

甘胆口服液对副溶血弧菌的抑菌作用及转录组分析

褚宽^{1,2,3#}, 黄雷^{2#}, 郑阿钦², 蔡雪², 程安达⁴, 原居林², 吕利群^{1,3*},
姚嘉赞^{2*}

- 1 上海海洋大学, 国家水生动物病原库, 上海
- 2 浙江省淡水水产研究所, 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州市渔业环境与水产品质量安全重点实验室, 浙江 湖州
- 3 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海
- 4 北京市中兽药工程技术研究中心, 北京

褚宽, 黄雷, 郑阿钦, 蔡雪, 程安达, 原居林, 吕利群, 姚嘉赞. 甘胆口服液对副溶血弧菌的抑菌作用及转录组分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 683-697.

CHU Kuan, HUANG Lei, ZHENG Aqin, CAI Xue, CHENG Anda, YUAN Julin, LYU Liqun, YAO Jiayun. Inhibition effect and transcriptome analysis of Gan Dan oral liquid against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 683-697.

摘要:【目的】探究甘胆口服液(Gan Dan oral liquid, GD)对副溶血弧菌的体外抑菌活性, 并从转录组水平解析 GD 抗副溶血弧菌的分子机制。【方法】基于最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)、最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)和抑菌动态生长曲线, 评价 GD 对副溶血弧菌的体外抑菌活性; 通过扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)和透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)分析 GD 处理对副溶血弧菌细胞结构的影响; 利用转录组测序及生物信息学技术分析 1/4MIC 浓度的 GD 处理对副溶血弧菌转录组的影响, 并采用逆转录实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)进行验证。【结果】GD 对副溶血弧菌具有较好体外抑菌活性, 其 MIC 和 MBC 值分别为 7.6 mg/mL 和 15.2 mg/mL。1/4MIC 浓度的 GD 处理破坏了副溶血弧菌细胞壁结构完整性, 影响了细胞膜的通透性, 导致胞内大分子物质外漏。转录组分析结果表明, GD 处理显著改变了副溶血弧菌的转录组, 造成 1 074 个基因显著上调, 以及 1 179 个基因显著下调。其中, 下调基因主要富集在肌苷酸、核糖核苷合成代谢以及柠檬酸循环等通路, 上调基因主要涉及转录因子活性、细胞壁合成代谢等通路。【结论】GD 可能通过破坏菌体细胞壁和细胞膜结构的完整性, 抑制细菌的能量代谢和生物合成等功能, 进而对副溶血弧菌产生抑菌作用。

关键词: 副溶血弧菌; 抗菌药物; 细胞结构; 抑菌活性; 转录组

资助项目: 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(2024C02005, 2022C2027)

This work was supported by the Zhejiang Technology Collaboration Project of “Jian Bing” “Ling Yan” (2024C02005, 2022C2027).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LYU Liqun, lqlv@shou.edu.cn; YAO Jiayun, yaojiayun@126.com

Received: 2024-09-06; Accepted: 2024-11-18; Published online: 2024-12-20

Inhibition effect and transcriptome analysis of Gan Dan oral liquid against *Vibrio parahaemolyticus*

CHU Kuan^{1,2,3#}, HUANG Lei^{2#}, ZHENG Aqin², CAI Xue², CHENG Anda⁴, YUAN Julin², LYU Liqun^{1,3*}, YAO Jiayun^{2*}

1 National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai, China

2 Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Key Laboratory of Fishery Environment and Aquatic Product Quality and Safety of Huzhou City, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou, Zhejiang, China

3 National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai, China

4 Beijing Engineering Research Center of Chinese Traditional Veterinary Medicine, Beijing, China

Abstract: **[Objective]** To investigate the *in vitro* inhibitory activity of Gan Dan oral liquid (GD) against *Vibrio parahaemolyticus* and decipher the inhibition mechanism at the transcriptome level. **[Methods]** The *in vitro* inhibitory activity of GD against *V. parahaemolyticus* was evaluated based on the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and growth curve. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy were employed to analyze the effect of GD on the cellular structure of *V. parahaemolyticus*. Transcriptome sequencing coupled with bioinformatics methods were employed to investigate the effect of GD at 1/4MIC on the transcriptome of *V. parahaemolyticus*, and the obtained results were examined by real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). **[Results]** GD exhibited high *in vitro* inhibitory activity against *V. parahaemolyticus*, with the MIC and MBC of 7.6 mg/mL and 15.2 mg/mL, respectively. The GD treatment at a concentration of 1/4MIC disrupted the cell wall integrity and increased cell membrane permeability of the pathogen, and leading to the leakage of intracellular macromolecules. The results of transcriptome sequencing showed that GD treatment significantly altered the transcriptome profile of *V. parahaemolyticus*, resulting in significant upregulation of 1 074 genes and significant downregulation of 1 179 genes. The downregulated genes were mainly enriched in pathways related to the synthesis of inosinate and ribonucleoside, whereas the upregulated genes were primarily categorized into pathways associated with transcription factor activity and cell wall synthesis. **[Conclusion]** GD may inhibit *V. parahaemolyticus* by disrupting cell structure and inhibiting cellular energy metabolism and biosynthesis.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; antibacterial drugs; cellular structure; antibacterial activity; transcriptome

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐性革兰氏阴性菌,广泛分布于海洋、河口,也常见于水产养殖环境中。该菌具有条件性致

病的特性,在环境恶化、宿主机体免疫下降时可入侵水生动物,导致病害暴发。据报道,副溶血弧菌可感染鱼、虾、蟹、贝等数十种海水、

淡水养殖动物, 每年给水产养殖业造成数十亿美元的经济损失^[1]。副溶血弧菌也是一种食源性致病菌, 人类误食该菌感染的水产品, 可能出现呕吐、腹泻、腹痛等急性肠胃炎症状, 严重时引发败血症, 导致多器官衰竭甚至死亡^[2-3]。目前, 抗生素仍是治疗水产动物副溶血弧菌感染的主要药物, 但长期使用抗生素导致病原菌产生耐药性, 并在水产品中留下药物残留等诸多问题^[4]。2019年, 农业农村部等10部委联合发布了《关于加快推进水产养殖业绿色发展的若干意见》, 其中明确指出要开展水产养殖用药减量行动, 开发绿色安全的抗生素替代产品^[5]。

中草药是中华民族的瑰宝, 具有低毒副、低残留、不易产生耐药性等优点, 已被用作抗生素的重要替代品, 广泛应用于水产动物弧菌病的防治中^[6-7]。据报道, 在饲料中添加500 mg/kg 三黄散或0.6% 青蒿素, 可增强凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的免疫和抗氧化能力, 并降低其在副溶血弧菌侵染后的死亡率^[8-9]。五倍子也被报道能抑制副溶血弧菌生长, 其水提取物的体外最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)低于0.2 mg/mL, 而且用20 mg/L 的五倍子水提取物对副溶血弧菌感染的泥蟹(*Scylla paramosain*)进行药浴治疗, 可有效降低泥蟹的死亡率^[10]。中药复方在病原菌方面往往优于单味中药的效果, 在体外试验中, 乌梅与石榴皮联用配伍对副溶血弧菌的MIC值为7.81 mg/mL, 而乌梅、石榴皮单味药物的MIC值均为31.25 mg/mL^[11]; 240 mg/mL 的黄连、板蓝根、黄柏中药复方对河流弧菌(*V. fluvialis*)的抑菌作用强大, 其效果优于单味中药的抑菌效果^[12]。目前, 关于中草药抗副溶血弧菌的作用机制已进行一些探索。据报道, 柠檬草精油、原茶儿酸、黄芩醇提物^[13-15]可能通过破坏副溶

血弧菌细胞结构的完整性、干扰细胞能量代谢、抑制生物被膜形成等途径发挥抑菌作用。然而, 现有研究仅从宏观角度初步分析了这些中药的抗菌机制, 对于中草药抗弧菌的分子机制仍不清楚。

近年来, 随着基因组学的飞速发展, 高通量测序技术已被广泛应用于功能基因的挖掘、分子标记的筛选等研究。通过转录组测序技术, 能够全面研究药物干预后菌体细胞内所有转录基因的表达变化, 从而系统解析药物的作用机制^[16]。甘胆口服液(Gan Dan oral liquid, GD)是农业农村部批准的国家三类新兽药(兽用), 其主要成分包括甘草、板蓝根、人工牛黄、冰片等^[17]。程安达等研究发现, 甘胆口服液对副溶血弧菌引起的对虾肝胰腺损伤有良好的修复作用^[18], 但GD对副溶血弧菌的作用机制尚不清楚。本研究通过抑菌活性、电镜观察等指标, 明确GD对副溶血弧菌的抑菌作用, 并利用转录组测序技术(RNA-Seq)分析GD对副溶血弧菌转录组的影响, 解析其中关键的差异表达基因和通路, 以期为副溶血弧菌防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

2216E 肉汤、琼脂培养基均购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 刃天青购自上海源叶生物科技有限公司; 细菌RNA提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit、通用荧光定量PCR试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)、ROX plus 等 RT-qPCR 相关试剂均购自 TaKaRa 公司; 板蓝根、人工牛黄、甘草、冰片、猪胆粉、玄明粉均购自云南保和堂中医药有限公司; 乙醇、丙二醇、碳酸氢钠均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 甘胆口服液的制备

参照江厚生等^[17]方法制备甘胆口服液(GD), 称取板蓝根 100 g、甘草 40 g、玄明粉 30 g, 加 1 400 mL 水煎煮 3 次, 将 3 次煎液合并滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.15–1.20 (50 °C), 放冷后加入 500 mL 乙醇, 过滤并回收乙醇, 加水约 250 mL, 静置备用。称取猪胆粉 20 g、人工牛黄 34 g、冰片 20 g, 加入乙醇 100 mL 使其溶解, 加入上述提取液, 加水至 1 000 mL, 搅匀滤过后即得 GD, 每毫升药液约含有 0.244 g 原生药, 即浓度约为 244 mg/mL。

1.3 菌株培养

副溶血弧菌 CICC 21617 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC), 经鉴定该菌符合副溶血弧菌的生理生化特性, 多次传代后仍具有溶血性, 携带 *PirA* 毒力基因, 且对虾类有致病性。在副溶血弧菌 CICC 21617 菌液中加入终浓度为 20% 的甘油, 保存于 -80 °C 超低温冰箱。在无菌条件下将副溶血弧菌划线接种于 2216E 琼脂平板上, 28 °C 培养 24 h, 挑取单菌落接种于 2216E 肉汤培养基, 28 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 通过比浊法测定副溶血弧菌菌液浓度。在后续实验中, 用 2216E 肉汤培养基将菌液调至所需浓度。

1.4 最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)测定

采用刃天青显色法^[19]测定 GD 对副溶血弧菌 CICC 21617 的 MIC, 在无菌超净台中取一块无菌的 96 孔板, 在第一列各孔中加入 100 μ L 244 mg/mL 的 GD, 逐列用 2216E 肉汤培养基进行 2 倍梯度稀释, 使药物终浓度分别为 122、61、30.5、15.2、7.6、3.8、1.9、0.96、0.48 和 0.24 mg/mL, 另设置 1 列作阳性对照(加入 100 μ L 1×10^5 CFU/mL 的副溶血弧菌菌液)和 1 列

阴性对照(加入 100 μ L 2216E 肉汤培养基), 最后在各浓度药物组和阳性对照组的孔中添加 100 μ L 1×10^5 CFU/mL 的副溶血弧菌菌液, 阴性对照加等量的 2216E 肉汤培养基。将 96 孔板放入 28 °C 恒温培养箱, 24 h 后加入 50 μ L 蓝色刃天青溶液, 12 h 后观察培养液颜色变化, 若培养液保持蓝色表明细菌生长受抑制, 培养液变粉色说明有细菌生长, 将抑制细菌生长的最低药物浓度作为 MIC。吸取 MIC 浓度以上菌液各 100 μ L, 分别涂布于 2216E 琼脂平板上, 28 °C 培养 24 h, 观察是否有菌落长出, 将无菌生长的最低药物浓度作为 MBC。

1.5 生长曲线测定

将副溶血弧菌 CICC 21617 接入 2216E 肉汤培养基培养过夜, 并用培养基将菌液浓度调整为 1×10^7 CFU/mL, 按照体积分数为 1% 的接种量接入含 6 mL 灭菌 2216E 肉汤培养基的无菌试管(规格为 10 mL), 即得初始菌液浓度为 1×10^5 CFU/mL。上述试管分别加入不同浓度的 GD 药液, 使其终浓度分别为 MIC、1/2MIC 和 1/4MIC, 同时设置空白对照组(添加等量 PBS 溶液), 每组 3 个重复。将试管放入恒温摇床, 在 28 °C、150 r/min 条件下振荡培养 32 h, 确保达到细菌的稳定生长期, 其间每 2 h 测定菌液 OD_{600} 值, 绘制细菌生长曲线。

1.6 扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)观察

将副溶血弧菌 CICC 21617 培养 12 h 至对数生长期(OD_{600} 值为 0.6–0.8), 用培养基将菌液浓度调整至 1×10^5 CFU/mL, 加入终浓度为 1/4MIC 的 GD, 另设置对照组(添加等量 PBS 溶液), 28 °C 静置 6 h, 取 1 mL 菌液, 在 4 °C、4 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃去上清液, 用 PBS 清洗菌体沉淀, 加入 2.5% 戊二醛, 放入 4 °C 冰箱过夜。用不同浓度乙醇(30%、

50%、70%、90% 和 100%)对样品进行连续梯度脱水, 采用干燥仪干燥样品, 喷金制样, 通过扫描电子显微镜(HITACHI 公司)和透射电子显微镜(HITACHI 公司)观察菌体表面及内部形态结构。

1.7 转录组实验设计及细菌 RNA 提取

基于转录组测序技术分析 GD 对副溶血弧菌 CICC 21617 转录水平的影响。收集超过 0.1 g 的菌体, 依据预实验结果确定初始菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL, GD 药物浓度为 1/4MIC。实验组(GD)副溶血弧菌菌液中添加 1/4MIC 浓度的 GD, 对照组(CK)添加等量 PBS, 每组 3 个重复。将两组菌液置于 28 °C、150 r/min 条件下处理 6 h, 参照翟立公等^[20]方法提取菌液总 RNA, 使用 Agilent 2100 生物分析仪测定提取的 RNA 质量, 采用 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific 公司)超微量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, 将符合质量要求 (OD_{260}/OD_{280} 为 1.8–2.0, OD_{260}/OD_{230} 大于 2.0, 总质量大于 2 μ g)的样品用于后续实验。

1.8 cDNA 文库构建及测序数据质控

利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 随后对 cDNA 进行纯化和浓缩, 再依次进行末端修复、加碱基 A、加测序接头处理、PCR 纯化和富集等操作, 从而构建出最终的 cDNA 文库, 然后用 NovaSeq X Plus 平台进行测序。对下机数据进行质控处理, 去除包含 adapter 序列的 reads、剔除测序质量值低于 Q20 的序列等。使用统计学方法对所测得的 reads 进行碱基质量、碱基错误率等分析, 采用 Bowtie2 将测序序列与副溶血弧菌参考基因组(GenBank 登录号为 gca_000196095.1)进行比对, 获得基因的功能信息。

1.9 差异表达基因及功能分析

采用韦恩图分析 GD 处理组和对照组的共享

及特有基因; 运用主成分分析 (principal component analysis, PCA)表征不同组别样品转录组的总体差异; 利用 R 语言的 heatmap 软件包绘制热图, 对各组样品进行聚类分析。使用 DESeq2 筛选出各组间差异表达基因 ($|\log_2$ fold change $| > 1$, $P < 0.05$), 并通过表达量差异散点图可视化显著上调和下调的基因数量及其分布。基于 Fisher 精确检验方法, 利用 goatools 软件对差异表达基因进行 GO 富集分析, 采用 KOBAS 软件对差异表达基因进行 KEGG 信号通路的富集分析, 当经过校正的 P 值 ($P_{\text{adjust}} < 0.05$) 时, 认为此 GO 功能或 KEGG 信号通路被显著富集。

1.10 逆转录实时定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 验证

为验证测序结果的准确性, 选取显著上调和下调基因各 6 个, 进行 RT-qPCR 验证试验。将这些待验证的基因序列上传至 NCBI 数据库, 使用 Primer-BLAST 功能设计目的基因引物 (表 1), 并由浙江尚亚生物技术有限公司合成。采用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 以此为模板, 以 16S rRNA 基因为内参基因, 进行 RT-qPCR 试验。反应体系 (10 μ L): SYBR Mix 5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/mL) 各 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 3.2 μ L。反应程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 45 个循环。采用熔解曲线分析产物特异性。

1.11 数据处理及分析

实验数据采用 SPSS v27.0.1 进行统计分析, 采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 或独立样本 t 检验 (independent t -test) 检验各组数据的差异, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。文中图表用 Origin 2022 或 Microsoft Visio 2023 绘制。

表1 RT-qPCR所用引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR

Primers name	Primer sequences (5'→3')	T_m value	Amplicon size (bp)
16S rRNA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55.40	1 465
16S rRNA-R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	55.81	
<i>gltD</i> -F	AAACGCGCAACAACACTACGTC	60.04	156
<i>gltD</i> -R	AAACGCGCAACAACACTACGTC	60.11	
<i>gltB</i> -F	GTGTTTAACCAAGCGCAGCA	59.97	151
<i>gltB</i> -R	ACAGCATGGTTCCGACAGAG	60.04	
<i>hisC</i> -F	TGACCTTGCTGGCATCGAAT	60.04	141
<i>hisC</i> -R	ACCACGATTGCTCGGTCTTT	59.97	
<i>cysE</i> -F	TGTGCGGCACTGAGTTACAT	59.97	136
<i>cysE</i> -R	CACAAATGTCACACGCAGCA	59.97	
<i>ftsE</i> -F	CAATGGTCACGACATCACGC	59.90	113
<i>ftsE</i> -R	TGTCGTACACACTGCGATCC	60.11	
<i>mcp</i> -F	TTTCTCGCACAAGCATTGCC	60.04	120
<i>mcp</i> -R	ATGCCGTTGCGATTTGACTG	59.83	
<i>VP2355</i> -F	TGCGTTTTTCAGGCACTTTCG	59.97	127
<i>VP2355</i> -R	TTGCGGCTCATAACCGATAACC	59.97	
<i>glgP</i> -F	ATTGCGAAGTACGCCACTGA	60.04	161
<i>glgP</i> -R	TTGTACTCGTGCAGACGCTT	59.97	
<i>ftsY</i> -F	GCAAACATCGGTGCTGGTTT	59.97	180
<i>ftsY</i> -R	AAGGGCTTCGCCATCTTTCA	59.96	
<i>fhuC</i> -F	CTAGATGAACCGACCTCCGC	59.97	154
<i>fhuC</i> -R	TGAGCGCAACTATGTGGGTT	59.96	
<i>lolD</i> -F	GTGGGCTTGAGCCATCGTAT	60.18	127
<i>lolD</i> -R	TACCAGTTGGTTCGTCAGCC	59.97	

2 结果与分析

2.1 体外抑菌活性

基于 MIC、MBC 及细菌生长曲线综合评估 GD 对副溶血弧菌的体外抑菌活性。采用刃天青试验测定 GD 对副溶血弧菌的 MIC，结果显示 GD 浓度大于 7.6 mg/mL 时，菌液显蓝色(无细菌生长)，表明 GD 对副溶血弧菌的 MIC 为 7.6 mg/mL (图 1A)。吸取 MIC 以上浓度的各孔菌液进行平板涂布，培养 24 h 后，发现药液浓度大于 15.2 mg/mL 时，无菌落长出(图 1B)，说明该浓度为 GD 对副溶血弧菌的 MBC。通过测

定 GD 作用下副溶血弧菌菌液的 OD_{600} 值，绘制 32 h 内细菌的生长曲线，结果显示 3 个 GD 处理组(MIC、1/2MIC、1/4MIC)菌液的 OD_{600} 值均低于对照组，且药物浓度越高其 OD_{600} 值越低，其中 MIC 组的 OD_{600} 值始终保持在较低水平(<0.1) (图 1C)，结果表明 1/4MIC 浓度以上的 GD 药物能抑制副溶血弧菌的生长。考虑到抑菌机制研究，应选取对细菌生长干扰较小的浓度，因此选取 1/4MIC 浓度用于后续研究。

2.2 电镜观察结果

基于扫描 SEM 和 TEM，分析 GD 对副溶血弧菌细胞结构的影响。结果显示，从扫描电镜

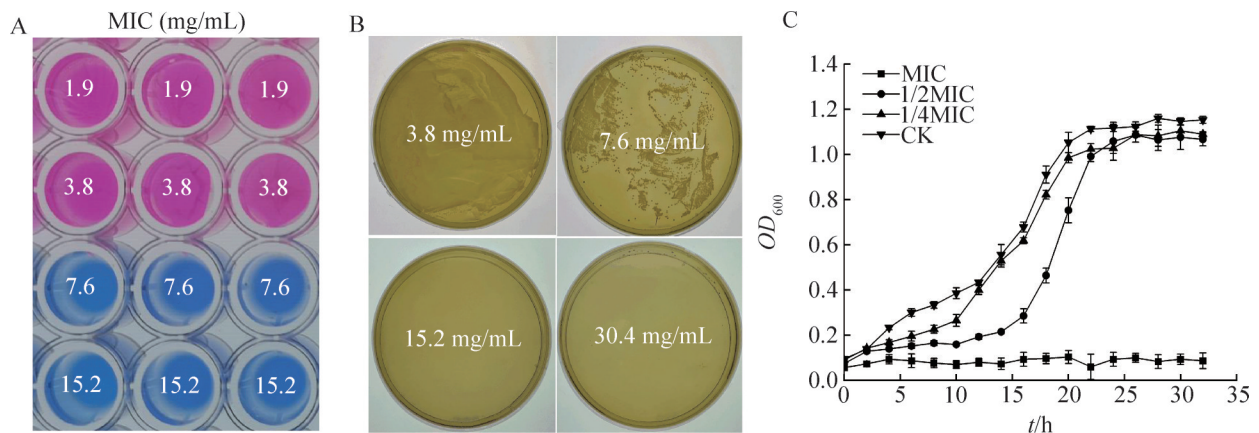


图1 GD对副溶血弧菌的MIC (A)、MBC (B)及细菌生长曲线(C)

Figure 1 MIC (A), MBC (B) and growth curves (C) of GD against *Vibrio parahaemolyticus*.

图中可见, 在无药物处理条件下, 副溶血弧菌形态饱满均匀, 外形圆润, 表面光滑平整(图 2A), 而在 1/4MIC 浓度的 GD 处理后, 菌体细胞发生裂解, 出现空洞或裂缝, 大量胞内泄露物质黏附在细胞表面(图 2B); 从透射电镜可以看出, 未经药物处理的对照组副溶血弧菌细胞结构完整, 表面光滑, 细胞内容物分布均匀(图 2C), 而 GD 处理组菌体细胞壁、细胞膜出现消融, 细胞内出现大空泡, 细胞质减少且分布不均(图 2D)。扫描电镜和透射电镜结果均表明, GD 处理可破坏副溶血弧菌细胞结构完整性, 影响细胞膜通透性, 导致大分子物质泄露。

2.3 转录组数据质控分析

为比较 GD 处理组和对照组副溶血弧菌转录组的差异, 用 NovaSeq X Plus 平台进行转录组测序, 采用统计分析方法对质控后数据进行质量分析。结果显示, 质控后所有样品均获得 2 000 万条以上 Clean reads, 碱基错误率均低于 0.012 0%, 质量大于 99.90% 的碱基占比(Q20)均超过 98.76%; 将质控后数据与参考基因组进行比对, 所有样品的比对率均大于 88.80% (表 2), 表明转录组测序质量可靠。

2.4 转录组总体差异分析

基于韦恩图分析 GD 组和 CK 组副溶血弧菌基因数量的差异, 结果显示 GD 组和 CK 组分别有 76 个和 83 个特有基因, 二者有 4 501 个共享基因(图 3A)。主成分分析(PCA)图中可见, GD 组和 CK 组样品沿着解释度高达 81.32% 的 PC1 轴明显区分开(图 3B), 聚类热图也发现两组样品分别单独聚类(图 3C), 表明 GD 组和 CK 组组间存在较大差异, 且组内样品的重复性较好。进一步基于 DESeq2 筛选出两组间差异表达基因, 并通过散点图可视化显著变化基因的数量及分布。结果显示, 与 CK 组相比, GD 组有 1 074 个显著上调基因, 以及 1 179 个显著下调基因, 另有 3 271 个基因在两组间无显著差异(图 3D)。

2.5 差异表达基因的 GO 富集分析

通过 goatools 软件对 GD 组和 CK 组组间差异表达基因进行 GO 富集分析, 结果显示 GD 组上调基因被显著富集到 79 个 GO 功能($P < 0.05$), 通过气泡图展示富集程度前 20 的 GO 功能, 主要涉及转录因子活性、细胞壁合成代谢等相关功能, 包括转录调节因子活性(transcription regulator activity)、DNA 结合转录因子活性

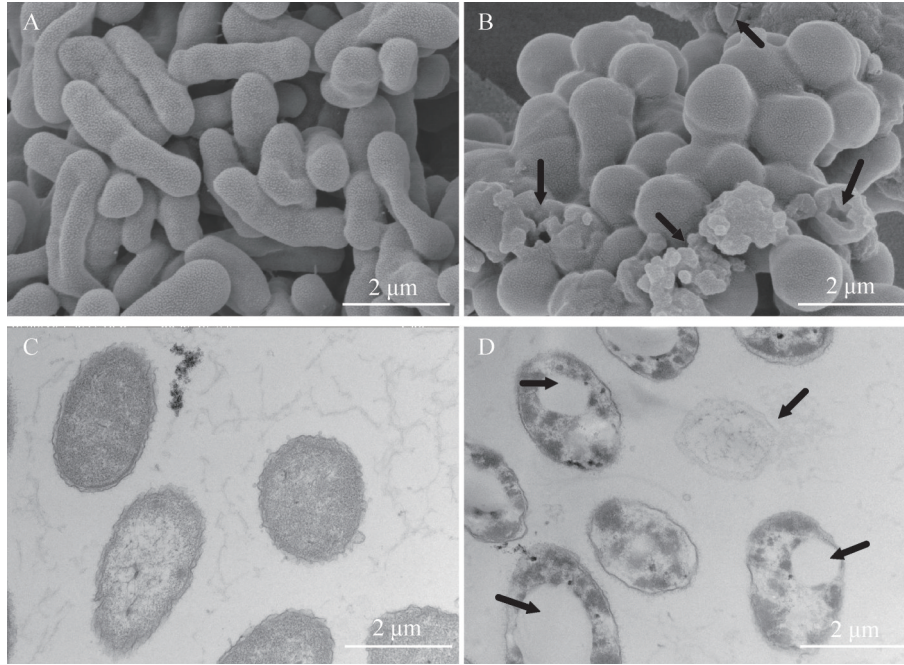


图2 副溶血弧菌细胞的扫描电镜图和透射电镜图

Figure 2 Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy images of *Vibrio parahaemolyticus* cells. A: SEM, CK; B: SEM, GD; C: TEM, CK; D: TEM, GD.

表2 质控数据统计

Table 2 Quality control data statistics

Sample name	Raw reads	Base error rate after QC (%)	Q20 (%)	Reference gene comparison rate (%)
CK1	20 596 202	0.011 7	98.87	92.50
CK2	22 410 474	0.011 9	98.80	93.03
CK3	21 736 136	0.011 8	98.85	93.41
GD1	20 419 812	0.011 8	98.81	91.45
GD2	21 749 562	0.011 7	98.87	92.99
GD3	20 514 160	0.011 9	98.76	88.80

(DNA-binding transcription factor activity)、肽聚糖生物合成过程 (peptidoglycan biosynthetic process)、肽聚糖代谢过程 (peptidoglycan metabolic process)、氨基聚糖生物合成过程 (aminoglycan biosynthetic process)、氨基聚糖代谢过程 (aminoglycan metabolic process)、细胞壁大分子生物合成过程 (cell wall macromolecule biosynthetic process)、细胞壁组织或生物发生 (cell wall organization or biogenesis)、细胞壁组织

(cell wall organization)等(图 4A)。GD 组下调基因被显著富集到 129 个 GO 功能($P<0.05$), 其中富集程度前 20 的主要为肌苷酸、核糖核苷合成代谢等相关功能, 包括肌苷酸 (inosine monophosphate, IMP) 生物合成过程 (IMP biosynthetic process)、IMP 代谢过程 (IMP metabolic process)、核糖核苷一磷酸代谢过程 (ribonucleoside monophosphate metabolic process)、一磷酸核糖核苷生物合成过程 (ribonucleoside

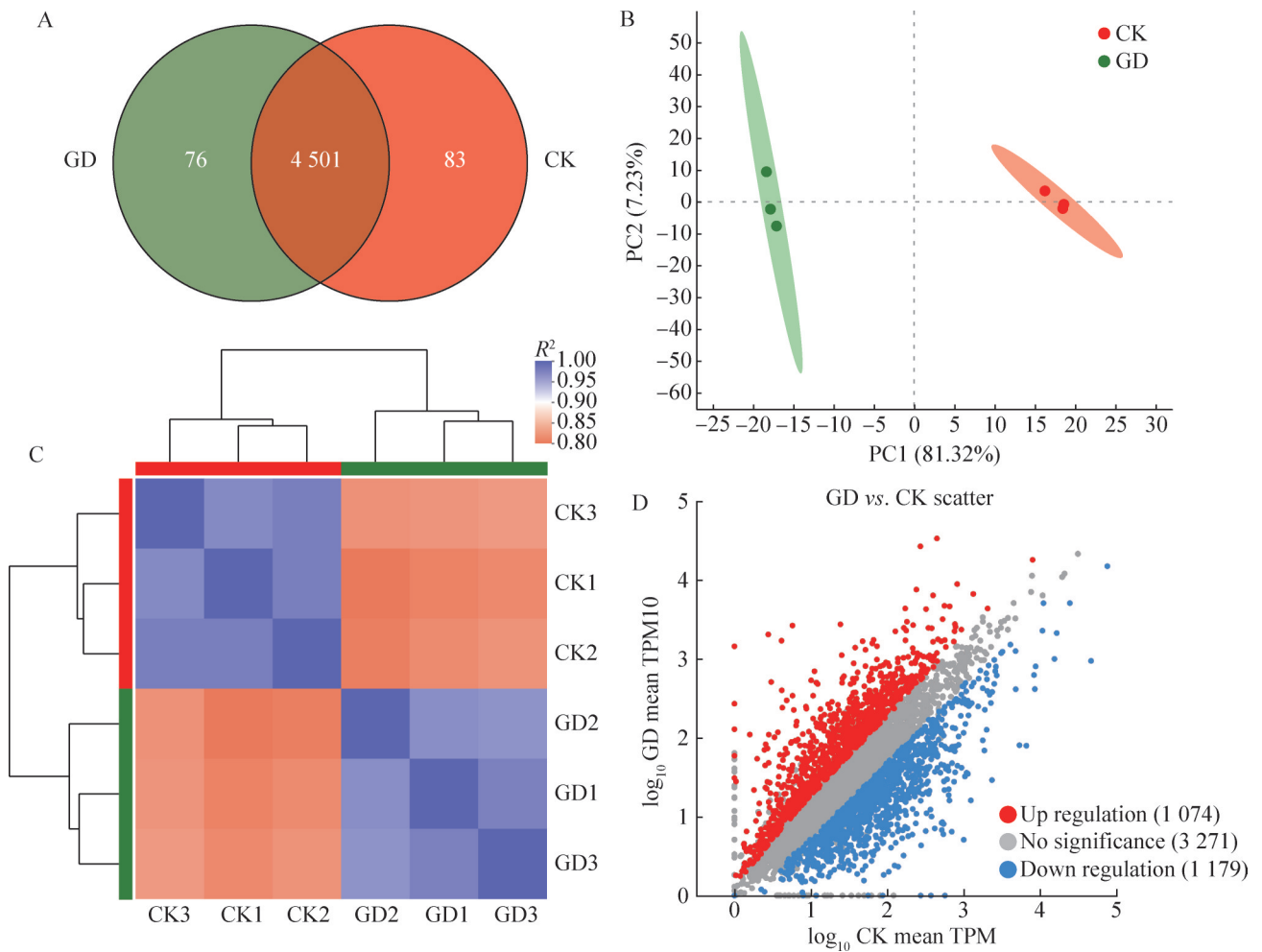


图3 基于韦恩图(A)、主成分分析图(B)、聚类热图(C)和散点图(D)表征GD组和CK组副溶血弧菌转录组的总体差异。TPM: Transcripts per million, 每百万个转录本中特定转录本的数量。

Figure 3 Characterization of overall differences in transcriptome of *Vibrio parahaemolyticus* between GD group and control group based on Venn diagram (A), principal component analysis diagram (B), cluster heatmap (C), and scatter plot (D). TPM: Transcripts per million.

monophosphate biosynthetic process)、嘌呤核苷一磷酸代谢过程 (purine nucleoside monophosphate metabolic process)、嘌呤核糖核苷一磷酸生物合成过程 (purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process)、嘌呤核糖核苷一磷酸代谢过程 (purine ribonucleoside monophosphate metabolic process)、核糖磷酸代谢过程 (ribose phosphate metabolic process)、核苷酸生物合成过程 (nucleotide biosynthetic process)、

核糖核苷酸代谢过程 (ribonucleotide metabolic process)等(图 4B)。

2.6 差异表达基因的 KEGG 富集分析

采用 KOBAS 软件对 GD 组和 CK 组组间差异表达基因进行 KEGG 信号通路的富集分析, 结果显示 GD 组上调基因仅被显著富集到肽聚糖生物合成 (peptidoglycan biosynthesis) 和万福霉素抗药性 (vancomycin resistance) 等 2 个 KEGG 通路 ($P < 0.05$) (图 5A); GD 组下调基因被显著富集

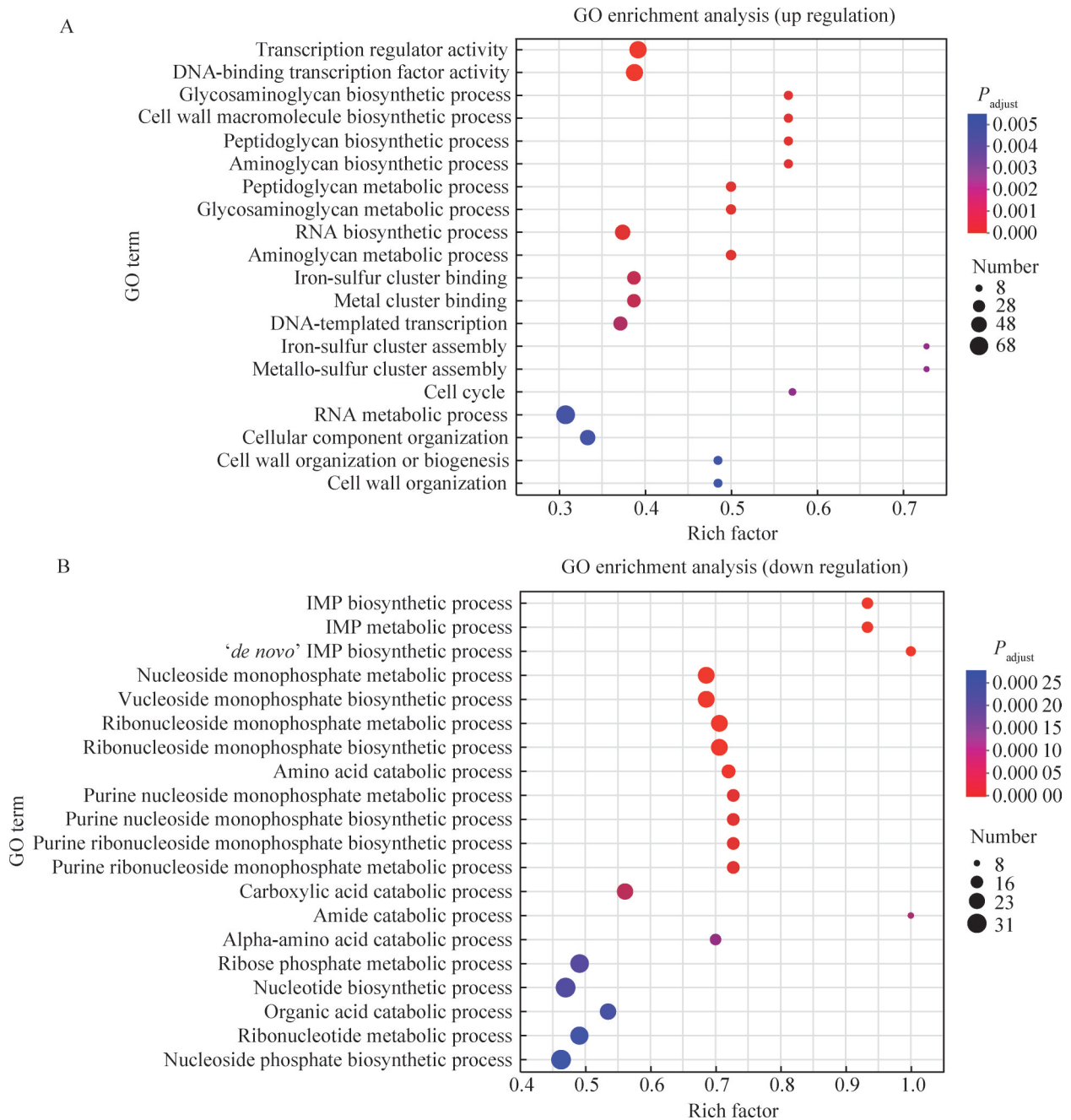


图4 差异表达基因的GO富集分析。A: 上调功能; B: 下调功能。

Figure 4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes. A: Up regulation functions; B: Down regulation functions.

到柠檬酸循环 (citrate cycle)、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)、嘌呤代谢 (purine metabolism)、双组分系统 (two-component system)、原核生物的碳固定途径 (carbon fixation

pathways in prokaryotes)、细菌趋化性 (bacterial chemotaxis) 等通路 ($P < 0.05$)。此外, 下调基因还涉及群体感应 (quorum sensing)、志贺菌病 (shigellosis)、军团菌病 (legionellosis) 等通

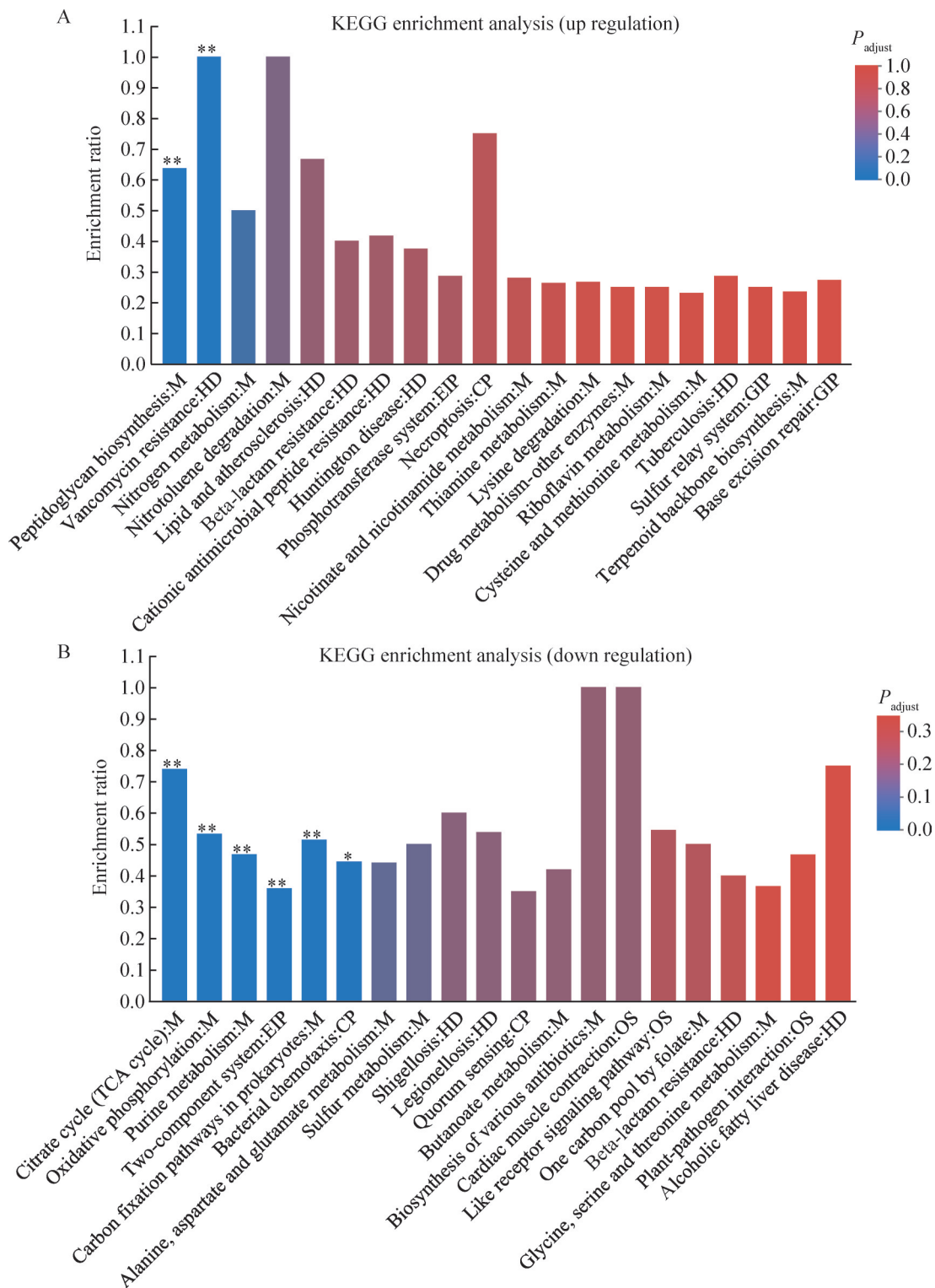


图5 差异表达基因的KEGG富集。A: 上调通路; B: 下调通路。

Figure 5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes. A: Up regulation pathways. B: Down regulation pathways. * and ** indicating $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

路，但这些通路并未达到显著水平 ($P>0.05$) (图 5B)。

2.7 差异表达基因的 RT-qPCR 验证结果

为验证转录组测序数据的准确性，随机选取 6 个显著下调基因(*gltD*、*gltB*、*hisC*、*cysE*、*ftsE* 和 *mcp*) 和 6 个显著上调基因(*VP2355*、*glgP*、*ftsY*、*fhuC*、*lolD* 和 *nrtC*) 进行 RT-qPCR 验证试验。结果显示，与对照组相比，氨基酸代谢相关基因(*gltD*、*gltB* 和 *hisC*)、膜转运相关基因(*ftsE*) 以及细菌趋化性相关基因(*mcp*) 在 GD 组中均显著下调 ($P<0.05$)，此外生物膜形成相关基因(*cysE*) 在 GD 组中的表达水平也低于对照组，但未达到显著水平 ($P>0.05$) (图 6)；相反，铁离子转运相关基因(*ftsY*、*fhuC*、*lolD* 和 *nrtC*) 在 GD 组中显著上调 ($P<0.05$)，此外蛋白质输出相关基因(*VP2355* 和 *glgP*) 在 GD 组中的表达水平高于对照组，但未达到显著水平 ($P>0.05$) (图 6)。RT-qPCR 验证试验结果与转录组分析结果基本一致，表明转录组数据分析可信度较高。

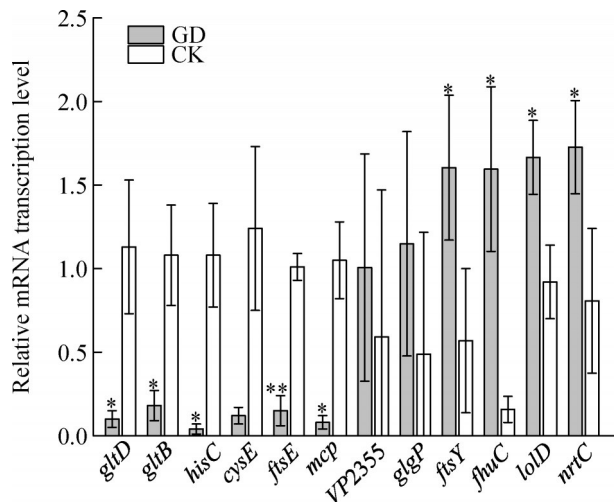


图6 差异表达基因的RT-qPCR验证

Figure 6 Verification of differentially expressed genes by RT-qPCR. * and ** indicating $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively.

3 讨论与结论

中草药富含生物碱、有机酸、苷类等多种活性物质，不仅具有抗菌、抗病毒作用，还能改善动物的生长、免疫性能，已被广泛用于水产动物疾病的防治中。Chang 等^[21]和 Chen 等^[22]的研究发现，饲喂凡纳滨对虾含 100 mg/kg 甘草提取物或含 0.6% 甘草酸苷的饲料，可提高对虾酚氧化酶、超氧化物歧化酶等活力，降低对虾在溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)攻毒后的死亡率。Zhai 等^[8]用主要成分为板蓝根、大黄、黄柏等的三黄散，以 500 mg/kg 的剂量饲喂感染副溶血弧菌的凡纳滨对虾，用药后对虾血清免疫参数和存活率显著提高。罗新等^[23]测定了 42 种中草药对水产动物常见病原嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的抑菌效果，发现冰片、乌梅、五倍子、诃子、石榴皮、艾叶和黄连 7 种中草药水提液具有抑菌活性，其中以冰片的抑菌作用最强，抑菌圈达到(26.1±1.5) mm。GD 是甘草、板蓝根、人工牛黄、冰片等为主要成分的药物。程安达等研究发现，使用 2 mL/kg GD 的饲料可改善副溶血弧菌感染引起的对虾肝胰腺损伤，降低患病对虾的死亡率^[18]。在本研究中，GD 对副溶血弧菌 CICC 21617 的 MIC 值和 MBC 值分别为 7.6 mg/mL 和 15.2 mg/mL，1/4MIC 以上浓度的 GD 能明显抑制副溶血弧菌的生长，表明该药物对副溶血弧菌具有较好的体外抑菌活性，可有效抑制细菌的增殖。

植物源药物可通过破坏细菌细胞结构完整性，干扰其物质转运、生物合成等功能，从而发挥抑菌作用。孙扬等^[13]研究发现，副溶血弧菌经 120 μg/mL 的柠檬草精油处理后，菌体细胞壁、膜构造被破坏，细胞内容物流失，上清液中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性、蛋白质含量和电导率上升。Sun 等^[24]的研究结果表明，25 mg/mL 的蓝莓提取物可破坏副溶血弧

菌细胞膜结构, 抑制细胞膜相关基因的表达, 进而影响其物质转运功能。Xin 等^[25]研究发现, 经 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的茴香醛处理, 破坏了副溶血弧菌细胞超微结构, 影响了其生物膜形成、鞭毛移动和群体感应相关基因的表达。本研究发现 GD 处理后副溶血弧菌细胞发生裂解, 细胞壁、细胞膜出现消融, 大量胞内泄露物质漏出, 表明 GD 处理破坏了副溶血弧菌细胞结构的完整性, 进而影响了细胞膜的通透性, 这与以上研究结论一致。板蓝根和甘草是 GD 的主要成分, 0.25 g/mL 的板蓝根微粉水提物能破坏大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 细胞壁和细胞膜的完整性^[26]。甘草的主要活性成分光甘草酚, 它通过与细菌细胞壁中的肽聚糖结合来破坏金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细胞结构^[27], 由此推测它们可能是 GD 导致副溶血弧菌细胞壁和细胞膜损伤的重要活性物质。

药物处理通过调控细菌转录表达水平, 进而影响其生理功能。现有研究表明, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单宁酸处理可改变嗜水气单胞菌的转录组; 75 mg/mL 的原儿茶醛或 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的茴香醛处理可改变副溶血弧菌的转录表达水平^[25,28-29]。它们主要通过抑制细菌能量代谢、生物膜形成、黏附、运动相关基因的表达, 从而降低其致病力。与这些研究结论相似, GD 处理后副溶血弧菌的转录组发现显著变化, 造成肌苷酸和核糖核苷合成代谢、柠檬酸循环等相关基因表达的显著下调。细菌的肌苷酸和核糖核苷是细胞内重要的核苷酸, 它们在细胞生长、代谢和遗传信息的传递中扮演着关键角色。柠檬酸循环是细菌细胞糖类、脂类、氨基酸等营养物质的重要代谢途径, 对于细胞的能量产生、代谢调控以及生物合成都具有至关重要的作用。GD 处理后副溶血弧菌的肌苷酸、核糖核苷合成代谢以及柠檬酸循环的转录水平下降, 表明细菌的遗传物

质合成、能量代谢活动可能受到抑制, 进而影响其生长、繁殖和致病能力。本研究还发现, GD 处理后副溶血弧菌的群体感应相关基因表达显著下调。群体感应是副溶血弧菌菌群间的重要通讯机制, 参与调控耐热直接溶血毒素基因 (*tdh*) 等毒力基因的表达, 调节生物被膜的形成, 影响细菌的运动性^[27,30], 从而增强副溶血弧菌的致病力和在环境中的生存能力, 因此 GD 可能通过群体感应淬灭作用影响副溶血弧菌的致病力。

在本研究中, GD 主要促进了副溶血弧菌转录因子活性、细胞壁合成代谢等相关基因的表达。在低浓度药物的作用下, 细菌为适应环境压力并维持其生存, 可能会提高或降低特定基因的转录活性, 以减少药物对菌体细胞的渗透和损伤。例如, Feng 等^[31]的研究发现, 大蒜提取物二烯丙基硫醚可促进阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 细胞壁合成相关基因的表达。马强等^[32]研究表明, 在低浓度的 β -内酰胺类抗生素的作用下, 金黄色葡萄球菌细胞壁的厚度明显增加, 并促进了细胞壁相关基因 *glmU*、*pbpB*、*altR*、*murG* 的表达。与这些研究结果一致, 本研究发现 GD 处理主要提高了肽聚糖、氨基聚糖等细胞壁合成代谢相关基因的表达。肽聚糖和氨基聚糖是细菌细胞壁的主要成分之一, 它通过形成坚固的网络结构, 为细菌提供机械支撑, 可抵御外界的机械和渗透损伤。GD 处理提高了副溶血弧菌细胞壁合成代谢的转录水平, 表明菌体细胞结构遭到破坏后, 可能加强了细胞修复功能的调控, 以应对外界环境的压力。后续应将组学分析与 RNA 干扰、基因敲除等分子生物学方法相结合, 进一步厘清 GD 抑杀副溶血弧菌的关键基因及代谢通路。

综上所述, 本研究结果表明 GD 可抑制副溶血弧菌生长, 破坏其细胞壁、细胞膜结构的完整性。在转录水平上, GD 主要抑制了副溶血弧

菌的肌苷酸、核糖核苷合成代谢以及柠檬酸循环等能量代谢相关基因的转录水平，同时菌株可能也启动了细胞壁损伤的自我修复机制。本研究初步探明了 GD 对副溶血弧菌抑制活性及作用机制，可为增加 GD 的靶动物提供背景参考资料，也为新型弧菌防控药物的开发提供科学依据。

作者贡献声明

褚宽：设计并执行实验，分析数据和撰写论文；黄雷：设计实验，分析数据，撰写及修改论文；郑阿钦：分析转录组数据，修改论文；蔡雪：执行实验，处理数据；程安达：设计实验，修改论文；原居林：修改论文；吕利群：指导设计实验、修改论文等；姚嘉赟：指导设计实验、修改论文等。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] YU YB, CHOI JH, KANG JC, KIM HJ, KIM JH. Shrimp bacterial and parasitic disease listed in the OIE: a review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 166: 105545.
- [2] PARK KS, ONO T, ROKUDA M, JANG MH, OKADA K, IIDA T, HONDA T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6659-6665.
- [3] 穆丽丽, 牛犇, 赵勇. 副溶血性弧菌分泌系统在致病力中作用的研究进展[J]. *微生物学报*, 2019, 59(4): 621-631.
MU LL, NIU B, ZHAO Y. Role of *Vibrio parahaemolyticus* secretion system in pathogenicity[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(4): 621-631 (in Chinese).
- [4] AHMED HA, EL BAYOMI RM, HUSSEIN MA, KHEDR MHE, ABO REMELA EM, EL-ASHRAM AMM. Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 274: 31-37.
- [5] 农业农村部宣贯《关于加快推进水产养殖业绿色发展的若干意见》[J]. *中国水产*, 2019(5): 12-13.
- [6] 刘勃兴, 崔舒畅, 任海, 靳晓敏, 韩红生, 史秋梅, 高桂生. 致半滑舌鳎烂尾病的创伤弧菌的分离鉴定及中草药对其抑菌效果研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(5): 489-494.
LIU BX, CUI SC, REN H, JIN XM, HAN HS, SHI QM, GAO GS. Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* causing rotting tail disease in half-smooth tongue sole and its inhibition by Chinese herbs[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(5): 489-494 (in Chinese).
- [7] KAYIRA TM, NAKANO H. Antibacterial effects of plant extracts with hurdle technology against *Vibrio cholerae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(16): fnaa119.
- [8] ZHAI QQ, LI J. Effectiveness of traditional Chinese herbal medicine, San-Huang-San, in combination with enrofloxacin to treat AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 360-370.
- [9] LIU HY, CHEN GF, LI LX, LIN ZX, TAN BP, DONG XH, YANG QH, CHI SY, ZHANG S, ZHOU XQ. Supplementing artemisinin positively influences growth, antioxidant capacity, immune response, gut health and disease resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei* fed cottonseed protein concentrate meal diets[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 131: 105-118.
- [10] WU QY, JIANG Y, CHEN EZ, MU CK, WAIHO K. Chinese gallnut (*Galla chinensis*) against *Vibrio parahaemolyticus*: *in vitro* activity and the use of medicated bath method to treat infected mud crab *Scylla paramamosain*[J]. *Aquaculture*, 2021, 539: 736632.
- [11] 夏与晴, 刘文珍, 傅松哲, 吴葵, 王艺, 华昕彤, 刘鹰, 欧阳敏. 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 YQ, LIU WZ, FU SZ, WU K, WANG Y, HUA XT, LIU Y, OUYANG M. Antimicrobial 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 (in Chinese).
- [12] 徐晓津, 李秀华, 马一帆, 何俊, 李慧耀, 祁欣, 张蕉南, 王云才, 赵玲敏, 鄢庆彬. 50 味中药及其复方与抗生素对河流弧菌的体外抑菌作用[J]. *热带生物学报*, 2019, 10(4): 343-351.
XU XJ, LI XH, MA YF, HE J, LI HY, QI X, ZHANG JN, WANG YC, ZHAO LM, YAN QP. *In vitro* bacteriostasis of 50 species of traditional Chinese medicinal plants and their combined prescriptions and antibiotics against *Vibrio fluvialis*[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2019, 10(4): 343-351 (in Chinese).
- [13] 孙杨, 王晓迪, 朱军莉, 陆海霞, 倪勤学. 柠檬草精油对副溶血性弧菌的抑菌活性及机制[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(3): 157-167.
SUN Y, WANG XD, ZHU JL, LU HX, NI QX. Antibacterial activity and mechanism of lemon grass essential oil(LG-EO) on *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(3): 157-167 (in Chinese).
- [14] 芦平, 刘欢, 肖苗, 李莹玉, 赵燕妮. 原儿茶酸对副溶血弧菌的抑菌和减毒作用[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(5):

- 278-285.
LU P, LIU H, XIAO M, LI YY, ZHAO YN. Antibacterial and virulence-attenuating effects of protocatechuic acid against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(5): 278-285 (in Chinese).
- [15] 谢丽玲, 彭齐, 蔡链纯, 周亮, 朱炎坤, 韩光耀. 黄芩醇提取物对副溶血性弧菌抑制机制的研究[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(8): 159-165.
XIE LL, PENG Q, CAI LC, ZHOU L, ZHU YK, HAN GY. A study on antibacterial mechanisms of ethanol-extracts from *Scutellaria baicalensis* against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(8): 159-165 (in Chinese).
- [16] 赵圣明, 赵岩岩, 马汉军, 别小妹. 转录组学在抑菌机制中的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(7): 259-264.
ZHAO SM, ZHAO YY, MA HJ, BIE XM. Applications of transcriptomics in research of antimicrobial mechanism[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(7): 259-264 (in Chinese).
- [17] 江厚生, 王秀敏, 侯晓礁, 李学良. 甘胆口服液的制备和质量检测方法: CN101869595A[P]. 2010-10-27.
- [18] 程安达, 冯东岳, 郑阿钦, 孙艳霞, 黄雷, 赵宇杰, 薛兴华, 姚嘉赞, 王秀敏. 甘胆口服液对副溶血性弧菌引起的对虾肝胰腺损伤坏死病防治效果[J]. *科技通报*, 2024, 40(3): 36-40, 78.
CHENG AD, FENG DY, ZHENG AQ, SUN YX, HUANG L, ZHAO YJ, XUE XH, YAO JY, WANG XM. Protective effect of Gandan oral liquid on hepatopancreas injury of shrimp caused by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2024, 40(3): 36-40, 78 (in Chinese).
- [19] ISMAIL TF, NAKAMURA A, NAKANISHI K, MINAMI T, MURASE T, YANAGI S, ITAMI T, YOSHIDA T. Modified resazurin microtiter assay for *in vitro* and *in vivo* assessment of sulfamonomethoxine activity against the fish pathogen *Nocardia seriolae*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(2): 351-357.
- [20] 翟立公, 李港回, 黄菊, 蔡秋慧, 魏照辉, 何晓东, 曹睿, 王俊颖. 基于比较转录组学分析NaCl胁迫影响德尔夫沙门氏菌的耐渗机制[J]. *微生物学报*, 2023, 63(8): 3219-3234.
ZHAI LG, LI GH, HUANG J, CAI QH, WEI ZH, HE XD, CAO R, WANG JY. NaCl stress affects the permeability of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* derby: a study based on comparative transcriptomics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(8): 3219-3234 (in Chinese).
- [21] CHANG J, ZHANG WB, MAI KS, MA HM, LIUFU ZG, WANG XJ, AI QH, XU W. Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*[J]. *Aquaculture Research*, 2011, 42(8): 1101-1109.
- [22] CHEN XR, MAI KS, ZHANG WB, WANG XJ, AI QH, XU W, LIUFU ZG, MA HM, TAN BP. Effects of dietary glycyrrhizin on growth and nonspecific immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(5): 665-674.
- [23] 罗新, 张其中. 42种中草药对嗜水气单胞菌的体外抑菌试验[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(3): 61-65.
LUO X, ZHANG QZ. Antibacterial effect of 42 Chinese herbal medicines on *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2011, 41(3): 61-65 (in Chinese).
- [24] SUN XH, HAO LR, XIE QC, LAN WQ, ZHAO Y, PAN YJ, WU VCH. Antimicrobial effects and membrane damage mechanism of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extract against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Food Control*, 2020, 111: 107020.
- [25] XIN YL, PENG SR, WEI S, LEI Y, ZHANG SB, HU YS, LV YY. Antimicrobial and biofilm inhibition effects of p-anisaldehyde against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Food Control*, 2023, 154: 110021.
- [26] 姜晓文, 燕鸽, 李叔洪, 于文会, 魏佳宇, 艾莉雯, 白文. 板蓝根微粉水提取物抗大肠杆菌活性及其机制的探究[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(9): 2968-2978.
JIANG XW, YAN G, LI SH, YU WH, WEI JY, AI LW, BAI W. Study on the anti-*Escherichia coli* activity and mechanism of water extract of *Radix isatidis* powder[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(9): 2968-2978 (in Chinese).
- [27] WU SC, YANG ZQ, LIU F, PENG WJ, QU SQ, LI Q, SONG XB, ZHU K, SHEN JZ. Antibacterial effect and mode of action of flavonoids from licorice against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2489.
- [28] 曾成容, 刘馨, 张晨旭, 毕文文, 梅世慧, 何广霞, 张峻杰, 文明, 周碧君, 陈江凤, 姜海波. 单宁酸对嗜水气单胞菌转录组影响的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(9): 895-904.
ZENG CR, LIU X, ZHANG CX, BI WW, MEI SH, HE GX, ZHANG JJ, WEN M, ZHOU BJ, CHEN JF, JIANG HB. Effect of tannic acid on the transcriptome of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2023, 45(9): 895-904 (in Chinese).
- [29] LIU YW, WANG L. Antibiofilm effect and mechanism of protocatechuic aldehyde against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1060506.
- [30] ZHANG SS, YANG Q, EGGERMONT M, DEFOIRD T. Quorum-sensing interference in vibrios[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(4): 1452-1466.
- [31] FENG SL, EUCKER TP, HOLLY MK, KONKEL ME, LU XN, WANG S. Investigating the responses of *Cronobacter sakazakii* to garlic-derived organosulfur compounds: a systematic study of pathogenic-bacterium injury by use of high-throughput whole-transcriptome sequencing and confocal micro-Raman spectroscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(3): 959-971.
- [32] 马强, 王艺晖, 常佳伟, 万佳宏, 魏彦琴, 王桂琴. 金黄色葡萄球菌细胞壁变化与 β -内酰胺类抗生素耐药的关系[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(3): 602-611.
MA Q, WANG YH, CHANG JW, WAN JH, WEI YQ, WANG GQ. The relationship between cell wall thickening of *Staphylococcus aureus* and resistance to β -lactams[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(3): 602-611 (in Chinese).