



# 高致病性美人鱼发光杆菌美人鱼亚种胞外产物的毒力特性分析

李永杰<sup>1,2</sup>, 于永翔<sup>2,3</sup>, 王印庚<sup>2,3</sup>, 王春元<sup>2</sup>, 刘定远<sup>2</sup>, 张浩<sup>2</sup>, 张正<sup>2,3\*</sup>

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黄海水产研究所, 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室, 山东 青岛 266071

3 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

李永杰, 于永翔, 王印庚, 王春元, 刘定远, 张浩, 张正. 高致病性美人鱼发光杆菌美人鱼亚种胞外产物的毒力特性分析. 微生物学报, 2022, 62(8): 2995–3006.

Li Yongjie, Yu Yongxiang, Wang Yingeng, Wang Chunyuan, Liu Dingyuan, Zhang Hao, Zhang Zheng. Virulence of the extracellular products of highly pathogenic strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2995–3006.

**摘要:**【目的】美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是一种可导致多种海洋生物患病的重要病原菌。本研究以从我国海水养殖环境中分离的具有强磷脂酶活性、强溶血性表型且具有高致病性的 2 株 PDD 菌株为研究对象, 分析 PDD 菌株胞外产物(extracellular products, ECP)的致病性及细胞毒性, 及其与菌株致病性表型的相关性。【方法】利用培养基平板法测定菌株 PDD1605、PDD1608 的 ECP 体外磷脂酶活性和溶血性; 通过人工感染实验测定 PDD1605 和 PDD1608 活菌株及其 ECP 对许氏平鲷的致病性, 并进行组织病理切片观察组织的病理损伤; 通过向人胚肾细胞系 HEK293T 和小鼠成纤维细胞系 MCFS 等 2 种培养细胞中添加菌株 PDD1605 和 PDD1608 的 ECP 测定其对哺乳动物的细胞毒性。【结果】人工感染 PDD1605 和 PDD1608 活菌株对许氏平鲷均表现为高致病性,  $5 \times 10^8$  CFU/mL 的菌液浓度 24 h 内受试鱼全部死亡; 菌株 PDD1605 和 PDD1608 的 ECP 对许氏平鲷同样表现为高致病性, 受试鱼的死亡曲线与感染活菌株的死亡曲线趋势基本一致; 病理切片观察发现, 感染 ECP 后许氏平鲷组织发生明显病变, 主要表现为肠黏膜层组织崩解, 心脏心肌炎性细胞浸润, 肝脏血细胞和炎性细胞

**基金项目:** 国家重点研发计划(2019YFD0900104); 山东省自然科学基金(ZR2020QC216, ZR2021MC027)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900104) and by the Shandong Province Natural Science Foundation (ZR2020QC216, ZR2021MC027)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-85817991; E-mail: zhangzheng@ysfri.ac.cn

Received: 23 November 2021; Revised: 15 February 2022; Published online: 22 March 2022

浸润, 脾脏出现血铁蛋白沉积等; 2株 PDD 菌株的 ECP 也具有体外强溶血活性和强磷脂酶活性, 与菌株的毒力特性基本一致; 2株 PDD 菌株的 ECP 对人胚肾细胞系 HEK293T 和小鼠成纤维细胞系 MCFS 具有细胞损伤作用, 均使体外培养的细胞体积萎缩, 形成了圆形细胞簇等退行性变化。

**【结论】**通过体外测定溶血性、磷脂酶活性, 许氏平鲉人工感染实验和病理切片观察, 以及细胞毒性研究, 证实 2株高致病性 PDD 菌株的致病性表型与其 ECP 致病性表型和细胞毒性高度一致, 从而说明 ECP 是高致病性 PDD 菌株的重要致病机制之一。

**关键词:** 美人鱼发光杆菌美人鱼亚种; 胞外产物; 毒力特性; 细胞毒性; 许氏平鲉

## Virulence of the extracellular products of highly pathogenic strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

LI Yongjie<sup>1,2</sup>, YU Yongxiang<sup>2,3</sup>, WANG Yingeng<sup>2,3</sup>, WANG Chunyuan<sup>2</sup>, LIU Dingyuan<sup>2</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, ZHANG Zheng<sup>2,3\*</sup>

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

2 Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academic of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

3 Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong, China

**Abstract: [Objective]** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (PDD) is a major pathogen which causes serious diseases in marine organisms. This study focused on two highly pathogenic PDD strains (PDD1605 and PDD1608) with strong hemolysis and phospholipase activities, which were isolated from maricultured fish in China. We analyzed the virulence and cytotoxicity of the extracellular products (ECPs) derived from the two PDD strains and their correlations with the strain pathogenicity.

**[Methods]** The hemolysis and phospholipase activities of ECPs from PDD1605 and PDD1608 were measured on agar plates. The pathogenicity of the two live strains and their ECPs to *Sebastes schlegeli* were detected by artificial challenge test. Meanwhile, we prepared histopathological sections to observe the pathological damage of organs and tissues. Furthermore, we added the ECPs to the media of human embryonic kidney cell line HEK293T and mouse cardiac fibroblasts (MCFS) to study the toxicity of ECPs to mammalian cells. **[Results]** The live PDD1605 and PDD1608 strains showed strong pathogenicity to *S. schlegeli*. All the fish exposed to the strains at the concentration of  $5 \times 10^8$  CFU/mL died within 24 h. The ECPs of PDD1605 and PDD1608 also showed strong pathogenicity to *S. schlegeli*. The death curve trend was similar between ECPs and live strains. The ECPs caused serious tissue damage to *S. schlegeli*, which mainly included disintegration of intestinal mucosa, blood cell and inflammatory cell infiltration in liver, hemosiderosis in spleen, and inflammatory cell infiltration in myocardium. Additionally, the ECPs of the two PDD strains had strong hemolysis and phospholipase activities *in vitro*, which was basically consistent with the virulence characteristics of live strains. Moreover, they had cytotoxicity to HEK293T and MCFS cells, reducing the cell volume *in vitro* and causing degenerative changes such as round cell clusters. **[Conclusion]** The ECPs and live strains of

PDD1605 and PDD1608 have highly consistent virulence and cytotoxicity. Our findings support that ECPs are the key pathogenic factor of highly pathogenic PDD strains.

**Keywords:** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*; extracellular products; virulence; cytotoxicity; *Sebastes schlegeli*

美人鱼发光杆菌美人鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, PDD)是一种在全球海洋环境广泛分布的革兰氏阴性病原菌,可感染多种海洋动物发病<sup>[1]</sup>,主要症状为大面积皮肤溃疡和肝、脾、肾等组织的局灶性坏死<sup>[2]</sup>。PDD最初于1981年从雀鲷科鱼类的体表溃疡处分离而来<sup>[3]</sup>,此后从军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)等多种患病海洋鱼类中被广泛分离发现<sup>[4-7]</sup>,同时也发现该菌对鲸、海豚、小鼠及人等哺乳动物具有致病性<sup>[8-9]</sup>。目前,水产养殖中有关PDD感染的病例报道逐渐增多,特别是在高密度、集约化的养殖环境下,当鱼类免疫力下降时更易引起PDD的流行性暴发<sup>[10-11]</sup>。现有的研究已经证实,PDD无明显的宿主特异性,且致病性强、发病速度快、致死率高,给水产养殖行业造成了巨大的经济损失。

病原菌的致病性主要取决于毒力因子的构成和表达,毒力因子是病原菌入侵宿主、产生病理损伤和逃避宿主防御的关键因素<sup>[12]</sup>。细菌性疾病是鱼类养殖过程中的主要疾病类型,加强对病原菌致病机制的研究和认识对于开发针对性的免疫预防疫苗和采用药物方法防控都具有重要的参考意义<sup>[13]</sup>。已有的研究表明,弧菌属和发光杆菌属细菌的发病机制涉及多种毒力因子<sup>[14-17]</sup>,而PDD主要产生多达4种不同的毒素<sup>[18]</sup>,包括毒力质粒pPHDD1编码的毒素Dly和PhlyP<sup>[19]</sup>,以及染色体I编码的溶血素PhlyC和磷脂酶PlpV<sup>[20]</sup>。Dly是一种对鞘磷脂有活性

的磷脂酶D<sup>[21]</sup>,PlpV是一种水解甘油磷脂的磷脂酶A2<sup>[18]</sup>,而PhlyP和PhlyC是成孔溶血素<sup>[22]</sup>,这4种毒素均通过PDD的II型分泌系统分泌至细菌胞外<sup>[20]</sup>。此外,还有学者发现有PDD菌株中检测出 $vvh$ 、 $vhh$ 、 $tdh$ 、 $trh$ 等非美人鱼发光杆菌所特有的毒力基因,可能存在相关的毒素表达,从而增强其致病能力<sup>[23]</sup>。

本研究以实验室分离保存的2株高致病性PDD菌株为对象,通过研究菌株本身及其胞外产物(extracellular products, ECP)的致病性,以及ECP的溶血性、磷脂酶活性、引起的许氏平鲈组织病理损伤和对哺乳动物细胞的损伤作用等,系统分析了我国海水养殖系统中高致病性PDD菌株ECP的毒力特性,以期为进一步解析PDD的致病机制、开发疫苗和进行科学防控该菌感染提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和培养基

本研究选取的2株PDD菌株(实验室编号为PDD1605和PDD1608)均分离自海水网箱养殖患病许氏平鲈的体表溃疡处<sup>[4,24]</sup>,保存于中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖病原菌株库内。在前期的研究中已经证实,PDD1605和PDD1608菌株具有强溶血性及强磷脂酶活性<sup>[24-26]</sup>。本研究中,这2株细菌菌株都是在补充1.5%(W/V)NaCl的TSB培养基(青岛生工生物科技有限公司)上进行常规培养待用。

### 1.2 细菌ECP的提取

在TSB平板培养基上活化并纯化培养后,

分别挑取 2 株 PDD 菌株的单菌落,接种于 100 mL 的液体 TSB 培养基中,于 28 °C、180 r/min 振荡培养 8 h 制备种子液;然后吸取 10 mL 种子液接种于 500 mL 的液体 TSB 培养基中,于 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h,使培养基中的活菌浓度均达到  $10^9$  CFU/mL 以上。收取全部培养液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,收集上清并用直径为 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤除菌后,获得的上清液即为 ECP 原液<sup>[27]</sup>。吸取 100  $\mu$ L 的 ECP 涂布于 TSB 平板培养基上进行有无活菌的检验,确定培养基上无菌落长出后,将 ECP 原液装入灭菌的离心管中,保存于-80 °C 冰箱中备用。

### 1.3 PDD 菌株及其 ECP 的体内毒性测定

采用许氏平鲈人工感染的方式,进行 PDD 菌株及其 ECP 的体内毒性验证。本研究所用许氏平鲈购自山东某养殖场,体长为(12.68 $\pm$ 0.79) cm,体重为(37.47 $\pm$ 4.80) g,实验水温为(23 $\pm$ 1) °C,盐度为 28。在自然光周期条件下进行实验鱼的养殖,日投饵量为鱼体重的 1%,水族实验桶体积约为 260 L,所有实验鱼在进行感染实验以前均暂养 7 d 以上以确保鱼体健康。

菌株毒力的测定是将 90 条许氏平鲈随机分成 3 组,每组 30 条。2 个实验组分别以  $5 \times 10^8$  CFU/mL 浓度的 2 株 PDD 菌株活菌液对实验鱼进行腹腔注射感染,对照组注射等量的无菌 PBS (pH=7.4) 溶液,分别对许氏平鲈腹腔内注射接种 100  $\mu$ L,接种后观察鱼的临床症状变化,记录死亡时间和死亡数量。

ECP 毒力的测定是将 150 条许氏平鲈随机分成 5 组,每组 30 条,2 株 PDD 菌株的 ECP 为原液组、在 100 °C 下加热 10 min 的 2 株细菌 ECP 为加热组、对照组为等量的无菌 PBS (pH=7.4) 溶液,分别对许氏平鲈腹腔内注射接种 100  $\mu$ L,接种后观察鱼的临床症状变化,记

录死亡时间和死亡数量。实验鱼在注射感染后,有濒死鱼出现时每组分别随机挑取 3 条鱼进行解剖取样和组织病理学检测。组织病理学分析选定的组织为肝脏、脾脏、心脏和肠道,取好的组织样品首先固定在 Davison 固定液中,并用 70%乙醇溶液换液至不再变色,然后脱水、浸蜡、包埋并制作 5  $\mu$ m 厚度的切片,用苏木精和伊红染色、中性树脂封片后用光学显微镜观察。

### 1.4 ECP 的溶血活性和磷脂酶活性测定

采用选择培养基对 2 株 PDD 菌株的 ECP 进行平板法测定磷脂酶活性和溶血性,以及不同处理方式下磷脂酶和溶血素的稳定性。在含有 1.5% (W/V) NaCl 的 TSB 中分别补充 5% (V/V) 脱纤维绵羊血(青岛海博生物技术有限公司)和 3% (V/V) 蛋黄乳液(青岛海博生物技术有限公司)制备成测定溶血能力的绵羊血平板、测定卵磷脂分解能力的卵黄平板。

取菌株 PDD1605 和 PDD1608 的 ECP 原液为原液组,向绵羊血平板、卵黄平板的牛津杯孔中加入 100  $\mu$ L 的 ECP 原液,进行磷脂酶活力及溶血性测定,在 24–48 h 内进行观察并记录现象,对照为等量的无菌 PBS (pH=7.4) 溶液。为验证 ECP 磷脂酶和溶血素的稳定性,另设置 100 °C 下处理 ECP 样品 10 min 为加热组,ECP 中添加 NaCl 至 10% 浓度并 4 °C 过夜为高盐组,ECP 在 28 °C、180 r/min 的摇床上 0.5% (V/V) 甲醛溶液脱毒 24 h 为甲醛组,同样方法分别测定磷脂酶活性及溶血性。

### 1.5 ECP 的细胞毒性测定

实验细胞选用人胚肾细胞系 HEK293T 细胞和小鼠成纤维细胞系 MCFS 细胞(购自青岛菲优特检测有限公司),按照研究报道的方法进行细胞培养<sup>[28]</sup>,使用 DMEM 培养基(Hyclone)进行培养和维持,并添加 4 mmol/L L-谷氨酰胺、10% (V/V) 胎牛血清(Gibco)和 1% (V/V) 的青

霉素-链霉素溶液,细胞培养物在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 和 95%湿度的培养箱中温育。2 种细胞培养瓶内细胞长至密度为 100%时,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞并配制成细胞悬液,对细胞进行计数,以每孔 2×10<sup>4</sup>个细胞,接种于 96 孔细胞培养板(Corning)内培养过夜。向培养板中加入 10 μL 菌株 PDD1605 和 PDD1608 的 ECP,即 ECP 原液组;向培养板中加入 10 μL 2 株 PDD 菌株 100 °C 加热 10 min 的 ECP,即 ECP 加热组;另设置等量 PBS 对照组、空白对照组以及仅具有培养基的空白组。每组设 6 个平行,分别在培养箱中孵化 2、4、6、24、48 h 后,使用相差倒置显微镜,观察细胞的病变情况并拍照保存。在培养箱中孵化 24 h 后进行各组样品活力检测,向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 (碧云天)溶液,加完后轻击培养板混匀,将培养板在培养箱内孵育 1–4 h,用酶标仪在 450 nm 处读取 OD 值,以 630 nm 处读取的 OD 值做参照,计算细胞活力,计算公式为:

$$\text{细胞活力(\%)} = \frac{A_{450}(\text{实验组}) - A_{450}(\text{空白组})}{A_{450}(\text{PBS实验组}) - A_{450}(\text{空白组})} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 PDD 菌株及其 ECP 的体内毒性

人工感染实验结果发现, PDD1605 和 PDD1608 活菌株注射感染许氏平鲈后,实验组鱼均出现游动活力下降、呼吸频率增加和粘液分泌增多的现象,死亡的实验鱼腹腔内出现大量腹水并伴有腹腔出血、肝脾肿大以及胃肠道出血,部分实验鱼的鳍基部充血等病变现象。PDD1605 组实验鱼 12 h 内全部急性死亡,死亡率为 100%, PDD1608 组实验鱼 12 h 内死亡率为 83.3%, 24 h 内全部急性死亡,死亡率为 100%。PBS 对照组许氏平鲈状态正常,内脏器官无变化,也未出

现死亡现象(图 1)。实验结果证明, 2 株 PDD 菌株高浓度活菌液腹腔注射感染许氏平鲈后均出现短时间内的急性死亡,表现出极高的致病性。

2 株 PDD 菌株的 ECP 对许氏平鲈同样具有致死能力,腹腔注射感染 6 h 后 PDD1605 和 PDD1608 菌株 ECP 原液组开始出现死亡现象,其中 PDD1605 组在 12 h 内实验鱼死亡率 100%, PDD1608 组在 24 h 内实验鱼死亡率为 90%, 72 h 内死亡率 100%, PBS 对照组及 ECP 加热组在感染后 7 d 内未出现死亡现象(图 1) (加热组结果未展示)。

接种 ECP 原液的鱼主要临床症状表现为活力下降、呼吸频率增加和黏液增多,继而游泳姿态异常,体内出现腹水、肠道出血、肝脾肿大以及腹腔出血等病变现象。接种 ECP 加热组的实验鱼虽然在 7 d 内未出现死亡现象,但实验后解剖发现部分鱼的脾脏和肾脏也出现轻微肿大现象,而 PBS 对照组实验鱼活力状态正常,内脏器官无明显变化。

病理切片观察结果显示,接种 ECP 原液的实验鱼肠道、肝脏、心脏和脾脏均有不同程度

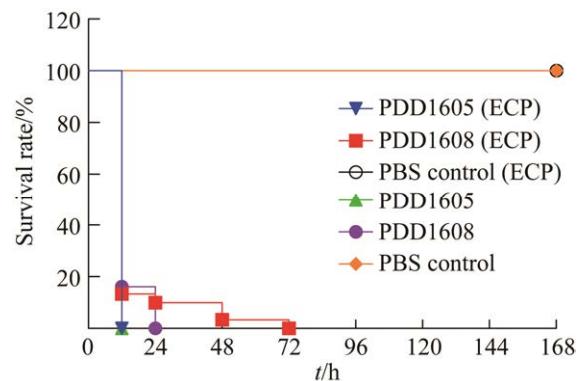


图 1 PDD 菌株及其 ECP 人工感染许氏平鲈实验结果

Figure 1 The artificial infection results of *Sebastes schlegelii* by PDD strains and its ECP.

的病变。PBS 对照组肠道中肠道组织结构完整，肠黏膜层清晰可见，PDD1605 组和 PDD1608 组的肠道中肠黏膜上皮细胞变性，肠黏膜层及肠黏膜下层组织崩解脱落。PBS 对照组心脏中心肌纤维组织排列紧密，PDD1605 组和 PDD1608 组的心脏心肌间被大量血细胞及炎性细胞浸润，心肌纤维扭曲、排列紊乱，部分区域肌纤维束解离、断裂，出现大面积的

局灶性坏死。PBS 对照组肝脏组织中肝细胞界限清晰完整，PDD1605 组和 PDD1608 组肝脏血细胞及炎性细胞严重浸润，肝细胞出现溶解性坏死；PBS 对照组脾脏组织结构清晰，可见明显的白髓区和红髓区，PDD1605 组和 PDD1608 组的脾脏红白髓界限不清，脾脏严重淤血、出血，均出现大面积的黄褐色血铁蛋白沉积(图 2)。

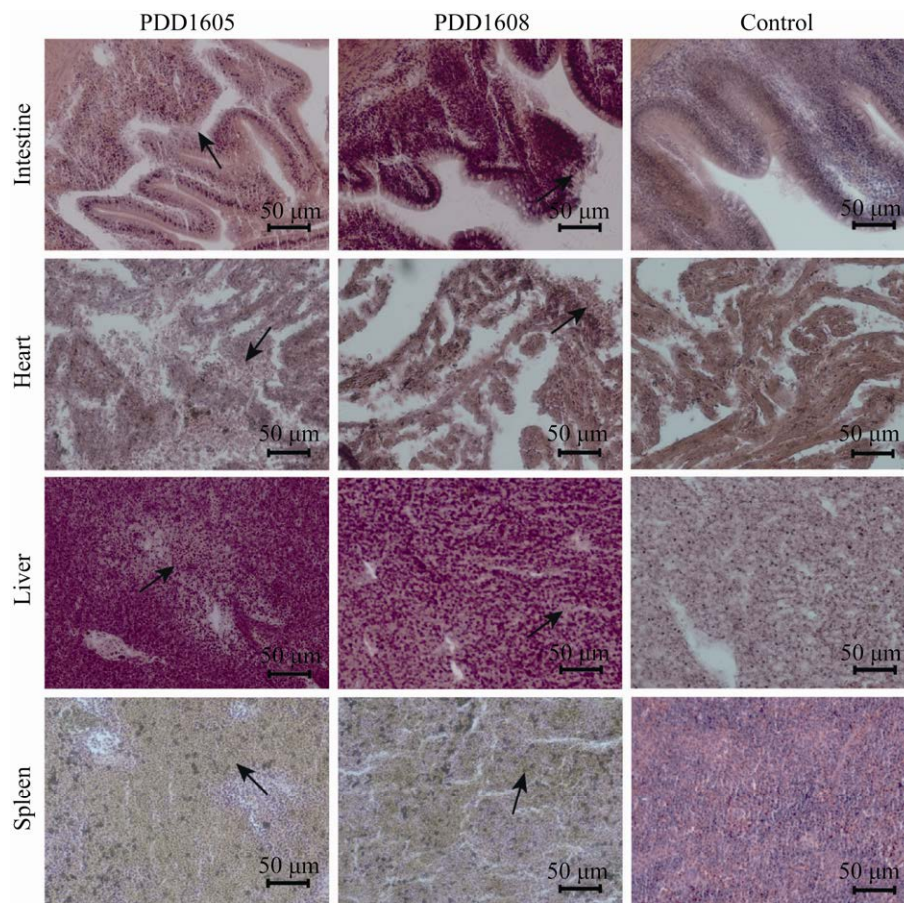


图 2 PDD 菌株 ECP 接种后许氏平鲈的肠道、肝脏、心脏和脾脏的组织病理切片

Figure 2 Histopathological changes of intestine, liver, heart and spleen of *Sebastes schlegeli* after inoculation with PDD strains ECP. PDD1605: disintegration and abscission of intestinal mucosal tissue. The myocardium of the heart was infiltrated by a large number of blood cells and inflammatory cells, and a large area of necrosis and ulcer appeared in the myocardial tissue. The infiltration of blood cells in liver was serious, and some tissue ulcers appeared. Hemosiderosis in the spleen (arrow). PDD1608: ulceration of intestinal mucosa. The myocardium of the heart was infiltrated by blood cells and inflammatory cells. Blood cell infiltration in liver and hemosiderosis in the spleen (arrow). Control: the organs and tissues all show the normal tissues structure.

## 2.2 ECP 的体外溶血性和磷脂酶活性测定

PDD1605 和 PDD1608 菌株的 ECP 原液在卵黄琼脂平板上都表现为强磷脂酶活性, 在绵羊血平板上都表现为强溶血活性。高盐处理组的 ECP 在卵黄琼脂平板和绵羊血平板上的现象与原液组相似。2 株 PDD 菌株 ECP 的甲醛处理组和加热处理组在绵羊血平板上溶血性消失, 但在卵黄琼脂平板上仍有不透明环出现, 表现为弱磷脂酶活性(图 3)。

## 2.3 ECP 的体外细胞毒性

使用人胚肾细胞系 HEK293T 和小鼠成纤维细胞系 MCFS 细胞接种 PDD 的 ECP 原液后 2、4、6、24、48 h (hpi)均显示出不同的细胞毒

性效应, 主要为退行性变化, 出现固缩性退变和圆形细胞簇等, 最后细胞完全脱离。在 2 hpi 时就能明显观察到 PDD1605 组和 PDD1608 组视野内的 2 种细胞大部分出现细胞皱缩和圆形细胞簇, 基本无贴壁的正常细胞, 如图 4 箭头所示。随着时间的推移, 细胞毒性作用愈加明显, ECP 原液组 48 hpi 时人胚肾细胞系 HEK293T 的细胞单层几乎完全被破坏, 而小鼠成纤维细胞系 MCFS 的细胞单层中也有大部分细胞被破坏(图 4)。观察发现加热处理组的 ECP 对 2 种细胞系基本无损伤作用, 细胞正常生长, 与 PBS 对照组和空白对照组观察结果相似(结果未展示)。

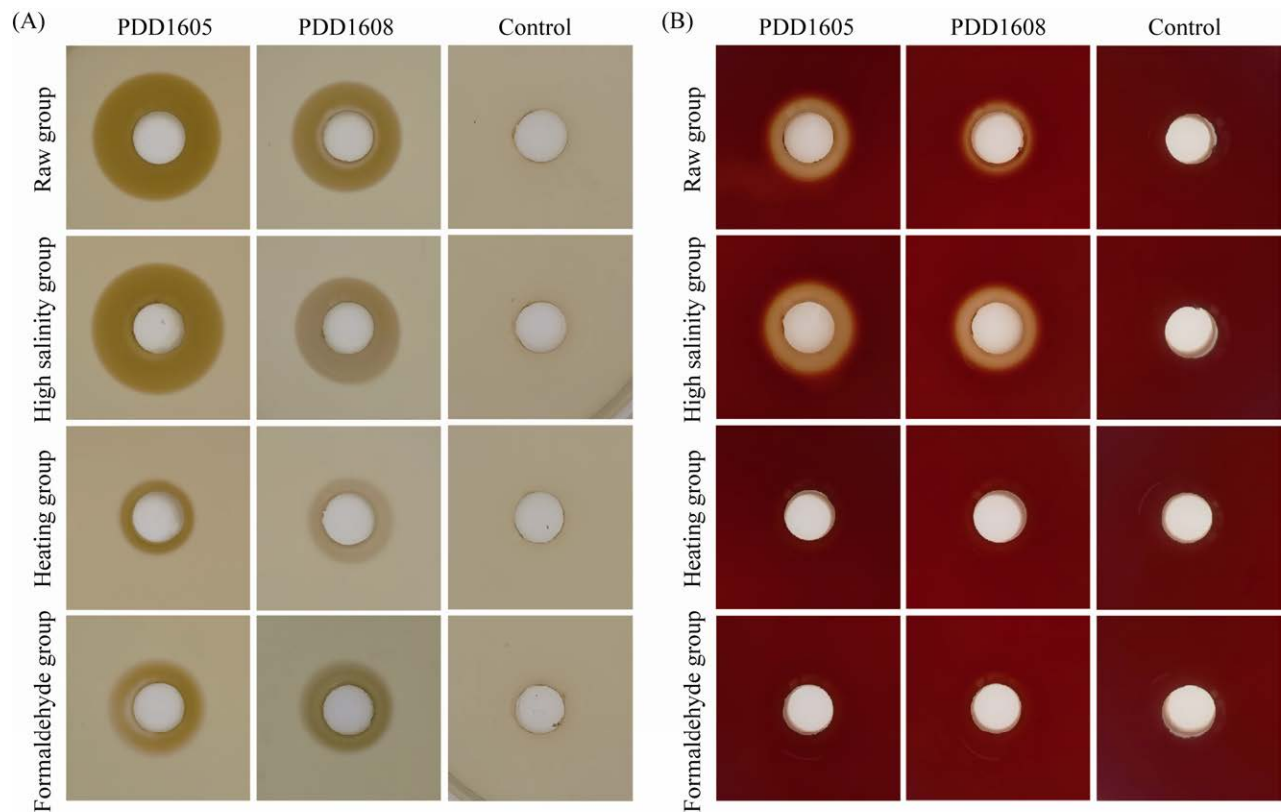


图 3 不同处理组 PDD 菌株 ECP 的磷脂酶活性和溶血活性

Figure 3 Hemolysis and phospholipase activities of PDD strains ECP in different treatment groups. A: yolk agar plate; B: sheep-blood plate.

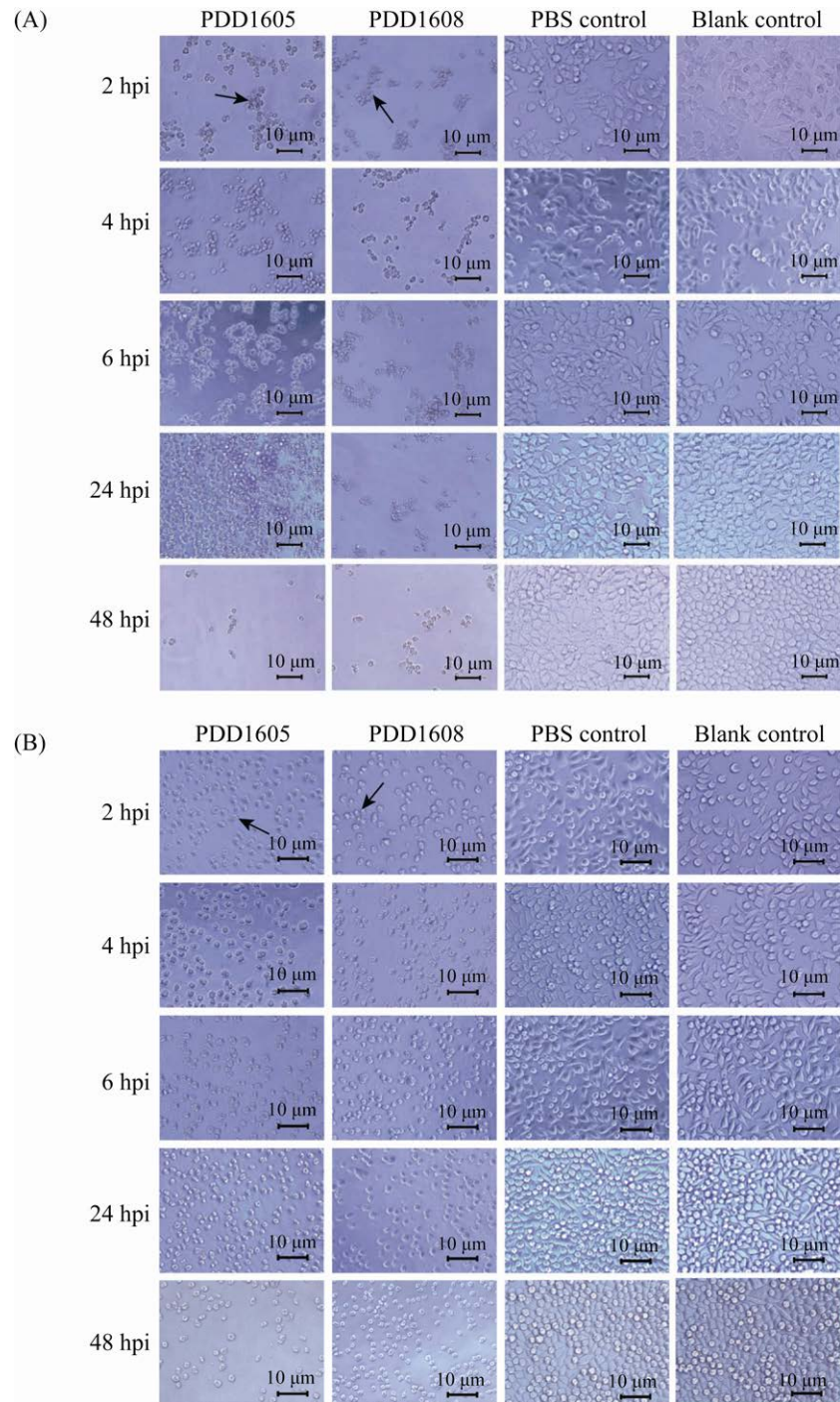


图4 接种 PDD 菌株 ECP 后 HEK293T 和 MCFS 的细胞毒性特征

Figure 4 Cytotoxicity of PDD strains ECP tested using HEK293T and MCFS cells. A: HEK293T cell line. The degenerative changes mainly consisted of the appearance of round cells clusters at 2 hpi (arrow), a total destruction of the cell monolayer at 48 hpi was observed. B: MCFS cell line. The degenerative changes mainly consisted of the appearance of degenerative cells shrinkage at 2 hpi (arrow), massive destruction of the cell monolayer at 48 hpi was observed.



根据 24 hpi 的 CCK-8 法测定数据结果分析, PDD1605 组和 PDD1608 组 ECP 原液导致人胚肾细胞系 HEK293T 和小鼠成纤维细胞系 MCFS 的体外培养细胞几乎全部失去活力, 细胞活力分别仅约 5%, 与显微观察的结果基本一致。加热处理组 ECP 测定数据证实 PDD1605 组和 PDD1608 组对 HEK293T 细胞有部分损伤, 但对 MCFS 细胞无损伤作用(表 1)。

### 3 讨论

已有研究证明, 细菌性病原体的致病性与对宿主红细胞的溶血性具有紧密相关性<sup>[29-31]</sup>。本研究中的 PDD1605 和 PDD1608 这 2 株 PDD 菌株均分离自我国海水网箱养殖的患病许氏平鲈体内, 具有强溶血性、强磷脂酶活性, 人工感染菌株 PDD1605 和 PDD1608 后许氏平鲈全部急性死亡, 表现为高致病性, 表明 PDD 菌株的溶血性可能与其高致病性表型存在相关性。细菌病原体可通过产生 ECP, 促进细菌在宿主体内的成功定殖和存活, 并对宿主产生毒力作用<sup>[32]</sup>。有研究表明, 美人鱼发光杆菌不同亚种毒力基因及胞外毒素存在较大差异<sup>[18,33]</sup>, 虽然国内有学者发现美人鱼发光杆菌的 ECP 具有致病能力, 且灭活后 ECP 具有一定的免疫效果, 但并未明确其所属亚种<sup>[34]</sup>。因此, 我国境内 PDD 流行株 ECP 的致病性与细胞毒性及其在菌株致

病机制中的作用尚不明确, 这造成我国海水养殖生产中对 PDD 的感染和传播进行科学防控缺少理论参考。

对于病原细菌而言, ECP 是毒力系统的重要组成部分, 其中的脂多糖、溶血素、酶等产物, 以及影响 ECP 分泌的分泌系统等在细菌致病过程中都可以发挥关键性作用<sup>[35]</sup>。通过分析细菌分泌的 ECP 来研究细菌病原的毒力因子, 以及“宿主—病原”的相互作用一直是鱼类病原菌致病机制研究的热点方向之一<sup>[36]</sup>。在本研究中, 通过人工感染许氏平鲈后发现, 高致病性 PDD 菌株的 ECP 与活菌株表现出非常相似的高致病性, 证实 PDD 的 ECP 致病能力与活菌株的致病能力具有正相关性。加热处理 PDD 的 ECP 后会失去其对许氏平鲈的致死能力, 这表明 ECP 的主要成分可能是不耐热的胞外毒素。用热处理后的 ECP 接种许氏平鲈出现了脾、肾等免疫器官的增大, 这表明 PDD 的 ECP 即使经过热处理失去毒力, 也有可能刺激了宿主发生免疫反应, 具有一定的抗原特性, 这与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) ECP 的相关研究结果相似<sup>[37]</sup>。此外, 注射感染 PDD 菌株的 ECP 后造成了许氏平鲈的肠道、肝脏、心脏和脾脏等主要内脏器官都出现了较为严重的组织病变, 这与陈德芳等对海豚链球菌(*Streptococcus iniae*) ECP 感染斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) 的组织病理研究结果相似<sup>[38]</sup>。

细菌的 ECP 中可能包含多种酶活性, 如溶血活性、细胞溶解活性、蛋白水解活性、脂肪水解活性, 以及细胞毒性等, 从而引起宿主组织破坏和出血, 协助病原菌感染宿主发生病变, 体外分析酶活性、溶血性和细胞损伤作用是研究其毒力特性的重要方式<sup>[39]</sup>。胞外产物中的磷脂酶和溶血素在病原菌的感染致病过程中起到重要作用, 是细菌的重要毒力因子。本研究选

表 1 CCK-8 法检测接种 PDD 菌株 ECP 后 HEK293T 和 MCFS 细胞活力

Table 1 The HEK293 and MCFS cell viability after inoculated with PDD strains ECP detecting by CCK-8 method

Group	Strain number	HEK293T/%	MCFS/%
Raw	PDD1605	6.91	4.56
	PDD1608	7.45	4.56
Heating	PDD1605	60.64	98.78
	PDD1608	61.17	97.57

取 PDD 菌株典型的溶血性和磷脂酶活性进行体外测定, 研究发现高致病性 PDD 菌株的 ECP 经过高温、高盐和甲醛 3 种不同方式分别处理后, 高盐组 ECP 的磷脂酶活性和溶血活性基本不变, 与原液组相似, 证实 PDD 的 ECP 具有耐高盐的特性。加热组和甲醛组中溶血活性全部消失, 但仍有部分磷脂酶活性, 有研究报道表现为强磷脂酶活性的 PDD 菌株所表达的磷脂酶加热后未完全失活, 热稳定性较高<sup>[40]</sup>, 这与本研究的结果类似。通过细胞培养来研究 ECP 在细胞系中导致的细胞病理学变化和分析细菌 ECP 的毒力作用, 是一种重要的细菌 ECP 毒力分析方法<sup>[41]</sup>。在本研究中, 2 株 PDD 菌株的 ECP 对人胚肾细胞系 HEK293T 细胞和小鼠成纤维细胞系 MCFS 细胞均表现了不同程度的细胞毒性效应, 且与 ECP 致病性成正相关性。其中, 未经处理的 PDD1605 组和 PDD1608 组 ECP 原液造成 2 种细胞几乎完全失去细胞活力。加热处理组的 ECP 对小鼠成纤维细胞系 MCFS 细胞失去细胞毒性, 表明其存在不耐热的胞外毒素, 与 ECP 的体内毒性结果高度一致, 与 3 种新的发光杆菌属细菌 ECP 的细胞毒性报道结果类似<sup>[40]</sup>。然而本研究加热处理组中的 ECP 对人胚肾细胞系 HEK293T 仍造成了部分损伤, 推测可能与其仍具有部分磷脂酶活性有关。

目前的相关研究中, 有国外学者已证明 ECP 中的磷脂酶和溶血毒素在 PDD 的发病机制中起重要作用<sup>[42]</sup>。本研究进一步证实了我国境内具有强溶血性和强磷脂酶活性的 PDD 流行株及其 ECP 都具有高致病性, 两者均可急性致死许氏平鲉, 造成肝、脾、心和肠道等器官的细胞变性、坏死等组织学病变。通过 ECP 在体外细胞系中导致细胞形态结构的病理变化、磷脂酶活力及溶血能力等多方面毒力测定, 结果表明 ECP 中的毒力因子具有体外溶血活性和磷脂酶

活性、细胞毒性等毒力特征。ECP 在体内和体外呈现的毒性也与菌株本身的致病性呈现高度的正相关性, 这一现象与其他鱼类病原体报道的结果基本一致<sup>[43]</sup>。同时, 也进一步表明 ECP 可能是在高致病性 PDD 菌株的致病过程中使感染动物发生急性死亡的重要原因, 是 PDD 毒力系统的核心要素之一。本研究的结果有助于加强对我国 PDD 高致病性流行株毒力特性的认知, 为开发 PDD 疫苗和进行高效防控提供了重要参考。

### 参考文献

- [1] Takahashi H, Miya S, Kimura B, Yamane K, Arakawa Y, Fujii T. Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 2008, 45(2): 150–158.
- [2] Inglis V, Roberts R, Bromage N. Bacterial diseases of fish. Halsted Press, 2013.
- [3] Love M, Teebken-Fisher D, Hose JE, Farmer JJ 3rd, Hickman FW, Fanning GR. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*, 1981, 214(4525): 1139–1140.
- [4] Zhang Z, Yu YX, Wang K, Wang YG, Jiang Y, Liao MJ, Rong XJ. First report of skin ulceration caused by *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in net-cage cultured black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 2019, 503: 1–7.
- [5] 杨楠, 张志强, 吴同垒, 王洪彬, 史秋梅, 高桂生. 半滑舌鳎源美人鱼发光杆菌美人鱼亚种的分离鉴定. *中国兽药杂志*, 2018, 52(2): 19–25.  
Yang N, Zhang ZQ, Wu TL, Wang HB, Shi QM, Gao GS. Isolation and identification of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from tongue sole. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(2): 19–25. (in Chinese)
- [6] Terceti MS, Ogut H, Osorio CR. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the black sea: evidence of a multiclonal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3736–3745.
- [7] Sharma SRK, Pradeep MA, Sadu N, Dube PN, Vijayan KK. First report of isolation and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from

- cage-farmed coibia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(7): 953–958.
- [8] 王丽芳, 于永翔, 王印庚, 廖梅杰, 荣小军, 李彬, 秦蕾, 张正. 海水鱼源美人鱼发光杆菌美人鱼亚种对小鼠的致病性研究. *动物医学进展*, 2021, 42(9): 85–91.  
Wang LF, Yu YX, Wang YG, Liao MJ, Rong XJ, Li B, Qin L, Zhang Z. Study on the pathogenicity of a *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strain isolated from diseased marine fish to mice. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(9): 85–91. (in Chinese)
- [9] Rivas AJ, Lemos ML, Osorio CR. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 283.
- [10] Thune RL, Stanley LA, Cooper RK. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1993, 3: 37–68.
- [11] García-Rosado E, Cano I, Martín-Antonio B, Labella A, Manchado M, Alonso MC, Castro D, Borrego JJ. Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2007, 10(3): 193–199.
- [12] Austin B, Austin DA. *Bacterial Fish Pathogens*. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- [13] Cole DW, Cole R, Gaydos SJ, Gray J, Hyland G, Jacques ML, Powell-Dunford N, Sawhney C, Au WW. Aquaculture: environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2009, 212(4): 369–377.
- [14] Farto R, Pérez MJ, Fernández-Briera A, Nieto TP. Purification and partial characterisation of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. *Veterinary Microbiology*, 2002, 89(2/3): 181–194.
- [15] Farto R, Armada S, Montes M, Perez M, Nieto T. Presence of a lethal protease in the extracellular products of *Vibrio splendidus*-*Vibrio lentus* related strains. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29(12): 701–707.
- [16] Ishihara M, Kawanishi A, Watanabe H, Tomochika KI, Miyoshi SI, Shinoda S. Purification of a serine protease of *Vibrio parahaemolyticus* and its characterization. *Microbiology and Immunology*, 2002, 46(4): 299–303.
- [17] 王淑娴. 海洋弧菌中五类溶血素基因分布及其生物学活性研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2007.
- [18] Osorio CR, Vences A, Matanza XM, Terceti MS. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(15): e00002–e00018.
- [19] Rivas AJ, Balado M, Lemos ML, Osorio CR. The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infection and Immunity*, 2011, 79(11): 4617–4627.
- [20] Vences A, Rivas AJ, Lemos ML, Husmann M, Osorio CR. Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(11): 401–417.
- [21] Kreger AS, Bernheimer AW, Etkin LA, Daniel LW. Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infection and Immunity*, 1987, 55(12): 3209–3212.
- [22] Rivas AJ, von Hoven G, Neukirch C, Meyenburg M, Qin QQ, Füser S, Boller K, Lemos ML, Osorio CR, Husmann M. Phobalysin, a small  $\beta$ -pore-forming toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 2015, 83(11): 4335–4348.
- [23] 邓益琴, 徐力文, 张亚秋, 郭志勋, 冯娟. 我国华南沿海海水养殖鱼类病原菌美人鱼发光杆菌 (*Photobacterium damsela*) 分离株的毒力基因和耐药性分析. *微生物学报*, 2020, 60(11): 2606–2619.  
Deng YQ, Xu LW, Zhang YQ, Guo ZX, Feng J. Analysis of virulence genes and antibiotic resistance of *Photobacterium damsela* isolated from marine fishes in coastal South China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(11): 2606–2619. (in Chinese)
- [24] 刘潇, 张正, 王丽芳, 于永翔, 王印庚, 廖梅杰, 谢国骊, 邢婧, 张浩, 王凯, 许悦. 海南地区与环渤海湾美人鱼发光杆菌美人鱼亚种水产动物分离株的表型与遗传特征分析. *微生物学报*, 2021, 61(7): 2101–2111.  
Liu X, Zhang Z, Wang LF, Yu YX, Wang YG, Liao MJ, Xie GS, Xing J, Zhang H, Wang K, Xu Y. Phenotypic and genetic diversity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from aquatic animals in Hainan Province and Bohai Sea region. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 2101–2111. (in Chinese)
- [25] 施琳妮, 于永翔, 姜勇, 张正, 王印庚, 廖梅杰, 荣小军. 不同来源美人鱼发光杆菌美人鱼亚种菌株表型差异性分析. *海洋科学*, 2019, 43(6): 15–24.  
Shi LN, Yu YX, Jiang Y, Zhang Z, Wang YG, Liao MJ, Rong XJ. Studies on the phenotypic differences of different *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains. *Marine Sciences*, 2019, 43(6): 15–24. (in Chinese)

- [26] 刘潇. 海水养殖三种重要病原菌的生理代谢表型与遗传多态性研究. 中国海洋大学硕士论文, 2021.
- [27] 熊静, 赖晓健, 余钦, 郭松林, 徐继松, 黄文树. 7株鳗鲡致病性气单胞菌毒力基因胞外产物及其活性比较. *华中农业大学学报*, 2017, 36(1): 76–85.  
Xiong J, Lai XJ, Yu Q, Guo SL, Xu JS, Huang WS. Analysis of virulence genes, extracellular products and activities among seven *Aeromonas* strains isolated from eels. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2017, 36(1): 76–85. (in Chinese)
- [28] Phelan K, May KM. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current Protocols in Toxicology*, 2016, 70(1): A.3B.1–A.3B.22.
- [29] Borrego JJ, Moriñigo MA, Martínez-Manzanares E, Bosca M, Castro D, Barja JL, Toranzo AE. Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Medical Microbiology*, 1991, 35(5): 264–269.
- [30] Fouz B, Barja JL, Amaro C, Rivas C, Toranzo AE. Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Current Microbiology*, 1993, 27(6): 341–347.
- [31] Pedersen K, Skall HF, Lassen-Nielsen AM, Bjerrum L, Olesen NJ. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(5): 465–472.
- [32] Bakopoulos V, Pearson M, Volpatti D, Gousmani L, Adams A, Galeotti M, Dimitriadis GJ. Investigation of media formulations promoting differential antigen expression by *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and recognition by sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), immune sera. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(1): 1–13.
- [33] Pham TH, Cheng TC, Wang PC, Chen SC. Genotypic diversity, and molecular and pathogenic characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from different fish species in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(7): 757–774.
- [34] 王洪彬. 美人鱼发光杆菌胞外产物的主要生物学特性分析及免疫保护评价. 河北科技师范学院硕士学位论文, 2019.
- [35] Pablos M, Remacha MA, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, García-López ML. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2010, 29(9): 1163–1172.
- [36] Ellis AE, Hastings TS, Munro ALS. The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis. *Journal of Fish Diseases*, 1981, 4(1): 41–51.
- [37] Rey A, Verján N, Ferguson HW, Iregui C. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record*, 2009, 164(16): 493–499.
- [38] 陈德芳, 汪开毓, 王均, 耿毅, 黄凌远, 胡迪, 景简飞. 海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)胞外产物对斑点叉尾(*Ictalurus punctatus*)的致病性. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2): 326–331.  
Chen DF, Wang KY, Wang J, Geng Y, Huang LY, Hu D, Jing JF. Pathogenicity on channel catfish *Ictalurus punctatus* by extracellular products of *Streptococcus iniae*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 326–331. (in Chinese)
- [39] Ben Hamed S, Tavares Ranzani-Paiva MJ, Tachibana L, De Carla Dias D, Ishikawa CM, Esteban MA. Fish pathogen bacteria: adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 550–562.
- [40] Labella AM, Rosado JJ, Balado M, Lemos ML, Borrego JJ. Virulence properties of three new *Photobacterium* species affecting cultured fish. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(1): 37–50.
- [41] Labella A, Sanchez-Montes N, Berbel C, Aparicio M, Castro D, Manchado M, Borrego JJ. Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2010, 92(1): 31–40.
- [42] Rivas AJ, Balado M, Lemos ML, Osorio CR. Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 2013, 81(9): 3287–3299.
- [43] Pridgeon JW, Klesius PH, Song L, Zhang DH, Kojima K, Mobley JA. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. *Veterinary Microbiology*, 2013, 164(3/4): 336–343.

(本文责编 李磊)