

研究报告

连翘提取物对嗜水气单胞菌群体感应系统的影响

许腾腾, 赵慧娟, 刘尊英*

中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

许腾腾, 赵慧娟, 刘尊英. 连翘提取物对嗜水气单胞菌群体感应系统的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 256-269

Xu Tengting, Zhao Huijuan, Liu Zunying. Effect of *Forsythia suspensa* extract on quorum sensing system of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 256-269

摘要:【背景】传统抑菌剂的大量使用导致细菌产生多重耐药性与抗性, 而基于细菌群体感应靶点调控的新型抑菌剂可缓解细菌耐药性与抗性, 是未来抑菌剂的发展方向之一。【目的】研究连翘(*Forsythia suspensa*)提取物对嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)群体感应系统的影响及可能的作用机制, 为新型抑菌剂的开发提供理论依据。【方法】以紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) CV026 为报告菌株, 以嗜水气单胞菌为供试菌株, 采用倍比稀释法测定连翘提取物对 2 种菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 通过微量法测定提取物对嗜水气单胞菌生长、群集运动及蛋白酶活性的影响, 利用高效液相色谱串联质谱法分析提取物中的主要成分, 采用分子对接模拟探究提取物对嗜水气单胞菌群体感应系统的作用机制。【结果】连翘提取物对紫色杆菌 CV026 和嗜水气单胞菌的 MIC 均为 16.00 mg/mL。在亚抑菌浓度下, 连翘提取物处理显著抑制了 CV026 紫色菌素的产生, 最大抑制率高达 56.30%。经 8.00 mg/mL 连翘提取物处理后, 嗜水气单胞菌的群集运动迁移能力(85.70%)及蛋白酶活性(35.40%)均受到抑制, 而且呈现出浓度依赖性。连翘提取物的主要成分为连翘苷、连翘酯苷、槲皮素、咖啡酸等, 分子对接结果表明, 槲皮素、咖啡酸等成分可与细菌群体感应 LasR 受体蛋白竞争性结合, 从而抑制嗜水气单胞菌的群体感应系统。【结论】连翘提取物可作为细菌群体感应抑制剂或新型抑菌剂应用于水产养殖或生物防治等领域。

关键词: 连翘提取物; 嗜水气单胞菌; 群体感应; 生物防治

基金项目: 山东省重点研发计划(2019GNC106064)

Supported by: Key Research and Development Program of Shandong Province (2019GNC106064)

*Corresponding author: E-mail: liuzunying@ouc.edu.cn

Received: 2021-05-10; Accepted: 2021-07-22; Published online: 2021-09-10

Effect of *Forsythia suspensa* extract on quorum sensing system of *Aeromonas hydrophila*

XU Tengting, ZHAO Huijuan, LIU Zunying*

College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China

Abstract: [Background] The new antimicrobial agents based on the quorum sensing system control was rapidly developed due to the multiple drug resistance caused by traditional antimicrobial agents. [Objective] To study the effect of *Forsythia suspensa* extract (FSE) on quorum sensing system in *Aeromonas hydrophila* and provide useful information for bacteria control. [Methods] The minimal inhibitory concentration (MIC) of FSE against *Chromobacterium violaceum* CV026 and *A. hydrophila* was determined by multiple dilution method, and the effects of FSE on the growth, swarming motility and protease activity of *A. hydrophila* were determined by micro-method. The primary components of the extracts were analyzed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The possible inhibiting mechanism of FSE on the quorum sensing system of *A. hydrophila* was explored by molecular docking. [Results] The MICs of FSE against *C. violaceum* 026 and *A. hydrophila* were both 16.00 mg/mL. Under sub-MIC concentration, and the production of violacein was significantly inhibited by the FSE, with the maximum inhibition rate of 56.30%. The swarming mobility and protease activity of *A. hydrophila* was reduced by 85.70% and 35.40% with 8.00 mg/mL FSE treatment, respectively. The major components of the FSE included forsythia, forsythioside, caffeic acid and chlorogenic acid, etc. The molecular docking results indicated that caffeic acid and chlorogenic acid could competitively bind with LasR receptor protein to inhibit the quorum sensing system of *A. hydrophila*. [Conclusion] FSE could be used as a potential quorum sensing inhibitor in the aquaculture and biological control area.

Keywords: *Forsythia suspensa* extract; *Aeromonas hydrophila*; quorum sensing; biological control

群体感应(quorum sensing, QS)系统是细菌之间存在的一种交流方式^[1],当细菌产生的自诱导物浓度达到一定阈值时,便会启动 QS 系统相关基因的表达,调控相关性状。研究表明, QS 系统通过调控细菌相关毒力因子的表达、生物被膜的形成及胞外蛋白酶活性等使细菌表现出致病性和腐蚀性^[2-3]。传统抑菌剂的大量使用导致细菌产生多重耐药性,并且存在残留、安全性等问题。群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitor, QSI)可在不抑制细菌正常生长的条件下,通过多种途径抑制 QS 系统,从而调控细菌的生理活动,降低细菌的耐药性与

抗性^[4]。有研究报道, QSI 可通过抑制群体感应信号分子的合成、降解群体感应信号分子、与 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acyl homoserine lactone, AHL)竞争受体蛋白的结合位点这 3 种不同的方式^[5]调节革兰氏阴性细菌的 QS 系统。因此,基于群体感应系统开发新型抑菌剂可有效缓解细菌耐药性与抗性,具有广阔的应用前景。近年来,由于天然化合物具有安全、降低毒力的特点,而且不会对细菌耐药性产生强烈的选择性压力,许多研究均集中于用天然化合物作为 QSI 干扰细菌的 QS 系统^[6]。

目前,中草药的抑菌活性成分越来越受到

人们的关注。连翘(*Forsythia suspensa*)是双子叶植物纲捩花目木樨科连翘属落叶灌木。研究表明,连翘具有抑菌^[7]、抗氧化、抗炎^[8]等活性,可开发为新型抑菌剂。Zhang 等研究发现连翘提取物可抑制菌株 CV12472 产生紫色菌素^[9]。Zhuang 等研究发现连翘水提物以 CviR 为靶标,对菌株 CV12472 的群体感应系统表现出抑制作用^[10]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种革兰氏阴性菌,属气单胞菌属(*Aeromonas*),具有广泛的致病性,是水生动物最常见的条件致病菌之一,可导致鱼类出血性败血症^[11]。研究表明,嗜水气单胞菌的毒力因子表达及生物膜形成等受群体感应系统的调控^[12],但关于连翘提取物对嗜水气单胞菌群体感应系统抑制作用的研究较少。

本文以嗜水气单胞菌为主要研究对象、以紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) CV026 作为报告菌株分析连翘提取物(*Forsythia suspensa* extract, FSE)的群体感应抑制活性,探究连翘提取物对嗜水气单胞菌生长、蛋白酶活性、细菌群集运动能力的作用效果,以期新型抑菌剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

报告菌株紫色杆菌 CV026,美国德克萨斯州立大学 McLean JC 教授惠赠;受试菌株嗜水气单胞菌^[13]分离自冷藏凡纳滨对虾,实验室保存。连翘购自于青岛医保城药业集团有限公司。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

N-丁酰基-L-高丝氨酸内酯 N-butyl-L-homoserine lactone, C4-HSL 标准品, Sigma 公司;卡那霉素、结晶紫染料、琼脂,北京索莱宝科技有限公司;LB 肉汤培养基、LB 琼脂培

养基,青岛海博生物技术有限公司;甲醇(LC-MS 级)、乙腈(LC-MS 级), Merck KGaA 公司;甲酸(LC-MS 级),成都西亚试剂有限公司;95%乙醇等其他试剂均为国产分析纯。

超净工作台,苏洁医疗器械(苏州)有限公司;生化培养箱,哈尔滨市东明医疗仪器厂;全温振荡培养箱,上海润度生物科技有限公司;立式蒸气灭菌器,上海申安医疗器械厂;多功能酶标仪, Bio-Rad 公司; NanoDrop 分光光度计,上海棱光技术有限公司;电子天平, Ohaus Corp 公司;高速冷冻离心机,湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司;高效液相色谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

群集运动培养基:胰蛋白胨 1.00 g,氯化钠 0.50 g,琼脂 0.50 g,葡萄糖 0.50 g,蒸馏水 100 mL。

1.3 方法

1.3.1 连翘提取物制备

连翘提取物的制备参考文献[10]的方法。取连翘样品于 40 °C 烘箱中 24–48 h 烘干,经超微粉碎机研磨粉碎、过筛。按照料液比(连翘:水) 1:10 (质量体积比)浸泡过夜,煮沸后小火煎煮 30 min,8 层纱布过滤药液。残渣加入等体积的水进行二次煎煮,过滤。将 2 次所得的药液合并,冷冻干燥后贮存于-20 °C,使用前按需求浓度复溶后用 0.22 µm 滤膜过滤除菌。

1.3.2 最小抑菌浓度(minimal inhibition concentration, MIC)测定

通过倍比稀释法^[14]测定连翘提取物对报告菌株紫色杆菌 CV026 和嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度。具体如下:将嗜水气单胞菌和紫色杆菌 CV026 于 28 °C、160 r/min 活化过夜后,按 1%接种量分别接种于新鲜的 LB 肉汤中(接种紫色杆菌 CV026 的 LB 肉汤中需添加 20 µg/mL 卡那霉素)。取无菌 96 孔板,通过倍比稀释

法, 使提取物的终浓度分别为 32.00、16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.00 mg/mL, 向上述各孔分别加入 100 μ L 紫色杆菌 CV026 菌液或嗜水气单胞菌菌液, 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 恒温振荡培养 24 h 后观察孔内菌体生长情况, 测定 OD_{600} 值, 以肉眼可见抑制细菌正常生长的最小浓度作为最小抑菌浓度, 后续实验均在亚抑菌浓度下进行。添加等体积无菌水组作为对照, 进行 3 次平行实验。

1.3.3 QS 抑制活性检测

参考 Li 等^[15]的方法并稍加修改。将紫色杆菌 CV026 于 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养过夜后, 按照 1:100 的体积比加入冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右的 LB 琼脂培养基(含有 20.00 μ g/mL 的 C4-HSL)中, 混匀后倾倒入平板(平板直径 90.00 mm)并用牛津杯打孔。将 200 μ L 亚抑菌浓度下的粗提物加入孔中, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h, 通过黄色晕圈大小判断群体感应抑制活性。

1.3.4 紫色菌素定量测定

紫色菌素的测定参考文献[16]的方法并稍加修改。紫色杆菌 CV026 活化过夜后, 以 1% 的体积分数接种于含亚抑菌浓度连翘提取物(1.00、2.00、4.00 和 8.00 mg/mL)的 LB 肉汤培养基(含有 20.00 μ g/mL C4-HSL)中, 160 r/min、28 $^{\circ}$ C 振荡培养 24 h。将未添加提取物组设为对照组。将紫色杆菌 CV026 以相同接种量接种于含不同亚抑菌浓度的 LB 肉汤培养基(未添加 C4-HSL)中, 相同培养条件测定紫色杆菌 CV026 的生长状况。添加信号分子实验组的培养液依次取 500 μ L 于离心管内, 4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液, 在菌体沉淀中加入 500 μ L 二甲基亚砷涡旋振荡, 使沉淀出的紫色菌素充分悬浮, 4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 5 min, 使菌体沉淀, 取上清液测定 OD_{585} 表征紫色菌素产量。

1.3.5 连翘提取物对嗜水气单胞菌群体感应表型的影响

对嗜水气单胞菌生长状况的影响: 嗜水气单胞菌活化过夜后, 以 1:100 的体积比接种于新鲜 LB 肉汤培养基中, 添加不同终浓度的连翘提取物, 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 48 h, 每隔 2 h 测定菌液 OD_{600} 值, 绘制生长曲线。

对嗜水气单胞菌群集运动的影响: 向冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右的群集运动培养基中加入经 0.22 μ m 滤膜除菌的连翘提取物, 使其终浓度分别为 0.00、2.00、4.00 和 8.00 mg/mL。充分混匀后倾倒入平板, 待平板冷却后向平板中央滴加 2 μ L 嗜水气单胞菌菌液, 无菌风吹干, 置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 24 h, 观察并测量迁移直径。

对嗜水气单胞菌蛋白酶活性的影响: 参考文献[15]的方法进行测定。将 10 mL 的 15% 脱脂牛奶(30 min, 0.06 MPa)与 90 mL LB 琼脂培养基混合均匀, 待冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右倾倒入平板, 用牛津杯打孔。将嗜水气单胞菌与不同亚抑菌浓度下的连翘提取物于 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养过夜, 取培养物于 9 000 \times g 离心 10 min, 上清液使用 0.22 μ m 滤膜过滤。取过滤后的上清液 100 μ L 于脱脂牛奶平板中, 以未加提取物组作为对照, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h 后测量透明的分解圈直径。

对嗜水气单胞菌 AHL 的影响: 参考文献[15,17]的方法进行测定。

AHL 的提取: 嗜水气单胞菌 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 活化过夜后, 以 1% (体积分数)接种于 200 mL LB 肉汤中, 添加连翘提取物使其终浓度分别为 4.00 mg/mL 和 8.00 mg/mL, 以未添加提取物的液体培养基组作为阴性对照组。实验组和对照组均 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 18 h 后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 上清液用等体积乙酸

乙酯(含 0.5%甲酸)萃取,取上层有机相于 40 °C 旋蒸。蒸干后,用 1.00 mL 甲醇溶解,收集粗提液,经 0.22 μm 滤膜过滤除菌,置于-20 °C 保存备用。

AHL 的检测:接种紫色杆菌 CV026 于 24 °C、160 r/min 活化过夜后,以 2% (体积分数)与 100 mL 冷却至 40 °C 左右的 LB 固体培养基混合,同时加入卡那霉素(质量终浓度为 20.00 mg/mL),倒平板,打孔。无菌风吹干后,加入 20 μL AHL 粗提液。28 °C 静置培养 24 h,观察是否有紫圈并测量紫圈直径。

1.3.6 提取物的高效液相色谱串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)分析

采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法对连翘提取物中的主要成分进行测定^[18]。色谱柱:Zorbax Eclipse C18 色谱柱(1.8 μm ×2.1 mm×100 mm),流动相 A:水+0.1%甲酸,流动相 B:纯乙腈;检测方式为负离子模式,加热器温度 325 °C;鞘气流速:45 arb;辅助气流速:15 arb;吹扫气流速:1 arb;电喷雾电压:3.5 kV;毛细管温度:330 °C;S-Lens RF Level:55%。使用 Compound Discoverer 3.1 进行保留时间矫正、峰识别、峰提取等工作,根据二级质谱信息利用 Thermo mzCloud 在线数据库、Thermo mzValut 本地数据库等进行物质鉴定。

1.3.7 分子对接模拟

使用软件 Schrödinger V2017、Maestro V11.1.011、MMshare V3.7.011 和 Release 2017-1 进行分子对接。LasR 受体蛋白的复合结构来自蛋白质数据库(PDB ID 2 UV0, <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>)。选取提取物中的 5 种成分进行对接分析,所研究成分的结构均来自 Pubchem 数据库(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)。

1.3.8 数据统计分析

实验数据采用 Origin 2018 进行统计分析,采用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析,数据结果表示为平均值±标准偏差,组间差异比较采用单因素方差分析,采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异性显著。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度的测定结果

测定提取物对细菌的最小抑菌浓度,以确保所选物质的群体感应抑制活性不是由于其抑菌性造成^[19]。如图 1 所示,连翘提取物对报告菌株 *C. violaceum* CV026 和 *A. hydrophila* 的 MIC 均为 16.00 mg/mL。后续实验浓度选择为 0.00、2.00、4.00、8.00 mg/mL。

2.2 QS 抑制活性检测结果

紫色杆菌 CV026 报告菌株是野生菌株

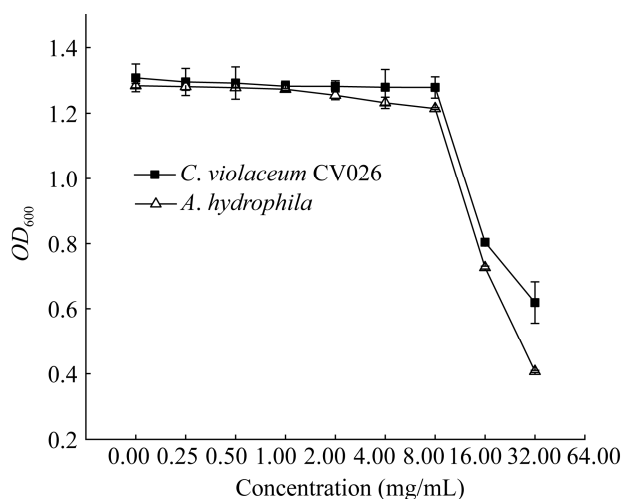


图 1 连翘提取物对 *Chromobacterium violaceum* CV026 和 *Aeromonas hydrophila* 的 MIC 图中数据为平均值±标准偏差, $n=3$

Figure 1 MICs of *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Aeromonas hydrophila* with *Forsythia suspensa* extract (FSE). Data are mean±SD, $n=3$.

C. violaceum ATCC 31532 的 mini-Tn5 的突变体, 其本身不产生紫色菌素, 也不产生 N-酰基高丝氨酸内酯类(AHL)信号分子, 但其能感受外源信号分子 AHL 的存在, 并产生紫色菌素; 紫色杆菌 CV026 紫色菌素的产生受细菌群体感应调控, 而群体感应抑制剂会抑制其紫色菌素的产生。

通过测定连翘提取物对紫色杆菌 CV026 产生紫色菌素的抑制作用可判断其 QS 抑制活性^[20]。*C. violaceum* CV026 可识别短链信号分子激活 QS 系统, 产生紫色菌素; 当其 QS 系统受到抑制时, 紫色菌素的产生受到抑制, 则产生黄色不透明晕圈。如图 2 所示, 添加不同浓度的连翘水提取物后, 圆孔周围可形成浑浊、不透明的黄色晕圈, 而且抑制圈的直径随提取物浓度的增加而增大。结果表明连翘提取物对紫色杆菌 CV026 的群体感应存在抑制作用, 而且表现出浓度依赖性。

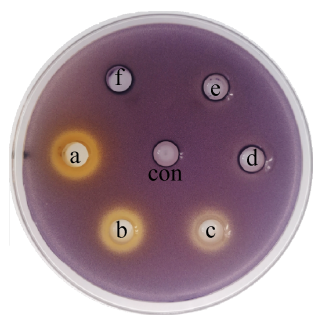


图 2 不同浓度连翘提取物对 *Chromobacterium violaceum* CV026 紫色菌素产量的影响 con: 空白对照组; 连翘提取物的浓度分别为 a: 8.00 mg/mL; b: 4.00 mg/mL; c: 2.00 mg/mL; d: 1.00 mg/mL; e: 0.50 mg/mL; f: 0.25 mg/mL
Figure 2 Inhibitory activity of the sub-MICs of FSE on the violacein production in *Chromobacterium violaceum* CV026. con: Blank control group; The concentration of FSE are a: 8.00 mg/mL; b: 4.00 mg/mL; c: 2.00 mg/mL; d: 1.00 mg/mL; e: 0.50 mg/mL; f: 0.25 mg/mL, respectively.

2.3 紫色菌素产量定量测定结果

紫色杆菌产紫色菌素受到群体感应系统的调控, 因此, 检测紫色菌素的产量可以确定活性物质对细菌群体感应的作用。紫色菌素的产量可以通过颜色定性表征, 紫色越深表明紫色菌素产量越高, 当提取上清液几乎无紫色时说明紫色菌素产量较少。如图 3 所示, 连翘提取物可在不影响细菌正常生长的情况下抑制紫色杆菌 CV026 产生紫色菌素, 随着提取物浓度的增加, 紫色菌素的产量逐渐减少, 呈现浓度依赖性。随着提取物浓度的增加, 连翘提取物对

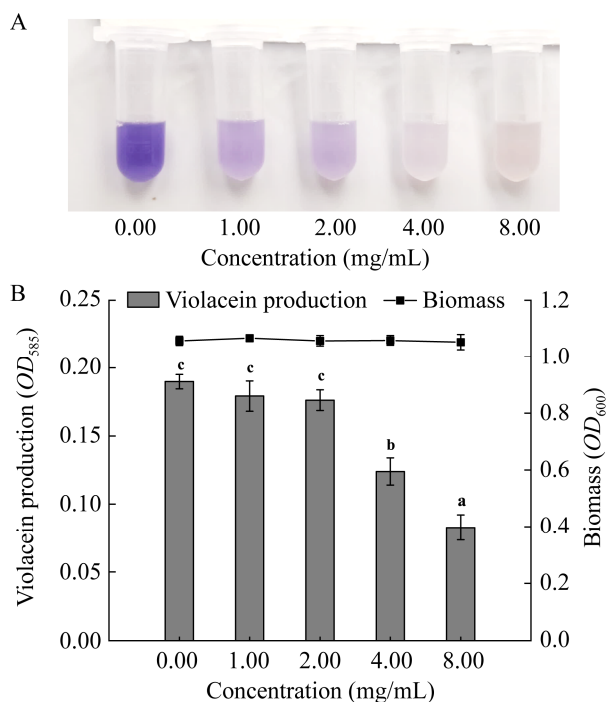


图 3 连翘提取物对 *Chromobacterium violaceum* CV026 生长状况(A)和紫色菌素产量(B)的影响 图中相同字母代表差异不显著($P>0.05$), 不同字母代表差异显著($P<0.05$), 下同

Figure 3 Violacein production and *Chromobacterium violaceum* CV026 biomass after treatment with the sub-MICs of FSE. The same letters represent no significant difference ($P>0.05$), while different letters represent significant difference ($P<0.05$), the same as below.

紫色菌素的抑制率从 2.61% 增加到 56.30%，当浓度为 8.00 mg/mL 即 1/2 MIC 时，抑制率最高达 56.30% ($P < 0.05$)。

2.4 连翘提取物对嗜水气单胞菌生长的影响

连翘提取物对嗜水气单胞菌的 MIC 为 16.00 mg/mL。如图 4 所示，嗜水气单胞菌与不同亚抑菌浓度下 (4.00、8.00 mg/mL) 连翘提取物分别混合培养时，其生长曲线与未处理组几乎重合，说明亚抑菌浓度下连翘提取物对嗜水气单胞菌的正常生长无影响，并且不会对细菌形态结构造成破坏^[12]。本文结果与 Geng 等^[21] 研究结果相一致，Geng 等发现亚抑菌浓度下的木犀草素对铜绿假单胞菌的生长无影响。因此，后续实验浓度选用 0.00–8.00 mg/mL。

2.5 连翘提取物对嗜水气单胞菌群集运动的影响

嗜水气单胞菌的运动能力可通过群集运动迁移直径进行表征。嗜水气单胞菌在群集运动平板上从接种点向四周扩散且迁移直径较大，表明嗜水气单胞菌具有较强的运动能力^[22]。当用连翘提取物处理时，细菌的迁移直径明显减小 (图 5)。随着水提物浓度的增加，其抑制作用增强。由表 1 可知，当连翘水提物浓度为 8.00 mg/mL 时，对嗜水气单胞菌群集运动的抑

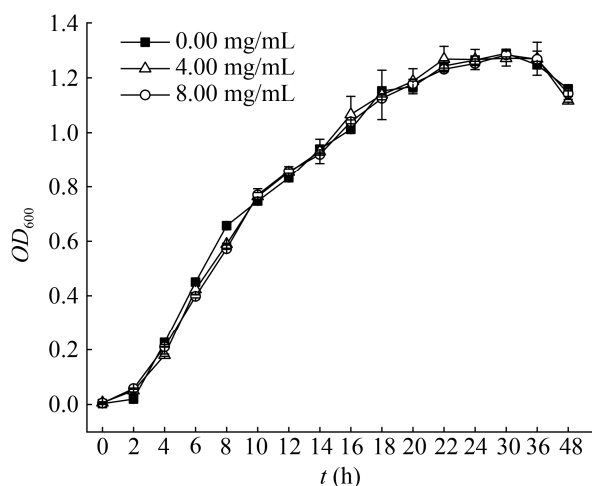


图 4 连翘提取物对嗜水气单胞菌生长状况的影响 图中数据为平均值±标准偏差， $n=3$

Figure 4 Effect of the sub-MICs of FSE on the growth of *Aeromonas hydrophila*. Data are mean±SD, $n=3$.

制率为 85.70%。

2.6 连翘提取物对嗜水气单胞菌蛋白酶活性的影响

微生物分泌的蛋白酶可以分解食物中的蛋白质和游离氨基酸，产生含氮和硫的挥发性刺激性化合物，从而加速腐败过程，导致食品质量恶化^[5]。相关研究表明，细菌蛋白酶的分泌受到 QS 系统的调控，而且通过添加姜油酮^[23]、富马酸钠^[24]等 QSI 发现细菌胞外蛋白

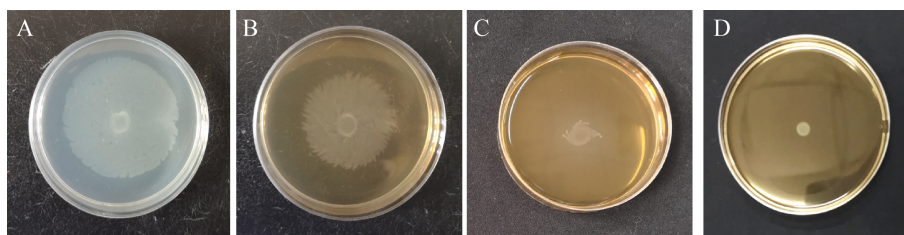


图 5 连翘提取物对嗜水气单胞菌群集运动的影响 图中内容表示不同浓度连翘提取物处理后嗜水气单胞菌的迁移直径，A：对照组；B：2.00 mg/mL；C：4.00 mg/mL；D：8.00 mg/mL

Figure 5 Effect of the sub-MICs of FSE on the swarming motility of *Aeromonas hydrophila*. The contents in the figure show the migration diameter of *A. hydrophila* after treatment with different concentrations of FSE, A: Control; B: 2.00 mg/mL; C: 4.00 mg/mL; D: 8.00 mg/mL.

表 1 连翘提取物对嗜水气单胞菌运动能力的影响
Table 1 Effect of the sub-MICs of FSE on the swarming motility of *Aeromonas hydrophila*

浓度 Concentration (mg/mL)	群集运动能力 Swarming motility (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
0.00	41.88±0.16d	—
2.00	33.50±0.23c	20.01
4.00	26.82±0.37b	35.96
8.00	5.99±0.22a	85.70

注: 图中数据为平均值±标准偏差, $n=3$; —: 空白对照组不存在抑制率; 不同小写字母(a、b、c、d)表示差异具有显著性($P<0.05$)

Note: Data are mean ± SD, $n=3$; —: There was no inhibition rate in blank control group; Different lower case letters (a, b, c, d) represent significant different ($P<0.05$).

酶分泌量明显降低。结果表明(图 6), 在脱脂牛奶平板上, 加入未经连翘提取物处理的细菌上清液, 牛奶平板中出现了较大的透明圈, 表明嗜水气单胞菌可分泌蛋白酶分解平板中的蛋白质, 导致透明圈产生。经连翘水提物处理后的细菌上清液, 其透明圈的直径减小, 而且提取物浓度越大, 透明圈直径越小。结果表明, 连翘水提物能够抑制嗜水气单胞菌的蛋白酶活性(表 2)。

2.7 连翘提取物对嗜水气单胞菌 AHL 产量的影响

有研究表明分离自凡纳滨对虾的嗜水气单胞菌可产生 C4-HSL^[13]。在报告平板法中, 紫色杆菌 CV026 可感知外源信号分子 AHL 的存在, 受群体感应系统调控在孔周围呈现出紫色晕圈, 紫色晕圈直径可表示 AHL 的相对产量。结果表明, 与对照组相比, 连翘提取物处理组的紫色晕圈直径减小, 而且呈现浓度依赖性(图 7)。当提取物浓度为 8.00 mg/mL 时抑制率可达 19.97% (表 3)。

2.8 连翘提取物成分分析

植物提取物中的黄酮类、多酚类、香豆素类、生物碱类等成分均存在抗菌活性, 因其结构和组成差异发挥不同的群体感应抑制活性^[25]。表 4 和图 8 结果表明, 在连翘提取物中共鉴定出 38 种成分^[26], 玉叶金花苷酸的相对浓度为 319.22 $\mu\text{g/mL}$, 占比为 14.25%; 连翘苷的相对浓度为 206.75 $\mu\text{g/mL}$, 占比为 9.23%; 连翘酯苷的相对浓度为 68.04 $\mu\text{g/mL}$, 占比为 3.04%。研究表明, 连翘苷^[27]、连翘酯苷^[18]、咖啡酸、芦丁、槲皮素、肉桂醛等成分具有抗菌、抗生物膜、抑制群体感应等多种作用。

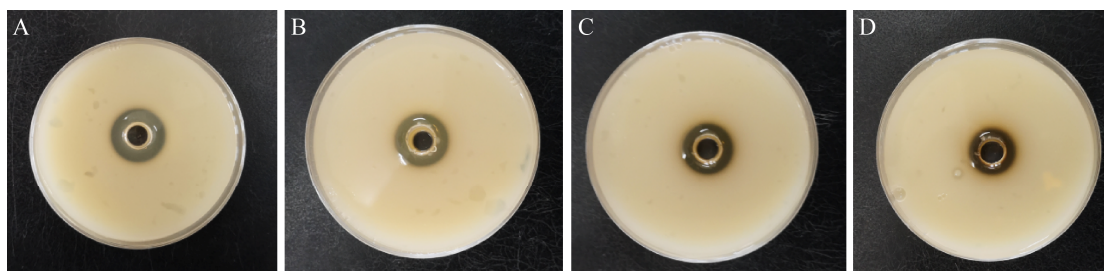


图 6 连翘提取物对嗜水气单胞菌蛋白酶活性的影响 图中透明圈直径表示不同浓度连翘提取物处理后嗜水气单胞菌的蛋白酶活性, A: 对照组; B: 2.00 mg/mL; C: 4.00 mg/mL; D: 8.00 mg/mL

Figure 6 Inhibitory effect of the sub-MICs of FSE on proteinase activity of *Aeromonas hydrophila*. The diameter of the transparent circle in the figure represents the protease activity of *A. hydrophila* after treatment with different concentrations of FSE, A: Control; B: 2.00 mg/mL; C: 4.00 mg/mL; D: 8.00 mg/mL.

表 2 连翘提取物对嗜水气单胞菌胞外蛋白酶活力的影响

Table 2 Inhibitory effect of the sub-MICs of FSE on proteinase activity of *Aeromonas hydrophila*

浓度 Concentration (mg/mL)	透明圈直径 Diameter of transparent circle (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
0.00	26.39±0.11d	—
2.00	25.21±0.47c	4.47
4.00	21.76±0.35b	17.54
8.00	17.12±0.29a	35.40

注：图中数据为平均值±标准偏差， $n=3$ ；—：空白对照组不存在抑制率；不同小写字母(a、b、c、d)表示差异具有显著性($P<0.05$)

Note: Data are mean±SD, $n=3$; —: There was no inhibition rate in blank control group; values with different lower case letters (a, b, c, d) represent significant different ($P<0.05$).

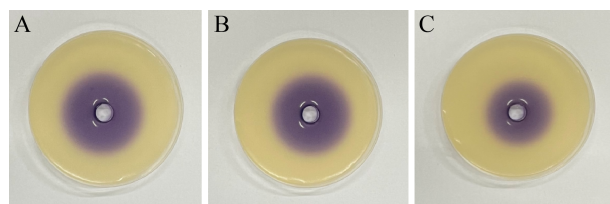


图 7 连翘提取物对嗜水气单胞菌 AHL 产量的影响 图中紫色晕圈直径表示不同浓度连翘提取物处理后嗜水气单胞菌的 AHL 产量，A：对照组；B：4.00 mg/mL；C：8.00 mg/mL

Figure 7 Inhibitory effect of the sub-MICs of FSE on proteinase activity of *Aeromonas hydrophila*. The diameter of purple halo in the figure represents AHLs production of *A. hydrophila* after treatment with different concentrations of FSE, A: Control; B: 4.00 mg/mL; C: 8.00 mg/mL.

2.9 分子对接结果

据研究报道，咖啡酸、槲皮素^[28]、肉桂醛^[29]等成分存在群体感应抑制活性，基于连翘提取物中的多种成分，选择连翘苷、连翘酯苷、咖啡酸、槲皮素、柠檬醛 5 种成分进行分子对接，分析连翘提取物发挥群体感应抑制

表 3 连翘提取物对嗜水气单胞菌 AHL 产量的影响

Table 3 Inhibitory effect of the sub-MICs of FSE on AHLs production of *Aeromonas hydrophila*

浓度 Concentration (mg/mL)	紫色晕圈直径 Diameter of purple halo (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
0.00	39.39±0.12a	—
4.00	38.90±0.43a	1.24
8.00	31.52±0.30b	19.97

注：图中数据为平均值±标准偏差， $n=3$ ；—：空白对照组不存在抑制率；不同小写字母(a、b)表示差异具有显著性($P<0.05$)

Note: Data are mean±SD, $n=3$; —: There was no inhibition rate in blank control group; values with different lower case letters (a, b) represent significant different ($P<0.05$).

活性的机制。分子对接结果表明(图 9)，槲皮素、咖啡酸、柠檬醛均可与 LasR 受体结合，对接分数分别为-8.014、-6.444、-4.604，对接分数越小则说明结合能力越强。槲皮素的酚羟基与 LasR 受体的 Tyr56、Thr75、Gly126 之间形成氢键；咖啡酸可与 LasR 受体的 Tyr56、Ser129 之间形成氢键；柠檬醛与 Tyr56 之间形成芳香氢键。对于 LuxI 蛋白，仅有咖啡酸可与 Ile107 之间形成氢键。连翘苷、连翘酯苷未能与 LasR 受体发生对接，可能是不同分子对接软件存在差异。

分子对接结果表明，连翘提取物发挥群体感应抑制活性作用的主要成分是槲皮素、咖啡酸和柠檬醛，通过与 LasR 受体竞争性结合信号分子，从而影响 QS 系统，进而抑制相关毒力因子的表达，这与 Zhuang 等^[10]的研究结果一致。另外，Geng 等^[21]的研究结果表明，木犀草素和槲皮素均可通过氢键和范德华力与 LasR 受体蛋白的特定活性位点结合而发挥相互作用，最终影响毒力因子的产生。

表 4 连翘提取物成分分析

Table 4 Component analysis of FSE

序号 No.	名称 Names	分子式 Formula	分子量 Molecular weight	保留时间 Retention time (min)	相对浓度 Relative concentration (μg/mL)
1	2-(3,4-二羟苯基)乙基 3-(6-脱氧-β-L-吡喃甘露糖基)6-[(2E)3-(3,4-二羟苯基)2-乙氧基]-β-D-葡萄糖苷 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl-3-O-(6-deoxy-β-L-mannopyranosyl)-6-O-[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoyl]-β-D-glucopyranoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.21	6.513	486.390
2	玉叶金花苷酸 Mussaenosidic acid	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376.14	4.215	319.220
3	连翘苷 Phillyrin	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	534.21	8.049	206.750
4	4-甲氧苯丙素 4-methoxyphlorizin	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₀	450.15	6.207	72.630
5	连翘酯苷 E Forsythoside E	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	462.17	4.793	68.040
6	右旋奎宁酸 D-(-)-quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.06	0.817	60.090
7	大车前苷 Plantamajoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	640.20	5.914	52.150
8	海藻糖 α,α-trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.12	0.803	50.470
9	松脂醇-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 Pinoresinol-4-O-glucoside(+)	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	520.19	7.522	41.370
10	木通苯乙醇苷 A Calceolarioside A	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	478.15	6.792	36.240
11	红景天苷 Salidroside	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	300.12	4.731	31.550
12	苯甲醇 Benzyl alcohol	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	402.15	5.680	29.920
13	咖啡酸 Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180.04	5.742	16.300
14	柠檬酸 Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192.03	1.124	16.220
15	芦丁 Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.15	6.494	12.090
16	(2E)-3-[3-(三氟甲基)苯基]丙烯酸 (2E)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]acrylic acid	C ₁₀ H ₇ F ₃ O ₂	216.04	0.782	12.070
17	松脂酚 Pinoresinol	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	358.14	6.977	8.910
18	16,17-二羟基花兰素-18-油酸 16,17-dihydroxykauran-18-oic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336.23	9.649	7.500
19	D-半乳糖 D-(+)-galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.06	0.810	5.080
20	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) 2,2'-methylenebis-(4-methyl-6-tert-butylphenol)	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	340.24	16.734	4.800
21	N-果糖基焦谷氨酸 N-fructosylpyroglutamate	C ₁₁ H ₁₇ NO ₈	291.10	1.129	3.020
22	香豆酰己糖苷 Coumaroyl hexoside (isomer of 691, 692)	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	326.10	5.318	1.750
23	异槲皮苷 Quercetin-3-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.10	6.704	1.580
24	6,7-二羟基香豆素 6,7-dihydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₄	178.03	5.670	0.800
25	槲皮素 Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.04	8.962	0.780
26	N-果糖-异亮氨酸 N-fructosylisoleucine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	293.15	1.305	0.760
27	D-色氨酸 D-(+)-tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.09	4.549	0.750
28	高车前素 Hispidulin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.06	11.317	0.450
29	壬二酸 Azelaic acid	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.10	7.471	0.430
30	1'-羟基丁呋洛尔 1'-hydroxy bufuralol	C ₁₆ H ₂₃ NO ₃	277.17	11.045	0.270
31	(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八烯酸 (15Z)-9,12,13-trihydroxy-15-octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	330.24	9.890	0.290
32	黄麻脂肪酸 F Corchorifatty acid F	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	328.22	9.536	0.190
33	假尿嘧啶核苷 Pseudouridine	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.07	1.165	0.160
34	咖啡酸己糖苷 Caffeic acid hexoside	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342.10	5.170	0.150
35	黄嘌呤核苷 Xanthosine	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	284.08	1.646	0.120
36	脱落酸 (±)-Absciscic acid	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264.14	8.550	0.090
37	肉豆蔻酸乙酯 Ethyl myristate	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.24	18.202	0.050
38	柠檬醛 Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	152.12	11.240	0.014

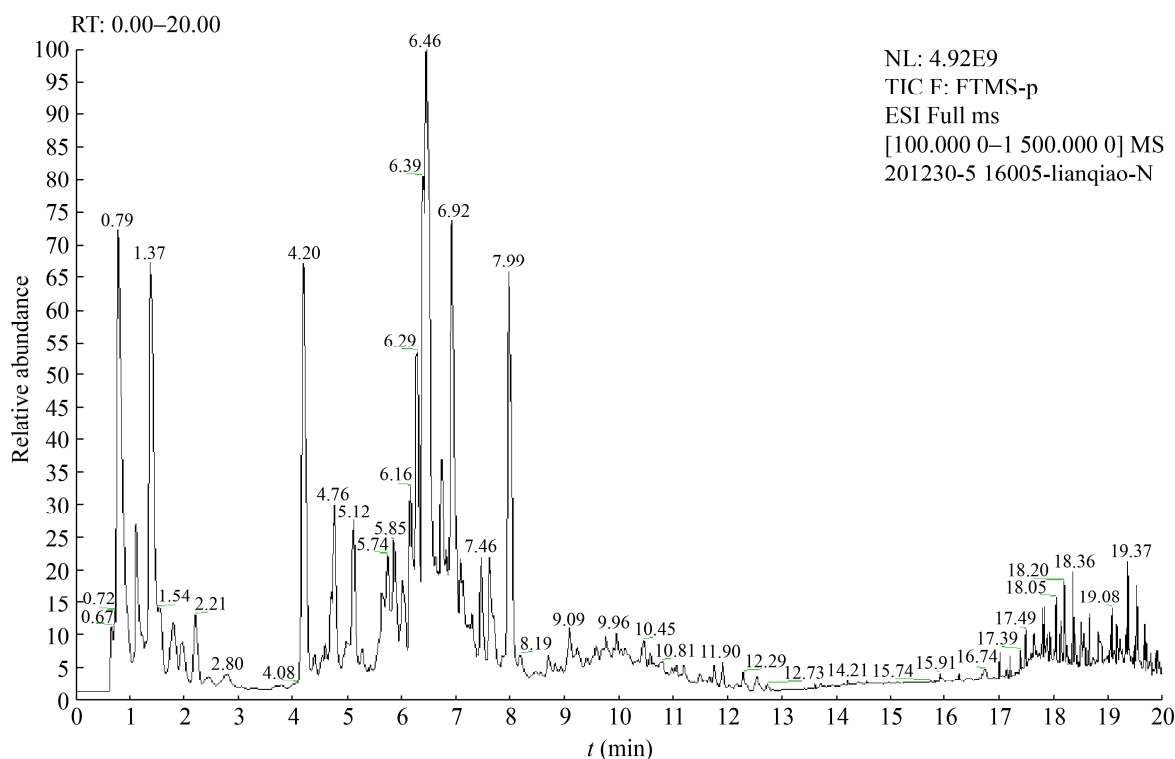


图8 FSE的HPLC-MS/MS谱图

Figure 8 HPLC-MS/MS chromatogram of FSE.

3 讨论与结论

紫色杆菌 CV026 能感受短链外源信号分子 AHL 的存在, 从而调控其 QS 系统产生紫色菌素。本研究以紫色杆菌 CV026 为报告菌株, 通过添加短链外源信号分子表明, 在亚抑菌浓度下, 连翘提取物可抑制紫色杆菌 CV026 产紫色菌素的能力, 而且抑制作用呈现浓度依赖性, 确定提取物存在 QS 抑制活性, 这与 Zhuang 等^[10] 研究结果中连翘水提物能够降低紫色杆菌 CV12472 的紫色菌素产生及生物膜的形成相一致。Zhang 等^[30] 研究表明, 茶多酚可抑制紫色杆菌紫色菌素的产生。本研究结果表明, 8.00 mg/mL 的连翘提取物对紫色菌素产量的抑制率可达 56.30%, 表明植物源群体感应抑制剂具有较强的群体感应抑制活性。于红雷等^[13] 研究表明, 嗜水气单胞菌主要产生 C4-HSL 短链信号分

子, 从而激活其群体感应系统。李学鹏等^[31] 研究表明, 嗜水气单胞菌嗜铁素的产生及蛋白水解活性等腐败特性强弱均与 QS 系统有关, 而且添加丹皮提取物可减少 AHL 的产生, 从而减弱其腐败特性。

HPLC-MS/MS 研究结果显示, 连翘提取物中的主要成分为连翘苷、连翘酯苷、咖啡酸、槲皮素、柠檬醛等。分子对接结果进一步证实, 槲皮素、咖啡酸、柠檬醛均可与群体感应受体 LasR 结合, 对接分数分别为 -8.014、-6.444、-4.604, 通过氢键维持复杂分子的结合稳定性。对接结果中, 槲皮素与 LasR 蛋白的结合能力最强, 可能是连翘提取物中发挥 QS 抑制活性的主要成分。分子模拟对接结果从分子水平上进一步揭示了连翘提取物具有群体感应抑制活性的物质基础。

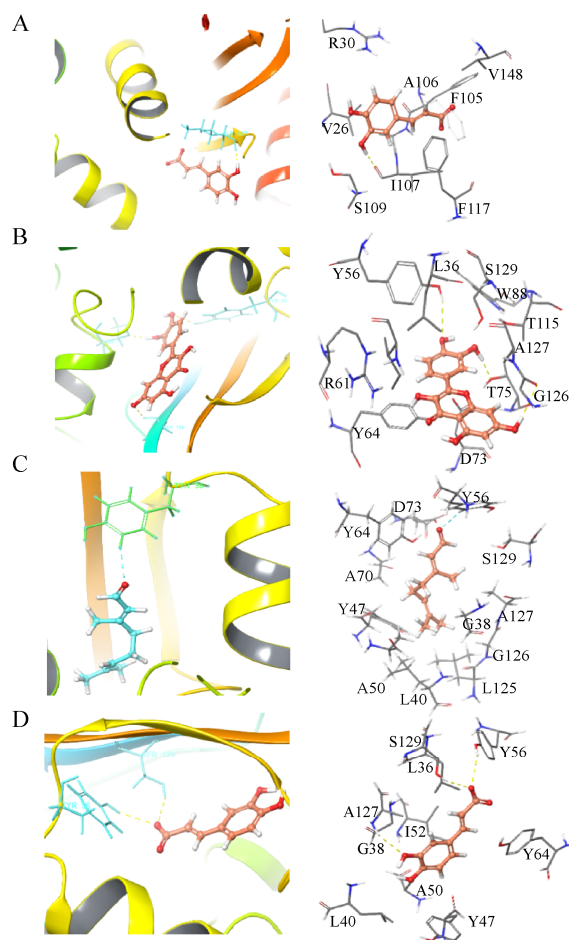


图9 分子对接结果 A: 咖啡酸与LuxI蛋白结合; B-D: 槲皮素、柠檬醛、咖啡酸与LasR蛋白结合

Figure 9 Molecular docking analysis. A: Caffeic acid combined with LuxI protein; B-D: Quercetin, citral, caffeic acid combined with LasR protein.

QS 系统是基于自诱导物的合成、感应及传递而发挥作用的。当信号分子浓度达到阈值时, AHL 与受体蛋白相互作用, 激活 QS 信号通路中的靶基因转录。当达到一定阈值时, QS 系统调控的表型如毒力因子分泌、群集运动、胞外蛋白酶产生等将会以浓度依赖的方式被激发^[32]。植物提取物对细菌 QS 系统的干扰是缓解致病细菌毒力的有效策略。研究结果表明, 在亚抑菌浓度下, 连翘提取物对嗜水气单胞菌的正常生

长并无显著影响。Husain 等^[33]研究表明, 细菌的蛋白酶活性受 QS 系统的调控。本研究结果显示, 连翘提取物可干扰嗜水气单胞菌的群体感应系统, 进一步降低嗜水气单胞菌的蛋白酶活性与群集运动能力, 而且抑制作用随提取物浓度的增加而加强。当提取物浓度为 8.00 mg/mL 时, 对嗜水气单胞菌群集运动能力的抑制率为 85.70%, 与 Li 等^[15]的研究结果一致。Li 等^[29]的研究结果表明, 肉桂醛处理降低了荧光假单胞菌的胞外蛋白酶活性, 0.1 μ L/mL 的肉桂醛对荧光假单胞菌蛋白酶活性的抑制率为 58.50%。本研究结果表明, 8.00 mg/mL 的连翘提取物对嗜水气单胞菌胞外蛋白酶活性的抑制率达 35.40%; 经连翘提取物处理后嗜水气单胞菌的 AHL 产量有所减少且呈现浓度依赖性, 当提取物浓度为 8.00 mg/mL 时, 抑制率可达 19.97%。嗜水气单胞菌可导致水生动物致病与水产品的腐败变质, 而且对抗生素具有多重耐药性, 连翘提取物有望成为抑制嗜水气单胞菌的新型调节物质, 从而减轻病原菌的危害, 促进水产养殖及其加工制品行业的可持续发展。然而由于群体感应系统十分复杂, 连翘提取物作为群体感应抑制剂的作用机制仍需进一步探究。

REFERENCES

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(2): 269-275
- [2] Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. Nature, 2017, 551(7680): 313-320
- [3] Mizan MFR, Jahid IK, Kim M, Lee KH, Kim TJ, Ha SD. Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation[J]. Biofouling, 2016, 32(4): 497-509

- [4] Defoirdt T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(4): 313-328
- [5] Lade H, Paul D, Kweon JH. Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling[J]. International Journal of Biological Sciences, 2014, 10(5): 550-565
- [6] Machado I, Silva LR, Giaouris ED, Melo LF, Simões M. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition[J]. Food Research International, 2020, 127: 108754
- [7] Du J, Hu ZY, Yu ZY, Li HL, Pan J, Zhao DB, Bai YH. Antibacterial activity of a novel *Forsythia suspensa* fruit mediated green silver nanoparticles against food-borne pathogens and mechanisms investigation[J]. Materials Science and Engineering: C, 2019, 102: 247-253
- [8] Shao SY, Yang YN, Feng ZM, Jiang JS, Zhang PC. Anti-inflammatory phenylpropanoid glycosides from the fruits of *Forsythia suspensa*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2019, 29(19): 126635
- [9] Zhang A, Chu WH. Anti-quorum sensing activity of *Forsythia suspensa* on *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Pharmacognosy Magazine, 2017, 13(50): 321-325
- [10] Zhuang XY, Zhang A, Chu WH. Anti-quorum sensing activity of *Forsythia suspensa* extract against *Chromobacterium violaceum* by targeting CviR receptor[J]. International Microbiology, 2020, 23(2): 215-224
- [11] Chen N, Jiang JJ, Gao XJ, Li XX, Zhang Y, Liu XD, Yang H, Bing XW, Zhang XJ. Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 83: 410-415
- [12] Mangoudehi HT, Zamani H, Shahangian SS, Mirzanejad L. Effect of curcumin on the expression of *ahyI/R* quorum sensing genes and some associated phenotypes in pathogenic *Aeromonas hydrophila* fish isolates[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(5): 70
- [13] 于红雷, 韩云艳, 曾名湧, 刘尊英. 凡纳滨对虾源气单胞菌的分离鉴定及群体感应[J]. 生物加工过程, 2019, 17(3): 324-328
- Yu HL, Han YY, Zeng MY, Liu ZY. Identification and quorum sensing of *Aeromonas* from *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(3): 324-328 (in Chinese)
- [14] 黄靖. 群体感应抑制剂筛选及冬凌草甲素对铜绿假单胞菌 QSI 活性研究[D]. 广州: 广东药科大学硕士学位论文, 2018
- Huang J. Screening of quorum sensing inhibitors and study on QSI activity of oridonin in *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong Pharmaceutical University, 2018 (in Chinese)
- [15] Li TT, Sun XJ, Chen HT, He BB, Mei YC, Wang DF, Li JR. Methyl anthranilate: a novel quorum sensing inhibitor and anti-biofilm agent against *Aeromonas sobria*[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103356
- [16] 丁婷. 基于荧光假单胞菌群体感应的抑制剂筛选及抑制机理探究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2019
- Ding T. Screening and inhibitory mechanism of quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas fluorescens* P07[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)
- [17] Ravn L, Christensen AB, Molin Søren, Givskov Michael, Gram Lone. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(3): 239-251
- [18] 张巧月, 刘艳艳, 万昶宸, 付正良, 王丽芳, 张兰桐. HPLC-ESI-MS/MS 法测定连翘心中的 8 种化学成分[J]. 中草药, 2017, 48(1): 192-196
- Zhang QY, Liu YY, Wan CC, Fu ZL, Wang LF, Zhang LT. Simultaneous quantification of eight constituents in the seed of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl by HPLC-MS/MS method[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(1): 192-196 (in Chinese)
- [19] Topa SH, Palombo EA, Kingshott P, Blackall LL. Activity of cinnamaldehyde on quorum sensing and biofilm susceptibility to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 455
- [20] Ding T, Li TT, Li JR. Discovery of quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas fluorescens* P07 by using a receptor-based pharmacophore model and virtual screening[J]. LWT, 2019, 109: 171-178
- [21] Geng YF, Yang C, Zhang Y, Tao SN, Mei J, Zhang XC, Sun YJ, Zhao BT. An innovative role for luteolin as a natural quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Life Sciences, 2021, 274: 119325
- [22] Gutierrez-Pacheco MM, Gonzalez-Aguilar GA, Martinez-Tellez MA, Lizardi-Mendoza J,

- Madera-Santana TJ, Bernal-Mercado AT, Vazquez-Armenta FJ, Ayala-Zavala JF. Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*[J]. Food Control, 2018, 89: 210-218
- [23] Kumar L, Chhibber S, Kumar R, Kumar M, Harjai K. Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Fitoterapia, 2015, 102: 84-95
- [24] 孙晓佳, 李婷婷, 赫彬彬, 梅永超, 王当丰, 谢晶, 励建荣. 富马酸钠对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 7-13
- Sun XJ, Li TT, He BB, Mei YC, Wang DF, Xie J, Li JR. Inhibitory effect of sodium fumarate on quorum sensing and spoilage capacity of *Pseudomonas fluorescens*[J]. Food Science, 2019, 40(11): 7-13 (in Chinese)
- [25] Asfour H. Anti-quorum sensing natural compounds[J]. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2018, 6(1): 1-10
- [26] 田叶. 连翘叶、黄芩提取物食品防腐作用研究[D]. 太原: 山西大学硕士学位论文, 2017
- Tian Y. Study on the effect of extracts from *Forsythia suspensa* leaf and *Scutellaria baicalensis* Georgi on food preservation[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Shanxi University, 2017 (in Chinese)
- [27] Chen J, Chen Q, Yu F, Huang H, Li P, Zhu J, He X. Comprehensive characterization and quantification of phillyrin in the fruits of *Forsythia suspensa* and its medicinal preparations by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. Acta Chromatographica, 2016, 28(1): 145-157
- [28] Ouyang J, Feng W, Lai XD, Chen YL, Zhang X, Rong L, Sun FJ, Chen YK. Quercetin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via the vfr-mediated lasIR system[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 149: 104291
- [29] Li TT, Wang DF, Liu N, Ma Y, Ding T, Mei YC, Li JR. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* by cinnamaldehyde[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 269: 98-106
- [30] Zhang JM, Rui X, Wang L, Guan Y, Sun XM, Dong MS. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation[J]. Food Control, 2014, 42: 125-131
- [31] 李学鹏, 陈桂芳, 仪淑敏, 王金厢, 徐永霞, 王彦波, 李婷婷, 励建荣. 基于群体感应研究丹皮提取物对嗜水气单胞菌致病性的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(3): 196-204
- Li XP, Chen GF, Yi SM, Wang JX, Xu YX, Wang YB, Li TT, Li JR. Inhibitory effects of cortex moutan extract on spoilage abilities of *Aeromonas hydrophila* based on quorum sensing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(3): 196-204 (in Chinese)
- [32] Kalia M, Singh PK, Yadav VK, Yadav BS, Sharma D, Narvi SS, Mani A, Agarwal V. Structure based virtual screening for identification of potential quorum sensing inhibitors against LasR master regulator in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 136-143
- [33] Husain FM, Ahmad I, Al-Thubiani AS, Abulreesh HH, AlHazza IM, Aqil F. Leaf extracts of *Mangifera indica* L. inhibit quorum sensing-regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 727