

李声平, 马亮, 闫天慧, 等. 香叶木素对嗜水气单胞菌气溶素表达的抑制作用[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(6): 217-221.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.06.025

香叶木素对嗜水气单胞菌气溶素表达的抑制作用

李声平, 马亮, 闫天慧, 艾晓辉, 董靖

中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

摘要 为筛选出抗嗜水气单胞菌感染的天然化合物, 以嗜水气单胞菌和香叶木素为研究对象, 通过最小抑菌浓度测定、生长曲线、溶血试验、免疫印迹、荧光定量PCR和细胞毒性试验研究了香叶木素对嗜水气单胞菌气溶素表达的抑制作用。结果发现, 对嗜水气单胞菌生长没有影响的香叶木素能在较低浓度下通过抑制气溶素的表达降低共培养物上清液的溶血活性; 荧光定量PCR试验发现香叶木素能剂量依赖性地降低气溶素编码基因 *aerA* 的表达。此外, 通过活/死细胞染色发现香叶木素可减轻气溶素介导的细胞损伤。以上结果表明, 香叶木素通过降低 *aerA* 的转录水平降低了嗜水气单胞菌的体外致病力, 可作为一种抗嗜水气单胞菌感染的候选药物。

关键词 嗜水气单胞菌; 香叶木素; 气溶素; 致病力; 抗感染药物

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)06-0217-05

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是一种宿主广泛的条件性致病菌, 可在人和动物, 尤其是水生动物中引起多种疾病^[1], 如斑点叉尾鲴的套肠病^[2]、鳖白点病和白底板病^[3]、鲤出血病^[4]等, 均会造成养殖业的重大经济损失^[5]。在水产养殖中, 嗜水气单胞菌感染主要依赖化学抗菌药物进行防控, 而药物的不规范使用导致菌株出现耐药性^[6]。此外, 药物在鱼体内的蓄积和残留, 会对食用的人群产生安全隐患^[7]。近年来, 依据干预细菌感染过程的思路, 诞生了多种抗菌药物研发的新策略, 其中抗毒力策略可作为抗嗜水气单胞菌感染药物研发的新途径^[8]。

嗜水气单胞菌能分泌气溶素、溶血素和肠毒素等多种毒力因子, 其致病力与这些毒力因子密切相关^[9]。气溶素是嗜水气单胞菌的主要毒力因子之一, 可以引起红细胞发生溶血现象, 对细胞也有毒性作用, 可作为鉴别致病菌株的重要标志^[10]。有研究发现, 气溶素基因缺失型嗜水气单胞菌的致病性显著低于野生型菌株^[11]。因此, 气溶素可作为抗嗜水气单胞菌感染药物研发的新靶标。

香叶木素主要存在于菊花、薄荷等中草药以及柑橘类水果中, 具有抗菌、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等药理学活性^[12]。目前香叶木素对嗜水气单胞菌致病力的影响鲜有报道。本研究通过最小抑菌浓度测

定、生长曲线、溶血试验、免疫印迹和荧光定量PCR等试验分析了香叶木素抑制嗜水气单胞菌气溶素表达的机制, 通过活/死细胞染色研究了香叶木素对嗜水气单胞菌气溶素介导的细胞毒性的保护作用, 旨在为以毒力因子为靶标的抗嗜水气单胞菌感染药物研发提供新的思路和候选化合物。

1 材料与方法

1.1 试验材料

香叶木素(纯度 $\geq 98\%$)购自四川维克奇生物科技有限公司; 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赠送; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自鼎国生物公司; 兔抗气溶素多克隆抗体由笔者所在实验室制备; 活/死细胞双染色试剂盒购自翌圣生物公司。香叶木素用 DMSO 制备成 40.96 mg/mL 母液, 备用。

1.2 最小抑菌浓度(MICs)测定

采用肉汤微量稀释法在 96 孔板中测定香叶木素和恩诺沙星对嗜水气单胞菌 XS-91-4-1 的 MICs^[13], 挑取 XS-91-4-1 单菌落至 LB 液体培养基培养过夜 (28 °C), 180 r/min 离心收集菌体, 用无菌 PBS 洗涤 3 次后重悬至浓度约为 1.5×10^8 CFU/mL。在 96 孔板中将药物倍比稀释, 使香叶木素和恩诺沙星的

收稿日期: 2022-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702368); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

李声平, E-mail: lsp19970906@163.com

通信作者: 董靖, E-mail: dongjing@yfi.ac.cn

质量浓度范围分别为 512~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 64~0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔中药物体积为 100 μL ; 向每孔中加入稀释好的菌液 100 μL , 使其终浓度为 5×10^5 CFU/mL。分别设置阳性和阴性对照组, 阳性对照组只加菌不加药, 阴性对照组只加新鲜 LB 培养基。将 96 孔板置于恒温培养箱中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜, 以细菌未生长的最小药物浓度定为药物的 MIC。

1.3 生长曲线测定

将过夜的 XS-91-4-1 菌液按 1% 接种于新鲜 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$, 分装于 50 mL 锥形瓶中, 加入不同质量浓度的香叶木素, 使药物终质量浓度分别为 4、8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。只加 DMSO 组作为无药物处理组。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 5 h, 每 0.5 h 测 1 次 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 的吸光值。

1.4 溶血试验

将菌株 XS-91-4-1 接种于 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$, 并分装于 50 mL 锥形瓶中。向每瓶中加入香叶木素, 使菌液中香叶木素的终质量浓度为 0、4、8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.5$ 时, 高速离心 (13 300 r/min, 1 min) 收集上清液冻存备用。将上清液中加入胰蛋白酶 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 激活气溶素, 用于溶血和免疫印记试验^[14]。溶血试验反应体系如下: 875 μL 的溶血缓冲液, 100 μL 已激活的上清液, 5×10^6 个脱纤维绵羊红细胞 (25 μL)。反应体系充分混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 15 min。反应结束后以 13 300 r/min 离心 1 min, 取上清液测定 $\text{OD}_{543\text{nm}}$ 的吸光值。以不加药物上清液为 100% 溶血对照, 试验组测得吸光度与阳性对照组的比值为溶血百分比。

1.5 免疫印迹试验

将本文材料与方法“1.4”中胰蛋白酶处理的菌液上清用于蛋白免疫印迹试验。上清液经样品制备后进行 SDS-PAGE 电泳分离目标蛋白, 然后通过湿法将蛋白转印至 PVDF 膜上; 用 5% 脱脂奶粉将 PVDF 膜封闭 2 h; 兔抗气溶素多克隆抗体 (1:1 000) 室温孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次后用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:4 000) 孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次; 加入 ECL 发光液避光孵育 3 min 后, 用凝胶成像系统进行化学发光观察并拍照。

1.6 荧光定量 PCR

菌株培养方法同本文材料与方法“1.4”。菌株 XS-91-4-1 与不同质量浓度的香叶木素在 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡

培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.5$ 时, 13 300 r/min 离心 1 min 保留菌体用于提取细菌总 RNA。将总 RNA 加入到反转录试剂中合成 cDNA 并用于后续的荧光定量 PCR 反应, 每个浓度试验组重复 3 次。荧光定量 PCR 试验所用到的引物序列见表 1, 16S rRNA 为内参基因。试验数据用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析, 计算不同质量浓度香叶木素处理后 *aerA* 基因的相对表达量。

表 1 试验中使用的引物

Table 1 Primer pairs used in test

| 引物 Primer | 引物序列(5'-3') Sequence (5'-3') | PCR 扩增子/bp PCR amplicon |
|--------------|---------------------------------|----------------------------|
| aerA-F | TCTACCACCACCTCCCTGTC | |
| aerA-R | GACGAAGGTGTGGTTC- CAGT | 218 |
| 16S rRNA-F | TAATACCGCATACGCCCTAC | |
| 16S rRNA-R | ACCGTGTCTCAGTTC- CAGTG | 164 |

1.7 细胞毒性试验

将人非小细胞肺癌细胞 (A549) 接种至含有 10% 的胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基的细胞培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 培养箱中传代培养。当细胞长满瓶底 80% 时, 弃去旧培养基, 用无菌 PBS 洗 3 次后, 加胰蛋白酶消化 3~5 min 后重悬细胞。向 96 孔板中加入细胞, 使其终浓度为 2.5×10^5 个/孔, 继续培养 16~18 h 使细胞完全贴壁。按本文材料与方法“1.4”收集菌液上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后加入到每孔中。菌液上清与细胞共孵育 2 h 后弃去上清液, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 加入活/死细胞双染色试剂反应 30 min 后用荧光显微镜拍摄图像。

2 结果与分析

2.1 香叶木素对嗜水气单胞菌生长的作用

根据 MICs 试验可知, 香叶木素和恩诺沙星对嗜水气单胞菌 XS-91-4-1 的 MIC 分别为 512 和 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 通过添加 DMSO 到阳性对照组发现 DMSO 对细菌生长没有影响。此外, 通过生长曲线试验发现, 4~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的香叶木素与嗜水气单胞菌共培养不影响嗜水气单胞菌的生长 (图 1)。综上, 香叶木素在本研究的试验条件下对嗜水气单胞菌的生长没有抑制作用, 几乎不会对嗜水气单胞菌造成选择性压力。

2.2 香叶木素对嗜水气单胞菌上清液溶血活性的抑制作用

由图 2 可知, 香叶木素可剂量依赖性地降低嗜水气单胞菌上清液的溶血活性; 当香叶木素质量浓度

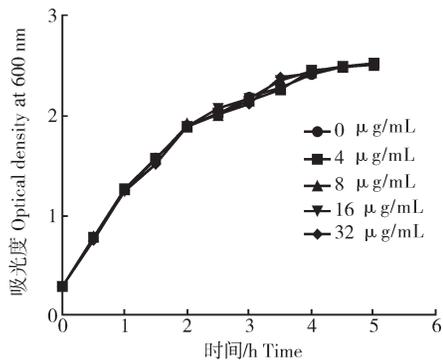


图1 嗜水气单胞菌与香叶木素共培养的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *A. hydrophila* co-cultured with diosmetin

分别为4、8、16和32 µg/mL时,其上清液溶血量分别为63.20%、48.62%、41.96%和24.46%。当香叶木素质量浓度在4 µg/mL及以上时,能显著抑制上清液中溶血活性。该结果提示,香叶木素可能通过抑制气溶素的表达或活性发挥作用。

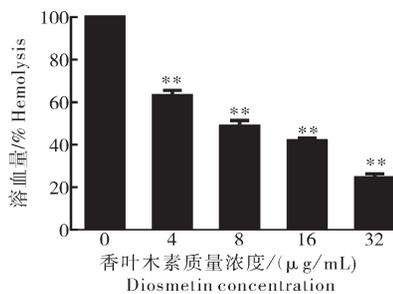


图2 香叶木素对嗜水气单胞菌上清液溶血的抑制作用

Fig.2 Impact of diosmetin on hemolytic activity of bacterial supernatants

2.3 香叶木素对气溶素表达的影响

蛋白免疫印迹试验结果如图3所示,随着香叶木素质量浓度的增加,嗜水气单胞菌上清液中气溶素的含量逐渐下降,当香叶木素质量浓度达到32 µg/mL时,上清液中几乎检测不到气溶素。该结果表明,香叶木素与嗜水气单胞菌共培养后可剂量依赖性地降低气溶素的表达。

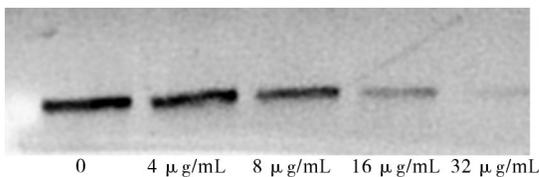
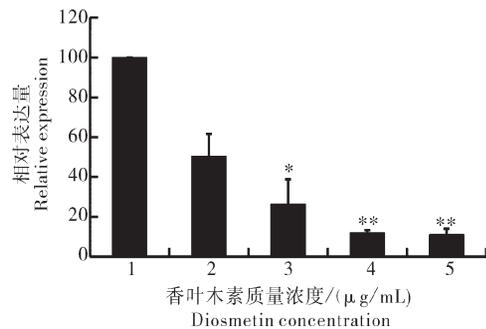


图3 不同质量浓度香叶木素处理后培养物上清液中气溶素的含量

Fig.3 Amount of aerolysin in bacterial supernatants after a co-incubation with diosmetin at different concentrations

2.4 香叶木素对 aerA 基因转录的抑制作用

荧光定量PCR试验结果如图4所示,与未加药物组相比,香叶木素处理组气溶素编码基因 *aerA* 的转录水平呈剂量依赖性降低。当香叶木素质量浓度分别为4、8、16和32 µg/mL时, *aerA* 的转录水平分别下调至无药物处理组的50.42%、26.33%、11.94%和11.04%。与未加药对照组相比,8 µg/mL及以上香叶木素处理的嗜水气单胞菌,其 *aerA* 的转录显著下降。

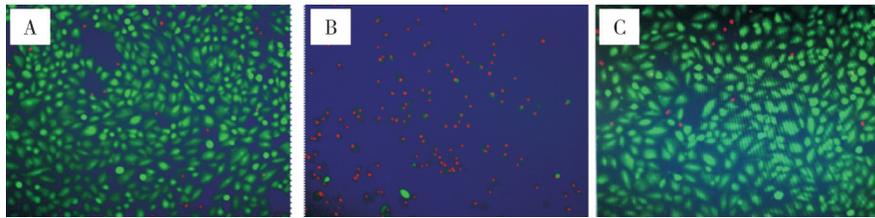
图4 香叶木素处理后嗜水气单胞菌 *aerA* 基因的转录水平Fig.4 Transcription levels of *aerA* genes in *A. hydrophila* treated with diosmetin

2.5 香叶木素对气溶素介导的细胞损伤的保护作用

如图5A所示,未经处理的细胞为活细胞,被染成绿色;而无药物上清处理的细胞出现了大量死亡,被染成红色(图5B);与无药上清处理组相比,含有32 µg/mL香叶木素的上清液与细胞共培养后,死亡细胞减少(图5C),与未处理组相当。该结果表明,香叶木素可减少气溶素介导的细胞损伤。

3 讨论

香叶木素是一种天然黄酮类化合物,具有抗氧化、抗肿瘤和抗炎抑菌作用^[15]。Meng等^[16]从皱叶绢毛苣中分离到了香叶木素,并研究了其对常见细菌的最小抑菌浓度,结果发现香叶木素对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉菌的MIC分别为50、50、100和50 µg/mL,而对白色念珠菌和红色毛癣菌的MIC大于100 µg/mL。Li等^[17]通过研究发现香叶木素能改变小鼠肠道菌群结构,从而提高其肠道的功能。Gomez-chang等^[18]研究发现香叶木素在低至3.9 µg/mL时,即可抑制91.94%的幽门螺杆菌的生长。目前香叶木素抑制水产源病原菌的研究较少,马亮等^[19]发现香叶木素可抑制克氏原螯



A: 未处理的细胞 Untreated cells; B: 无药物菌液上清处理的细胞 Drug-free supernatant treated cells; C: 香叶木素菌液上清处理的细胞 Diosmetin supernatant treated cells.

图5 香叶木素对气溶素介导的细胞损伤的保护作用

Fig. 5 Protective effect of diosmetin against aerolysin mediated cell injury

虾源普通变形杆菌的生长,其MIC为256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本研究发现香叶木素在质量浓度高达512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时才能抑制嗜水气单胞菌生长,提示其几乎没有抑制嗜水气单胞菌生长的作用。此外,通过生长曲线发现,香叶木素质量浓度为32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以下时,对嗜水气单胞菌的生长无影响。

Chan等^[20]发现香叶木素能通过抑制金黄色葡萄球菌的丙酮酸激酶的活性,导致其ATP缺乏,从而提高其抗菌作用。而我们通过溶血试验发现,香叶木素能降低嗜水气单胞菌上清液的溶血活性,从而降低嗜水气单胞菌的毒力。且相比于Sun等^[21]研究的七叶苷在25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时能显著减少嗜水气单胞菌上清液的溶血活性,香叶木素在4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时也能达到同样效果,提示香叶木素的试验效果要优于七叶苷。本研究进一步通过Western-blot试验和荧光定量PCR试验,验证了香叶木素对嗜水气单胞菌气溶素的抑制效果。这与Dong等^[22]研究的百里香酚能够抑制嗜水气单胞菌溶血活性和气溶素表达,具有类似的效果,但百里香酚的机制是通过抑制嗜水气单胞菌的群体感应从而降低气溶素的表达和生物被膜形成,香叶木素仅抑制的转录,对群体感应的相关基因的表达并没有影响。Liu等^[23]研究发现,香叶木素能在亚抑制浓度下抑制金黄色葡萄球菌的 α -溶血素的表达,从而降低 α -溶血素对A549细胞的损伤。而本试验也发现香叶木素对气溶素介导的A549细胞损伤也具有明显的保护效果。以上发现提示,香叶木素可作为治疗嗜水气单胞菌感染的潜在药物。

参考文献 References

[1] 蒋长军,管翠翠,胡小敏,等. 黄芩苷对嗜水气单胞菌生物膜形成的影响及体内外的抑菌作用[J]. 微生物学报,2021,61(7):2112-2120. JIANG C J, GUAN C C, HU X M, et al. Bacteriostatic and antibiofilm effects of baicalin on *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. Acta microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 2112-2120 (in Chinese with English abstract).

[2] 吴璇,袁海文,谢晓东,等. 斑点叉尾鲷肠病原嗜水气单胞

菌的分离与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(10): 3057-3062. WU X, YUAN H W, XIE X D, et al. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from the case of channel catfish bowel disease [J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2017, 44(10): 3057-3062 (in Chinese with English abstract).

[3] 薛明洋,周勇,梁宏伟,等. 一株中华鳖源嗜水气单胞菌的分离鉴定及毒力基因分析[J]. 中国农学通报, 2021, 37(20): 152-159. XUE M Y, ZHOU Y, LIANG H W, et al. Isolation, identification and virulence gene analysis of an *Aeromonas hydrophila* from diseased *Pelodiscus sinensis* [J]. Chinese agricultural science bulletin, 2021, 37(20): 152-159 (in Chinese with English abstract).

[4] 胡安东,张明洋,张飘,等. 鲤源嗜水气单胞菌分离鉴定、耐药性及毒力基因检测[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(7): 2167-2175. HU A D, ZHANG M Y, ZHANG P, et al. Isolation, identification, drug resistance and virulence genes detection of *Aeromonas hydrophila* from carp [J]. China animal husbandry & veterinary medicine, 2019, 46(7): 2167-2175 (in Chinese with English abstract).

[5] HOSSAIN M J, SUN D W, MCGAREY D J, et al. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish [J/OL]. mBio, 2014, 5(3): e00848-e00814 [2022-05-06]. <https://doi.org/10.1128/mBio.00848-14>.

[6] 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. 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 (in Chinese with English abstract).

[7] NOVITA H, RUSMANA I, YUHANA M, et al. Uji *in vitro* bakteri anti quorum sensing pendegradasi acyl homoserine lactone *Aeromonas hydrophila* [J]. Jurnal riset akuakultur, 2017, 11(3): 291-296.

[8] LJUNGH Å, WADSTRÖM T. *Aeromonas* toxins [J]. Pharmacology & therapeutics, 1981, 15(3): 339-354.

[9] 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. DU N. Drug-resistance analysis of *Aeromonas hydrophila* and study on immunoprotective of antiserum of aerolysin [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese with English abstract).

[10] 刘明智,叶星,田园园,等. 嗜水气单胞菌气溶素和溶血素基因的克隆与结构预测[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(2): 356-362. LIU M Z, YE X, TIAN Y Y, et al. Cloning and structure

- prediction of *aerA* gene and *hlyA* gene of *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2010, 32(2): 356-362(in Chinese with English abstract).
- [11] 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. hydrophila*-associated systemic infections[J]. Infection and immunity, 1987, 55(9): 2274-2280.
- [12] 马纳, 李亚静, 范吉平. 香叶木素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(9): 214-217. MA N, LI Y J, FAN J P. Research progress on pharmacological action of diosmetin [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 20(9): 214-217(in Chinese with English abstract).
- [13] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—eighth edition: approved standard M07-A8[M]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.
- [14] 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/OL]. PLoS pathogens, 2011, 7(7): e1002135 [2022-05-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21779171/>. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002135.
- [15] 王群, 曾高峰, 王燕, 等. 香叶木素在代谢综合征中的作用[J]. 生命的化学, 2021, 41(8): 1701-1708. WANG Q, ZENG G F, WANG Y, et al. Role of diosmetin in metabolic syndrome[J]. Chemistry of life, 2021, 41(8): 1701-1708(in Chinese with English abstract).
- [16] MENG J C, ZHU Q X, TAN R X. New antimicrobial mono- and sesquiterpenes from *Soroseria hookeriana* subsp. *erysimoides* [J]. Planta Med, 2000, 66(6): 541-544.
- [17] LI H L, WEI Y Y, LI X H, et al. Diosmetin has therapeutic efficacy in colitis regulating gut microbiota, inflammation, and oxidative stress via the circ-Sirt1/Sirt1 axis[J]. Acta pharmacologica sinica, 2022, 43(4): 919-932.
- [18] GOMEZ-CHANG E, URIBE-ESTANISLAO G V, MARTINEZ-MARTINEZ M, et al. Anti-*Helicobacter pylori* potential of three edible plants known as quelites in Mexico[J]. Journal of medicinal food, 2018, 21(11): 1150-1157.
- [19] 马亮, 董靖, 张国栋, 等. 克氏原螯虾源普通变形杆菌分离、鉴定及联合药敏试验[J]. 淡水渔业, 2022, 52(5): 53-59. MA L, DONG J, ZHANG G D, et al. Identification and synergistic susceptibility of *Proteus vulgaris* isolated from *Procambarus clarkia* [J]. Freshwater fisheries, 2022, 52(5): 53-59(in Chinese with English abstract).
- [20] CHAN B C L, IP M, GONG H, et al. Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase[J]. Phytomedicine, 2013, 20(7): 611-614.
- [21] SUN B, LUO H Z, JIANG H, et al. Inhibition of quorum sensing and biofilm formation of esculetin on *Aeromonas hydrophila* [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2021, 12: 737626 [2022-05-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34630364/>. DOI: 10.3389/fmicb.2021.737626.
- [22] DONG J, ZHANG L S, LIU Y T, et al. Thymol protects channel catfish from *Aeromonas hydrophila* infection by inhibiting aerolysin expression and biofilm formation [J/OL]. Microorganisms, 2020, 8(5): 636 [2022-05-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32349419/>. DOI: 10.3390/microorganisms8050636.
- [23] LIU S, ZHOU X, LI W H, et al. Diosmetin inhibits the expression of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 108(2): 383-389.

Inhibitory effect of diosmetin on aerolysin expression in *Aeromonas hydrophila*

LI Shengping, MA Liang, YAN Tianhui, AI Xiaohui, DONG Jing

Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract To screen out natural compounds against *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) infection, minimal inhibitory concentration determination, growth curves, hemolysis, Western blot, qRT-PCR and cytotoxicity assay were performed to assess the inhibitory effect of diosmetin on the expression of aerolysin secreted by *A. hydrophila*. The results showed that diosmetin without anti-*A. hydrophila* activity could inhibit the hemolytic activity of bacterial supernatants by decreasing the transcription of aerolysin gene. Moreover, live/dead staining assay showed that diosmetin could attenuate cell injury mediated by aerolysin in A549 cells. These findings demonstrated that diosmetin could reduce the pathogenicity of *A. hydrophila* by inhibiting the expression of aerolysin and diosmetin could be chosen as a promising candidate drug against *A. hydrophila* infection.

Keywords *Aeromonas hydrophila*; diosmetin; aerolysin; pathogenicity; anti-infection drugs

(责任编辑:边书京)