进行SDS-PAGE电泳。电泳后将凝胶上的蛋白通过半干法转印至PVDF膜上,转印后的膜经5%脱脂奶粉封闭后,加入抗嗜水气单胞菌气溶素抗体常温(25 $^{\circ}$ C)反应1 h,TBST洗涤5次后,加入HRP标记的羊抗兔IgG二抗反应1 h,洗涤后使用ECL试剂检测。

1.7 荧光热漂移试验

荧光热漂移试验采用Protein Thermal Shift染料试剂盒,并按说明书操作。向八排管中加入Thermal Shift缓冲液5 μ L,8 \times Thermal Shift Dye 2.5 μ L,纯化气溶素(终质量浓度10 μ g/mL)1 μ L和茶多酚(终质量浓度32 μ g/mL)0.6 μ L,添加气溶素储存缓冲液,使反应体系补足20 μ L,0.6 μ L DMSO组作为阴性对照。将体系混匀后,将八排管置于实时荧光定量PCR仪上,以1.6 $^{\circ}$ C/min的速度从25 $^{\circ}$ C加热到90 $^{\circ}$ C,在 $E_{\nu}/E_m = 490/530$ 处检测荧光强度。

1.8 七聚体形成试验

按Iacovache等^[18]报道的方法诱导产生七聚体。取质量浓度为2 mg/mL的激活气溶素20 μ L,加入到1.5 mL离心管中,向每管中按比例加入相同体积的茶多酚,使体系中气溶素与茶多酚的物质的量的比与1.5.2溶血试验一致。将混合好的反应体系置于37 $^{\circ}$ C培养箱中反应10 min,然后加入pH值为7.2的HEPES缓冲液,继续将混合物在室温条件下静置孵育1 h,聚丙烯酰胺凝胶电泳

(8%)后观察分析。

1.9 细胞毒性试验

1.9.1 LDH释放试验 人肺上皮细胞(A549)生长在含有10%胎牛血清的DMEM培养基(含100 μ g/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素)中,细胞置于37 $^{\circ}$ C含有5%CO₂细胞培养箱中,静置培养48 h。生长好的细胞加入浓度为0.25%的胰蛋白酶消化,用不含血清的DMEM培养基将细胞重悬并按 1.5×10^5 个/孔接种至96孔细胞培养板中,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的条件下继续培养16 h备用。5 μ g/mL活化气溶素加入茶多酚使其终质量浓度分别达到32,16,8,4,0 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C培养箱中静置反应10 min后,加入到细胞中,37 $^{\circ}$ C继续培养2 h,离心(1 000 \times g,5 min)取上清液,按试剂盒操作步骤加入试剂,反应30 min后,用酶标仪测定波长490 nm处的吸光度。

1.9.2 细胞染色 取1.9.1 LDH试验后的细胞,用无菌PBS洗涤3次,加入活/死细胞染色试剂后,置于暗处反应30 min,用荧光显微镜观察细胞图像并拍照。

1.10 试验治疗学

将90尾体质量为(150 \pm 10)g斑点叉尾鲷随机分为3组,每组30尾,饲养于200 L的玻璃缸中,保持水温为(28 \pm 2) $^{\circ}$ C,溶解氧5.5~5.8 mg/L,分组后在该环境下暂养10 d。嗜水气单胞菌XS-91-4-1在LB液体培养基中振荡培养至OD_{600nm}=1,离心收集菌体;洗涤后将菌液用无菌PBS调整至 1.5×10^8 CFU/mL。茶多酚组和阳性对照组的实验鱼分别通过腹腔注射200 μ L菌液,阴性对照组注射相同体积的无菌PBS,建立嗜水气单胞菌感染模型。茶多酚组在感染后6 h开始口灌50 mg/kg剂量的茶多酚溶液,2个对照组灌服PBS,每12 h一次,连续灌胃3 d。每24 h观察各试验组鱼的活动情况及发病鱼症状,并记录各组鱼的死亡情况。

2 结果与分析

2.1 茶多酚对嗜水气单胞菌生长的影响

MIC测定试验发现,茶多酚对嗜水气单胞菌XS-91-4-1的MIC高于256 μ g/mL,而恩诺沙星为4 μ g/mL。由此可见,茶多酚对嗜水气单胞菌XS-91-4-1基本无抑菌活性,且该菌株对恩诺沙

星具有一定耐药性。为研究不同浓度茶多酚对嗜水气单胞菌生长的影响,绘制了5 h内茶多酚与嗜水气单胞菌共培养的生长曲线。如图1所示,茶多酚质量浓度在16~128 $\mu\text{g/mL}$ 时,嗜水气单胞菌的生长与未添加药物组相比无显著性差异。综上所述,在本试验条件下,质量浓度为16~128 $\mu\text{g/mL}$ 的茶多酚与嗜水气单胞菌共培养后对细菌的生长没有影响。

2.2 茶多酚对气溶素活性的抑制作用

通过共培养试验发现,茶多酚可剂量依赖性的降低共培养物上清液的溶血活性。如图2a所示,当茶多酚质量浓度为1,2,4,8 $\mu\text{g/mL}$ 时,上清液的溶血百分比分别为 $38.58\% \pm 2.65\%$, $28.82\% \pm 2.18\%$, $21.61\% \pm 2.89\%$ 和 $14.58\% \pm 2.16\%$,而空白组溶血百分比为 $79.25\% \pm 4.31\%$ 。当茶多酚质量浓度达到1 $\mu\text{g/mL}$ 及以上时,其溶血百分比与空白组相比差异显著。该结果提示,茶多酚可能通过抑制气溶素表达或活性降低其溶血活性。因此,本试验研究了茶多酚对纯化气溶素和嗜水气单胞菌分泌气溶素活性的影响。如图2b所示,当茶多酚质量浓度为1,2,4,8 $\mu\text{g/mL}$ 时,纯化后的气溶素的溶血百分比从未添加药物处理组的 $86.98\% \pm$

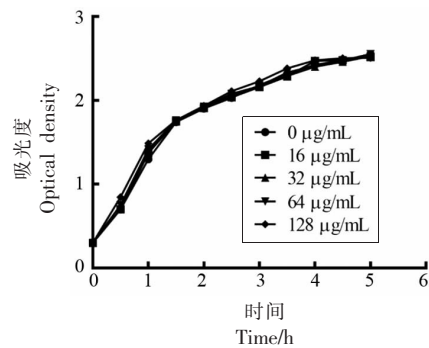
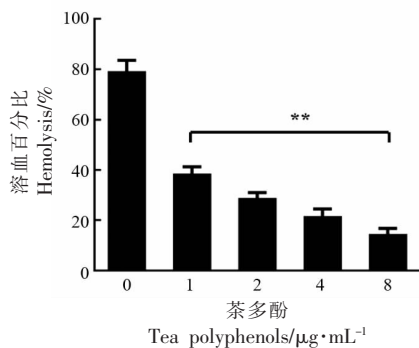


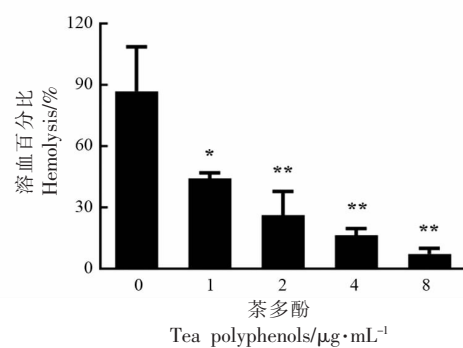
图1 茶多酚与嗜水气单胞菌 XS-91-4-1 共培养的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *A. hydrophila* XS-91-4-1 co-cultured with tea polyphenols

21.81%依次下降到 $44.26\% \pm 2.64\%$, $26.27\% \pm 11.63\%$, $16.37\% \pm 3.27\%$, $7.29\% \pm 2.68\%$,当质量浓度在1 $\mu\text{g/mL}$ 及以上时,差异显著。如图3所示,通过蛋白免疫印迹试验发现,不同质量浓度茶多酚与嗜水气单胞菌共培养后,其上清液中气溶素的含量没有变化。以上3个试验结果表明,茶多酚可在较低质量浓度下通过直接抑制嗜水气单胞菌气溶素的活性,降低其溶血活性,对气溶素的分泌没有影响。



(a)茶多酚对嗜水气单胞菌共培养物上清液溶血活性的抑制作用



(b)茶多酚对纯化气溶素溶血活性的抑制作用

注:*. $P < 0.05$, 差异显著; **. $P < 0.01$, 差异极显著。

图2 茶多酚与气溶素介导的溶血活性的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effects of tea polyphenols against aerolysin mediated hemolysis

2.3 茶多酚提高气溶素的热稳定性

通过荧光热漂移试验研究茶多酚对气溶素热稳定性的影响如图4所示,反应体系中加入32 $\mu\text{g/mL}$ 茶多酚后,使气溶素的 T_m 值向右移动了 $4.8\text{ }^\circ\text{C}$,超过了 $2\text{ }^\circ\text{C}$ 。该结果表明,茶多酚与气溶素

结合后可提高其热稳定性,提示茶多酚与气溶素发生了相互作用。

2.4 茶多酚抑制气溶素的寡聚化

如图5所示,随着茶多酚质量浓度的升高,气溶素七聚体的量逐渐下降,当茶多酚质量浓度达

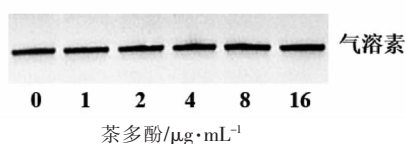


图 3 茶多酚对细菌上清液中气溶素产物的影响
Fig.3 Influence of tea polyphenols on aerolysin production in bacterial supernatants

到 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,未检测到有七聚体形成。气溶素单体通过结合于易感细胞的表面形成具有孔道的七聚体,七聚体导致细胞膜完整性被破坏,最终导致细胞死亡。因此,茶多酚可以通过抑制七聚体的形成来降低气溶素的活性。

2.5 茶多酚对气溶素介导的细胞损伤的保护作用

如图 6 所示,随着茶多酚质量浓度的升高,A549 细胞上清液中 LDH 释放比例逐渐下降。当茶多酚质量浓度分别为 1,2,4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其 LDH 释放百分比分别为 $74.58\% \pm 9.38\%$, $53.49\% \pm 13.57\%$, $46.19\% \pm 7.44\%$, $24.39\% \pm 13.42\%$ 。当茶多酚质量浓度达到 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上时,LDH 下降比例与无药物处理组相比差异显著。细胞染色如图 7a~7c 所示,未经处理的细胞呈绿色(图 7a),表明该细胞为活细胞;用气溶素处理过的细胞表现为红色(图 7b),提示为死亡细胞;气溶素与 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的茶多酚反应后再加入到细胞体系,可见细胞死亡明显减少(图 7c)。以上结果表明,LDH 释放和细胞染色试验均能反映出 A549 细胞经药物处理前、后的损伤或死亡情况,茶多酚处理后可显著降低气溶素介导的细胞损伤。

2.6 茶多酚对斑点叉尾鲷嗜水气单胞菌感染的保护作用

通过体外试验发现,茶多酚对气溶素介导的细胞损伤有显著的保护作用,提示茶多酚对嗜水气单胞菌感染有一定的保护作用。通过腹腔注射的方法构建了斑点叉尾鲷嗜水气单胞菌感染模型。人工感染后,斑点叉尾鲷感染后出现了明显的发病,主要表现为游动失调,体质量下降等,经剖检发现死亡鱼腹腔内有大量积水,肠道内有出血点,与自然感染的症状相同,表明模型构建成功。如图 8 所示,阳性对照组未经任何药物治疗,试验第 8 天时存活率为 3.33%;而灌服 50 mg/kg 茶多酚治疗后斑点叉尾鲷的存活率为 60%,两组差异

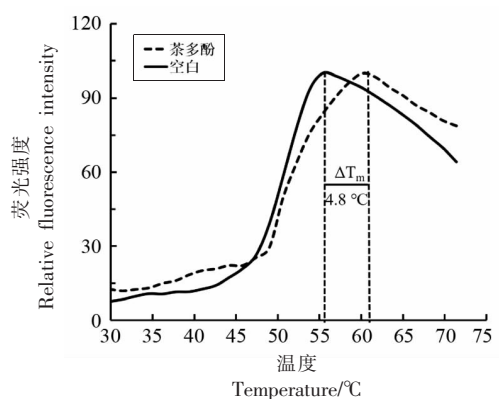


图 4 茶多酚对气溶素热稳定性的影响

Fig.4 Impact of tea polyphenols on thermal stability of aerolysin

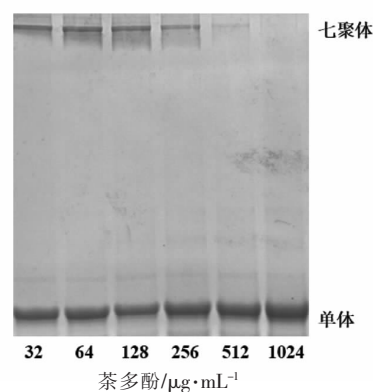
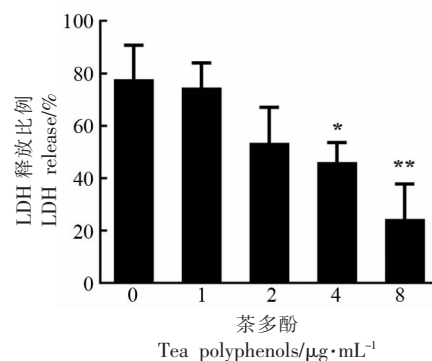


图 5 茶多酚对气溶素七聚体形成的抑制作用

Fig.5 Inhibition of heptamer formation by addition of tea polyphenols



注:*. $P < 0.05$, 差异显著; **. $P < 0.01$, 差异极显著。

图 6 茶多酚对气溶素介导的 A549 细胞 LDH 释放的影响

Fig.6 Impact of tea polyphenols on LDH release of A549 cells mediated by aerolysin

极显著。该研究结果表明,茶多酚可降低嗜水气单胞菌对斑点叉尾鲷的致病力。

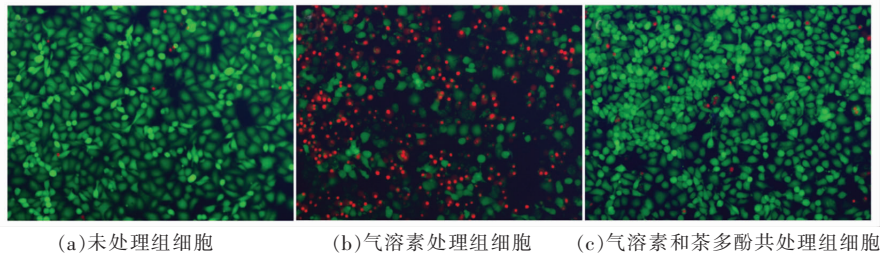


图7 茶多酚对气溶素介导的细胞损伤的保护作用

Fig.7 Protective effect of tea polyphenols on aerolysin mediated cell injury

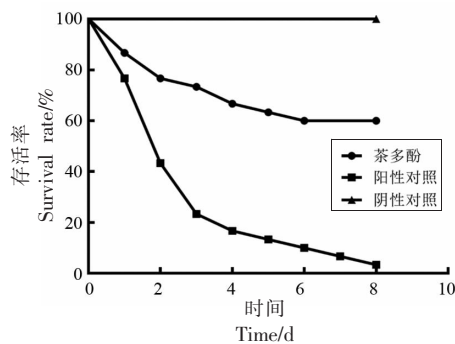


图8 茶多酚对人工感染嗜水气单胞菌的斑点叉尾鮰的治疗作用

Fig.8 Therapeutic effect of tea polyphenols on channel catfish infected with *A. hydrophila*

3 讨论

嗜水气单胞菌可以引起水产动物和人类的多种疾病,已经引起国内外高度重视。戚伟等^[19]在因采食鱼塘水草而患病死亡的仔猪肝脏及病变肠道中发现致病菌株包含嗜水气单胞菌;Vivekanandhan等^[20]对市售的536个鱼类样本和278个对虾样本进行检测分析后发现,对虾和鱼类有不同程度的带菌率;马恩红等^[21]对暴发感染性腹泻事件的研究表明,患者是因饮用了被嗜水气单胞菌所污染的井水而患病。从以上研究可以发现,嗜水气单胞菌对食品安全存在严重的威胁。

抗菌药物被广泛用于水产养殖中细菌性感染的预防和治疗^[22],导致水产养殖中嗜水气单胞菌对抗菌药物产生不同程度的耐药性,并呈现多重耐药的特点^[23]。Vivekanandhan等^[24]从印度南部出售的海鲜中分离出的319株嗜水气单胞菌,均对甲氧西林和利福平耐药,对杆菌肽的耐药率为99%,对其它抗菌药物也有不同程度的耐药。李爱

华等^[25]对我国鱼类嗜水气单胞菌进行耐药性分析发现,26株试验菌株均对青霉素类药物具有耐药性,且多数菌株具有多重耐药性。本研究中嗜水气单胞菌XS-91-4-1对恩诺沙星的最小抑菌浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明该菌对恩诺沙星耐药。

成孔毒素通常是由细菌分泌的一类毒素,在肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、结核分枝杆菌和嗜水气单胞菌等多种重要病原菌的毒力中发挥重要作用。成孔毒素可作用于真核细胞,在其细胞膜上形成寡聚体并产生孔道,从而引起细胞膨胀和溶解。寡聚化是成孔毒素发挥溶细胞活性的必经阶段。因此,抑制寡聚化是中和成孔毒素活性的一种手段。Xie等^[26]发现,金合欢素能在不抑制猪链球菌生长的浓度下剂量依赖性地抑制猪链球菌溶血素的寡聚化,并通过下调MAPK信号通路减轻猪链球菌介导的细胞损伤。Wang等^[27]报道了杨梅素可以作为金黄色葡萄球菌 α -溶血素的抑制剂,通过抑制 α -溶血素的寡聚化抑制金黄色葡萄球菌的毒力。Lv等^[28]从天然化合物中发现槲皮素能抑制肺炎链球菌溶血素的活性,通过寡聚化试验发现槲皮素能剂量依赖性的降低溶血素寡聚体的形成,并对肺炎链球菌人工感染模型动物起治疗作用。以上研究表明,成孔毒素可作为研究抗毒力药物的靶标。因此,本研究建立了气溶素寡聚化形成试验模型,气溶素与茶多酚共孵育后,通过加入HEPES使反应体系的pH降低至气溶素可形成寡聚化的条件。结果发现,茶多酚对气溶素形成七聚体有抑制作用,并呈剂量依赖性,与以上研究结果一致。

自抗毒力策略用于研究抗耐药性病原菌感染药物以来备受关注。气溶素作为嗜水气单胞菌的主要毒力因子,与其致病力密切相关,是研究抗嗜

水气单胞菌感染的潜在靶标。国内外已筛选到多种抑制气溶素表达、活性的化合物,并阐明了其作用机制。Srinivasa 等^[29]发现柚皮苷作为一种群体感应抑制剂,可抑制嗜水气单胞菌气溶素、生物被膜等毒力因子,并对感染嗜水气单胞菌的斑马鱼产生显著的保护作用。然而柚皮苷对气溶素诱导溶血活性的半数抑制质量浓度高达 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$,远远高于本试验中茶多酚的有效作用浓度。Takahashi 等^[30]研究了 4 种吡啶[3,2-b]喹啉对细菌主要成孔毒素活性的抑制作用,发现每一种吡啶[3,2-b]喹啉衍生物均能不同程度地降低温和气单胞菌气溶素的溶血活性,其中 C-11 位含有氨基的两种化合物对气溶素活性的抑制作用最强。这些化合物除了直接抑制气溶素的活性,还对温和气单胞菌的生长具有一定的抑制作用,因此,长时间使用该种化合物容易诱导病原菌产生耐药性^[30]。本研究中,通过测定茶多酚与嗜水气单胞菌 XS-91-4-1 共培养的生长曲线发现,茶多酚对嗜水气单胞菌的生长基本没有影响,其对气溶素活性的抑制作用远远低于其 MIC。因此,使用茶多酚治疗嗜水气单胞菌感染仅会降低其致病力,不会对其生长产生选择性压力,不易产生耐药性。谭宏亮等^[31]研究了多酚类化合物白藜芦醇对嗜水气单胞菌毒力的抑制作用,发现白藜芦醇可在质量浓度 $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时显著抑制上清液的溶血活性,并显著提高感染了嗜水气单胞菌的异育银鲫的存活率。以上研究表明,通过抑制气溶素的表达或活性可降低嗜水气单胞菌的体内、外致病力。本研究通过溶血试验、蛋白免疫印迹和荧光热漂移试验发现,茶多酚可直接与气溶素结合,从而使其失去溶血活性;进一步的寡聚化试验发现,茶多酚与气溶素结合后可导致气溶素无法形成功能性七聚体。

近年来随着细菌耐药性的不断出现,人们对天然化合物抗菌特性的研究也逐渐增多^[32]。茶多酚是由多种多酚类物质组成的混合物,本试验发现茶多酚最小抑菌质量浓度大于 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明茶多酚对嗜水气单胞菌基本无抑菌活性。此外,通过生长曲线试验发现茶多酚对嗜水气单胞菌生长几乎没有影响,说明在本试验浓度范围内茶多酚不会影响嗜水气单胞菌生长。Bhattacharya 等^[33]从茶中提取的多酚物质对霍乱弧菌进行抗毒力试

验,发现多酚物质可以抑制霍乱弧菌蛋白酶的分泌,防止细菌穿透肠黏液层并在肠上皮细胞中定殖,从而降低霍乱弧菌的致病力。此外,茶多酚还广泛应用于保健食品、食药加工、果蔬保鲜等领域^[34],而茶多酚对嗜水气单胞菌体内、外致病力的抑制作用尚未报道。本研究的结果显示茶多酚可以有效地抑制嗜水气单胞菌分泌的毒力因子气溶素的活性,有希望作为抗嗜水气单胞菌耐药的候选药物。

4 结论

本文研究了茶多酚对食源性病原菌嗜水气单胞菌体内、外致病力的抑制作用。结果显示,茶多酚在体外对嗜水气单胞菌的生长没有抑制作用,然而可剂量依赖性的降低嗜水气单胞菌分泌的气溶素的活性,茶多酚能直接与气溶素结合,使其无法形成具有孔道的七聚体而失去活性,茶多酚还可以通过抑制气溶素活性,来降低嗜水气单胞菌的体内、外致病力。本研究为嗜水气单胞菌感染的治疗提供了先导化合物和新的策略。

参 考 文 献

- [1] HUANG Y, CIAIS P, GOLL D S, et al. The shift of phosphorus transfers in global fisheries and aquaculture [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 355.
- [2] PRADEPKIRAN J A. Aquaculture role in global food security with nutritional value: A review [J]. Translational Animal Science, 2019, 3(2): 903-910.
- [3] 夏与晴, 刘文珍, 傅松哲, 等. 25 种中草药及其联合用药配伍对 5 种水产养殖常见致病菌的抑菌作用 [J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(1): 7-14.
XIA Y Q, LIU W Z, FU S Z, et al. Antibacterial effects of 25 kinds of Chinese herbal medicines and their combinations on five routine pathogenic bacteria in aquaculture [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(1): 7-14.
- [4] DONG J, ZHANG L S, LIU Y T, et al. Luteolin decreases the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* via inhibiting the activity of aerolysin [J]. Virulence, 2021, 12(1): 165-176.
- [5] JANDA J M, ABBOTT S L. The genus *Aeromonas*:

- Taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(1): 35–73.
- [6] SHIRAJUM M M, YUSOFF S M, MOHAMAD A, et al. Vaccination of tilapia against motile *Aeromonas* septicemia: A review [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2020, 32(2): 65–76.
- [7] 庞楠楠, 白玉, 刘虎威. 孔雀石绿与水产品安全[J]. *大学化学*, 2009, 24(1): 59–61.
PANG N N, BAI Y, LIU H W. Malachite green and aquatic product safety [J]. *College Chemistry*, 2009, 24(1): 59–61.
- [8] 张静, 陈红莲, 鲍俊杰, 等. 水产养殖中嗜水气单胞菌拮抗菌的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(17): 21–33.
ZHANG J, CHEN H L, BAO J J, et al. Research progress on antagonistic microbes of *Aeromonas hydrophila* in aquaculture[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2020, 48(17): 21–33.
- [9] RASKO D A, SPERANDIO V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9(2): 117–128.
- [10] PARKER M W, BUCKLEY J T, POSTMA J P, et al. Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states [J]. *Nature*, 1994, 367(6460): 292–295.
- [11] PARKER M W, VAN DER GOOT F G, BUCKLEY J T. Aerolysin—the ins and outs of a model channel-forming toxin [J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 19(2): 205–212.
- [12] 余春燕, 朱坤, 黄建安, 等. 茶多酚对心肌保护作用的研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(3): 296–305.
YU C Y, ZHU K, HUANG J A, et al. Advances in the study of cardioprotective effects of tea polyphenols on myocardium [J]. *Food Science*, 2022, 43(3): 296–305.
- [13] 莫琼, 韦迪, 俞春林, 等. 茶叶的药理作用研究进展[J]. *茶叶通讯*, 2021, 48(4): 598–605.
MO Q, WEI D, YU C L, et al. Research progress on the pharmacological effects of tea [J]. *Tea Newsletter*, 2021, 48(4): 598–650.
- [14] 张蒙, 聂妍, 颜平, 等. 氧化型茶多酚对高脂饮食老年大鼠肠道微生物的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(3): 577–586.
ZHANG M, NIE Y, YAN P, et al. Effects of oxidized tea polyphenols on gut microbes in aged rats with high-fat diet [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(3): 577–586.
- [15] 朱娜, 冯萃敏, 李莹, 等. 茶多酚的抑菌特性及其作为饮用水消毒剂的研究进展[J]. *应用化工*, 2022, 51(2): 567–573.
ZHU N, FENG C M, LI Y, et al. Research progress on antibacterial properties of tea polyphenols and its use as drinking water disinfectants [J]. *Applied Chemical*, 2022, 51(2): 567–573.
- [16] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 163–175.
- [17] 董靖, 刘永涛, 胥宁, 等. 嗜水气单胞菌气溶素的表达纯化和活性实验[J]. *中国渔业质量与标准*, 2019, 9(1): 27–33.
DONG J, LIU Y T, XU N, et al. Expression, purification and characterization of aerolysin from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2019, 9(1): 27–33.
- [18] IACOVACHE I, DEGIACOMI M T, PERNOT L, et al. Dual chaperone role of the C-terminal propeptide in folding and oligomerization of the pore-forming toxin aerolysin [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(7): e1002135.
- [19] 戚伟, 区海蕴, 周亚兰, 等. 猪大肠杆菌与嗜水气单胞杆菌混合感染病例的诊断及其体外抑菌试验 [J]. *江西畜牧兽医杂志*, 2019(2): 10–14.
QI W, QU H Y, ZHOU Y L, et al. Diagnosis of swine mixed infection with *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila* and its *in vitro* antibacterial test [J]. *Jiangxi Animal Husbandry and Veterinary Journal*, 2019(2): 10–14.
- [20] VIVEKANANDHAN G, HATHA A A M, LAKSHMANAPERUMALSAMY P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India [J]. *Food Microbiology*, 2005, 22(1): 133–137.
- [21] 马恩红, 王春波, 张林文, 等. 一起由嗜水气单胞菌污染饮用水引起的腹泻暴发调查 [J]. *环境与健康杂志*, 2011, 28(12): 1116.
MA E H, WANG C B, ZHANG L W, et al. Investigation of an outbreak of diarrhea caused by contaminated drinking water with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Environment and Health*, 2011, 28(12): 1116

- [22] KUMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I[J]. *Chemosphere*, 2009, 75(4): 417–434.
- [23] 赵海晴, 李耘, 梁严内, 等. 联合用药对嗜水气单胞菌耐药性影响研究进展[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(6): 53–65.
ZHAO H Q, LI Y, LIANG Y N, et al. Advances in research on the effects of joint medication on the drug resistance of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(6): 53–65.
- [24] VIVEKANANDHAN G, SAVITHAMANI K, HATHA A A M, et al. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 76(1/2): 165–168.
- [25] 李爱华, 蔡桃珍, 吴玉深, 等. 我国鱼类病原—嗜水气单胞菌的耐药性研究[J]. *微生物学通报*, 2001(1): 58–63.
LI A H, CAI T Z, WU Y S, et al. Study on drug resistance of Chinese fish pathogen—*Aeromonas hydrophila*[J]. *Microbiology Bulletin*, 2001(1): 58–63.
- [26] XIE S N, ZHANG Y, XU L, et al. Acacetin attenuates *Streptococcus suis* virulence by simultaneously targeting sulysin and inflammation[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 162: 105354.
- [27] WANG T T, ZHANG P, LV H F, et al. A natural dietary flavone myricetin as an alpha-hemolysin inhibitor for controlling *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 330.
- [28] LV Q H, ZHANG P, QUAN P S, et al. Quercetin, a pneumolysin inhibitor, protects mice against *Streptococcus pneumoniae* infection[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 140: 103934.
- [29] SRINIVASA N R, DEVI K R, SANTHAKUMARI S, et al. Anti-quorum sensing and protective efficacies of naringin against *Aeromonas hydrophila* infection in danio rerio[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 600622.
- [30] TAKAHASHI E, FUJINAMI C, KURODA T, et al. Indolo [3,2-b]quinoline derivatives suppressed the hemolytic activity of beta-pore forming toxins, aerolysin-like hemolysin produced by *Aeromonas sobria* and alpha-hemolysin produced by *Staphylococcus aureus*[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39(1): 114–120.
- [31] 谭宏亮, 陈凯, 习丙文, 等. 白藜芦醇抑制嗜水气单胞菌毒力作用研究[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(4): 861–868.
TAN H L, CHEN K, XI B W, et al. Study on the inhibitory effect of resveratrol on the virulence of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Hydrobiology*, 2019, 43(4): 861–868.
- [32] WU M, BROWN A C. Applications of catechins in the treatment of bacterial infections[J]. *Pathogens*, 2021, 10(5): 546.
- [33] BHATTACHARYA D, SINHA R, MUKHERJEE P, et al. Anti-virulence activity of polyphenolic fraction isolated from Kombucha against *Vibrio cholerae*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 140: 103927.
- [34] 都津铭, 张萍, 高德. 丁香精油与茶多酚复合抗菌液的抑菌活性协同作用及抗氧化活性[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(10): 87–95.
DU J M, ZHANG P, GAO D, et al. Synergistic antibacterial effect and antioxidant activity of the compound liquid with clove essential oil and tea polyphenol[J]. *Modern Food Technology*, 2021, 37(10): 87–95.

Inhibitory Effect of Tea Polyphenols on the Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*

Zhang Defu¹, Yan Tianhui^{1,2}, Li Jianrong¹, Yang Qihong², Ai Xiaohui², Dong Jing^{2*}

¹College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 420223)

Abstract The purpose of this study was to screen new drugs that can inhibit the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* and eliminate infections caused by *A. hydrophila* contaminated aquatic products. The results showed that tea polyphenols had no role on bacterial growth at concentrations lower than 128 $\mu\text{g/mL}$, but tea polyphenols could inhibit the hemolytic activity of aerolysin at concentrations ranging from 1–8 $\mu\text{g/mL}$. The results of thermal shift and heptamer formation assays showed that tea polyphenols could inhibit the formation of functional heptamer by directly binding to aerolysin and results

in loss of activity. Cell viability assays showed that tea polyphenols of 4 $\mu\text{g/mL}$ and 8 $\mu\text{g/mL}$ could provide a significant protection to A549 cells from aerolysin mediated cell injury. Moreover, experimental therapeutics found that tea polyphenols at a dosage of 50 mg/kg could increase the survival rate of channel catfish infected with *A. hydrophila* to 60%. The above experiments showed that tea polyphenols directly bind to aerolysin and inhibit the activity of aerolysin by reducing the formation of functional heptamer, and tea polyphenols can significantly reduce the pathogenicity of *A. hydrophila* both *in vitro* and *in vivo*. This study suggests that tea polyphenols can be used as an alternative or adjuvant therapy to antibiotics for the treatment of *A. hydrophila*-related infections.

Keywords *Aeromonas hydrophila*; aerolysin; tea polyphenols; anti-virulence; aquatic products