

维氏气单胞菌对草鱼背鳍细胞的毒性及凋亡研究*

刘明珠¹, 余庆², 肖贺贺³, 黎思巧⁴, 柯珂¹, 覃仙玲¹, 陈宪云¹, 朱冬琳¹, 许尤厚^{5**},
李鹏飞^{1,4**}

(1. 广西科学院, 广西壮族自治区海洋研究所, 广西海洋生物技术重点实验室, 广西北海 536000; 2. 广西科学院, 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 3. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; 4. 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室, 广西南宁 530007; 5. 北部湾大学海洋学院, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西钦州 535011)

摘要: 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)在我国是一种重要的淡水经济鱼类,但是由于近些年的集约化高密度养殖导致各种水产疫病暴发,不仅对养殖行业造成巨大的损失,同时对人类生命安全也存在着巨大威胁,维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)就是其中一种人畜共患的条件致病菌。本研究旨在探索维氏气单胞菌导致宿主细胞死亡的致死机制,为今后进一步针对维氏气单胞菌开发抗菌渔用功能产品提供数据支持和理论依据。本文首先测定维氏气单胞菌胞外分泌物(Extracellular products, ECPs)的蛋白浓度,然后以不同浓度的ECPs为基准,根据细胞显微镜观察结果及细胞活力检测结果确定维氏气单胞菌胞外ECPs的细胞毒性;再利用Hoechst 33342及TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)检测细胞核的变化情况,最终确定草鱼源维氏气单胞菌对宿主细胞的毒性致死机制。从毒性实验中可以看出高浓度的维氏气单胞菌ECPs对草鱼背鳍(Grass carp pectoral fin, GCPF)细胞具有明显的毒性,且从Hoechst 33342结果可以看到凋亡小体的出现,而TUNEL也出现了阳性结果,实验组出现了绿色荧光,而对照组没有出现荧光。说明维氏气单胞菌胞外分泌物对宿主细胞具有明显的毒性,而且会导致宿主细胞发生细胞凋亡。

关键词: 草鱼 维氏气单胞菌 胞外分泌物 致死机制 细胞凋亡

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2019)03-0213-06



微信扫一扫,与作者在线交流(OSID)

0 引言

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是典型的草食

性鱼类,具有生长速度快、营养需求低以及肉质鲜美等特点,是我国重要的淡水经济鱼种^[1-2]。但近年来随着集约化养殖方式的发展,养殖密度增加导致养殖

* 广西重点研发计划项目(2018AB52003),广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198176),广西科技人才专项(2018AD19367),广西科学院基本科研业务费项目(2018YJJ903,2017YJJ23002)和广西科技重大专项(AA17204095-10)资助。

【作者简介】

刘明珠(1988—),女,硕士,助理研究员,主要从事水生动物病原学的研究;余庆(1990—),女,硕士,助理研究员,主要从事水生动物病害防控技术的研究。以上2人并列第一作者。

【**通信作者】

许尤厚(1980—),男,博士,教授,硕士生导师,主要从事海洋生物多样性养护研究,E-mail:xyh_2016@bbgu.edu.cn;李鹏飞(1988—),男,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事水产重大疫病防控与生态养殖技术的研究,E-mail:pfli2014@126.com。

【引用本文】

DOI:10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20190903.003

刘明珠,余庆,肖贺贺,等.维氏气单胞菌对草鱼背鳍细胞的毒性及凋亡研究[J].广西科学院学报,2019,35(3):213-218.

LIU M Z, YU Q, XIAO H H, et al. Study on cytotoxicity and apoptosis of *Aeromonas veronii* to grass carp pectoral fin cell [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(3): 213-218.

环境恶化,各种水产疫病不断爆发,对水产养殖造成严重的危害,而且对人类的食用安全也存在潜在的威胁^[3-5]。维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)是一种革兰氏阴性菌,普遍分布于淡水等环境,主要活跃于6—9月,是一种人畜共患的条件致病菌,能够感染多种水产动物并导致出血病等^[2-3,6-7]。细菌导致宿主细胞死亡主要方式包括主动性死亡和被动性死亡,主动性死亡是细胞在受外界刺激时,自身为保护其他细胞而选择自杀的行为;被动性死亡则多是由于外界刺激导致细胞膜被破坏,细胞内容物外泄,从而导致细胞大量死亡^[8-11]。已有研究报道细菌分泌的黏附因子是用来定植于宿主细胞的,而其分泌的溶血素、气溶素等是导致宿主细胞死亡的主要因素^[6-7]。本研究将从发病草鱼中分离获得的维氏气单胞菌胞外分泌物(Extracellular products, ECPs)作用回草鱼源背鳍组织细胞系中,用以评估维氏气单胞菌的细胞毒性;然后通过 Hoechst 33342 染核观察以及 TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)检测,确定草鱼源维氏气单胞菌导致宿主细胞死亡的方式。本文通过对细胞凋亡的一系列指标检测,来探索维氏气单胞菌诱导宿主细胞在体外的死亡机制,为今后探索维氏气单胞菌对活体动物的作用奠定理论基础,并为开发针对维氏气单胞菌的抗菌功能产品提供数据支持和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究所用的维氏气单胞菌(编号为CWAV1)分离自广西南宁池塘养殖中发病的草鱼,保存于本实验-80℃冰箱中;所用细胞为本实验室已建立的草鱼背鳍组织细胞系(GCPF cell line);0.22 μm 微孔滤柱购自 Millipore 公司;96 孔细胞培养板、玻底皿、60 mm×15 mm 细胞培养皿购自康宁公司;LB 培养基、LB 琼脂培养基以及 TCBS 培养基等购自广州环凯微生物有限公司;MEM 培养基购自 Thermo 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8 活细胞检测试剂盒、Hoechst 33342 细胞核检测试剂、TUNEL 检测试剂盒等购自碧云天生物技术有限公司;生化培养箱购自上海博迅;超净工作台购自苏净安泰;观察细胞用的倒置光学显微镜为 Olympus CX41;酶标仪购自 Thermo 公司;电泳仪购自 Biorad 公司;激光共聚焦显微镜购自 Nikon 公司。

1.2 方 法

1.2.1 维氏气单胞菌胞外分泌物的制备及蛋白浓度的测定

将保存的维氏气单胞菌用三区划线法接种于 LB 琼脂平板,28℃ 倒置培养 24 h,再挑取单菌落接入 LB 液体培养基中 28℃、180 r/min 培养 12 h,3 000 g 离心 5 min,将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤于已灭菌的 15 mL 干净离心管中,所得滤液即为维氏气单胞菌的 ECPs 原液,将其分装至 1.5 mL EP 管中,封口,-20℃ 保存备用。

取一管已分装的维氏气单胞菌 ECPs 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒中的测定方法测定胞外产物中可溶性蛋白浓度,同时制作标准曲线,每个实验重复 3 次。

1.2.2 维氏气单胞菌 ECPs 对细胞毒性的研究

(1)草鱼背鳍组织细胞系的培养

GCPF 细胞传代所用培养基为含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养基,28℃ 恒温培养;测定 ECPs 毒性时,按照 4×10^4 细胞/孔的细胞量接入 96 孔细胞培养板中过夜培养^[12-14]。

(2)维氏气单胞菌 ECPs 对细胞毒性的测定

将维氏气单胞菌 ECPs 原液蛋白用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至 1 mg/mL,然后用无血清 MEM 培养基进行 2 倍稀释,即实验组浓度分别为原液(A 组)、1 000 μg/mL(B 组)、500 μg/mL(C 组)、250 μg/mL(D 组)、125 μg/mL(E 组),对照组(Con)为接入等体积的无血清 MEM 培养基。将过夜培养的 GCPF 细胞用维氏气单胞菌 ECPs 处理 24 h,用光学显微镜观察并拍照。待细胞出现变圆、皱缩或空泡等现象即为出现细胞病变(Cytopathic effect, CPE),便可测定细胞活性。具体操作如下:移除细胞上清液,用磷酸缓冲液(PBS, pH 值为 7.4)洗涤 1 次,加入 CCK-8 溶液,室温避光孵育 4 h,测定 OD_{450} 。

1.2.3 维氏气单胞菌 ECPs 对宿主细胞毒性机制的研究

(1)Hoechst 33342 染核观察

将 4×10^4 个 GCPF 细胞接入玻底皿中,过夜培养,用维氏气单胞菌 ECPs 原液处理 2 h 后进行 Hoechst 33342 染核,观察细胞核形态变化;其中对照组用无血清 MEM 培养基处理 2 h。细胞核染色的具体操作如下:

①将处理好的 GCPF 细胞用 PBS 轻轻洗涤 2 次;

②沿边缘缓慢加入 100 μL 的 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342, 避光 3 min;

③将用 Hoechst 33342 处理好的 GCPF 细胞用 PBS 轻轻洗涤 2 次, 加入 200 μL 的 PBS 放于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

(2) TUNEL 测定

具体细胞培养及处理方法同 Hoechst 33342 染色观察。染色操作方法如下:

①将处理好的 GCPF 细胞用 PBS 轻轻洗涤 1 次;

②用 100 μL 固定液固定 30 min;

③PBS 轻轻洗涤 1 次, 加入 100 μL 通透液, 5 min;

④PBS 轻轻洗涤 2 次, 加入 50 μL TUNEL 染色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置 1 h;

⑤PBS 轻轻洗涤 2 次, 加入 100 μL PBS, 然后于荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 维氏气单胞菌 ECPs 胞外蛋白浓度的测定

图 1 为 BSA 蛋白标准曲线, 其回归方程为 $y =$

$0.7289x - 0.0001, R^2 = 0.9995$ 。根据该回归方程求得维氏气单胞菌 ECPs 蛋白浓度为 1 473 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

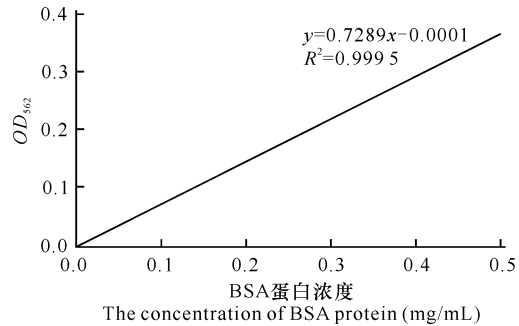


图 1 BSA 蛋白浓度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of BSA protein concentration

2.2 维氏气单胞菌 ECPs 对宿主细胞形态的影响

如图 2 所示, 维氏气单胞菌 ECPs 原液 (A 组) 对 GCPF 细胞形态的影响较大, 大部分出现皱缩, 当 ECPs 蛋白浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B 组) 时细胞也出现了一定程度的皱缩变圆, 但是没有原液明显, 当浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C 组) 时, 细胞出现空泡但是细胞形态没有太大改变。D 组和 E 组的细胞形态无明显变化, 与对照组细胞形态相似。

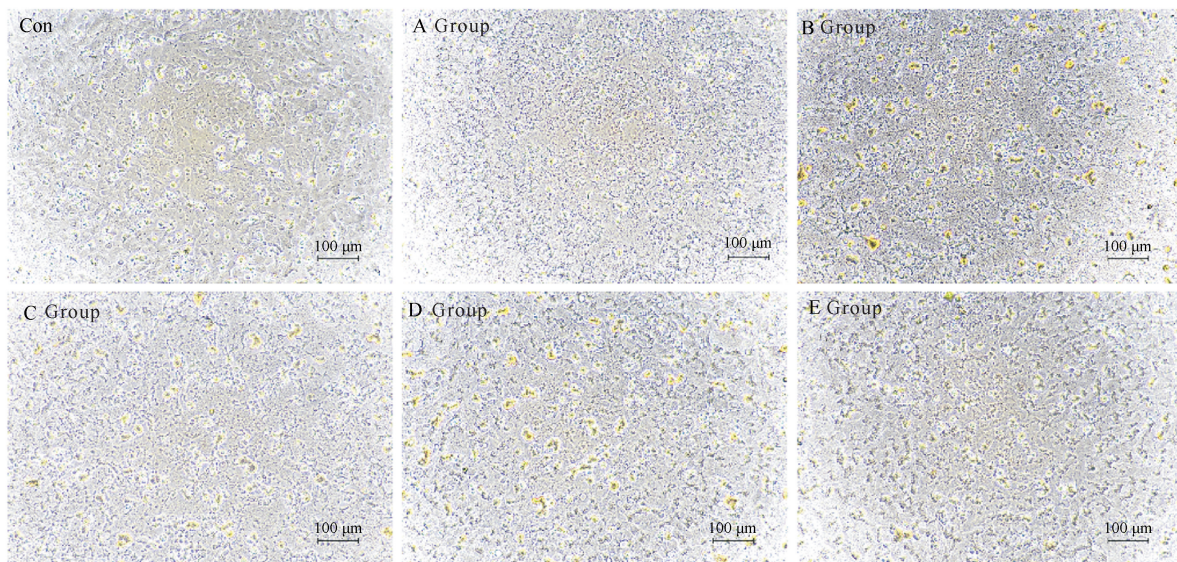


图 2 维氏气单胞菌 ECPs 对 GCPF 细胞毒性的影响

Fig. 2 Effect of *Aeromonas veronii* ECPs on GCPF cells toxicity

2.3 维氏气单胞菌 ECPs 对宿主细胞存活率的影响

从图 3 中可以看出当使用原液以及 ECPs 蛋白浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞活性受到显著性影响; ECPs 蛋白浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞活性没有受到影响, 而当 ECPs 的浓度达到 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或者更低时, 不仅细胞活性没有影响反而一定程度上促进细胞

的生长。

2.4 维氏气单胞菌 ECPs 对宿主细胞产生凋亡小体的检测

2.4.1 Hoechst 33342 的染色结果

如图 4 所示, 光镜下可观察到实验组细胞表面出现明显的空洞, 图中光镜照片箭头所指即为出现空洞

细胞,而对照组细胞的形态比较完整。根据 Hoechst 33342 检测,正常的 GCPF 细胞培养 2 h 后细胞核仍为完整,但是实验组细胞已经出现明显的细胞核碎裂(荧光照片中箭头所指处),这种碎裂的细胞核即为凋亡小体。

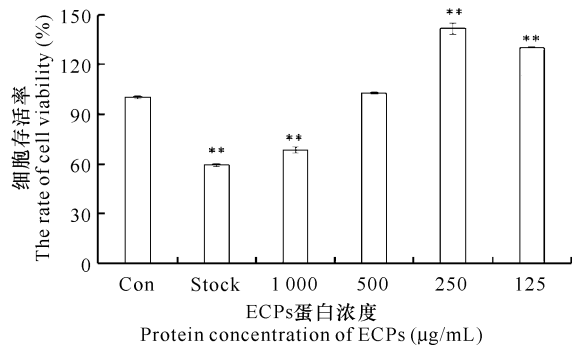


图 3 维氏气单胞菌 ECPs 对 GCPF 细胞的毒性分析

Fig. 3 Toxicity analysis of *Aeromonas veronii* ECPs to GCPF cells

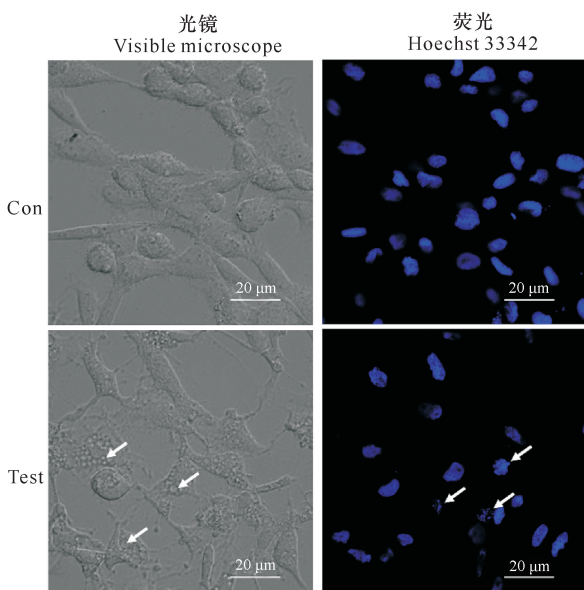


图 4 Hoechst 33342 检测维氏气单胞菌 ECPs 对 GCPF 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of *Aeromonas veronii* ECPs on apoptosis of GCPF cells by Hoechst 33342

2.4.2 TUENL 检测结果

判定细胞凋亡的另外一种方法是观察细胞 DNA 是否出现片段化。由图 5 可知,在相同的激发光下,对照组在光镜下可以明显看到完整的细胞形态,但却不能染上颜色,荧光显微观察下为全黑色;实验组在光镜下已经出现明显的皱缩、变圆,甚至出现空泡化,在荧光显微镜下可以明显地看到绿色荧光(如箭头所示即为发生凋亡的细胞)。

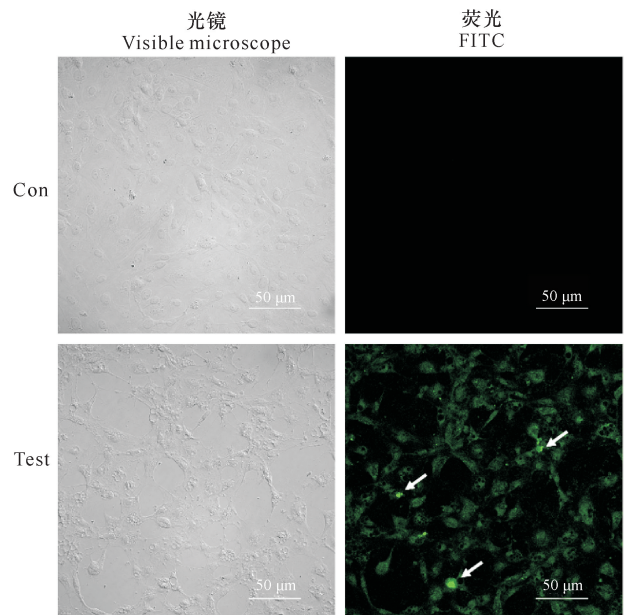


图 5 TUNEL 技术检测维氏气单胞菌 ECPs 对 GCPF 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of *Aeromonas veronii* ECPs on apoptosis of GCPF cells by TUNEL technique

3 讨论

近些年气单胞菌属中的细菌越来越受到学者的关注,主要原因是气单胞菌属中的部分细菌会导致人畜共患病,如嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌和豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)等。被气单胞菌属细菌感染的人类,轻则患肠炎,重则导致伤口感染甚至败血症等^[15-19]。维氏气单胞菌是近些年水产常见病原菌,常见于淡水养殖,分布广泛并且具有很强的致病性,鱼感染后的主要症状为厌食、腹腔肿大积水和内脏器官广泛出血等^[16,20]。鉴于维氏气单胞菌的广泛致病性,所以有必要研究其对宿主细胞的毒性作用及导致宿主细胞死亡的机制。本研究将草鱼源维氏气单胞菌的细胞外分泌物 ECPs($\geq 500 \mu\text{g/mL}$)作用回宿主细胞,发现其对 GCPF 细胞具有明显的破坏;而当 ECPs 浓度低于 $500 \mu\text{g/mL}$ 时,ECPs 不会导致宿主细胞形态发生明显变化。该细胞的光镜观察结果与利用 CCK-8 检测的细胞活性结果一致,说明维氏气单胞菌的细胞外分泌物 ECPs 在高浓度时才会对细胞产生损伤,但是是否随着时间的延长对细胞伤害越大,仍需要进一步研究;当浓度低于 $250 \mu\text{g/mL}$ 时,维氏气单胞菌的细胞外分泌物 ECPs 对 GCPF 细胞生长具有促进作用,这可能是因为在 ECPs 浓度没有达到致死浓度,细胞为

自我保护的反馈机制,以抵消外界压力。另外有报道称,气单胞菌属如维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌等在人类肠道内均有分布,这就表示维氏气单胞菌可能是一个条件致病菌,也就是说只有达到一定条件下才会导致疾病的发生及生物体的死亡^[7,21-22]。

在明确草鱼源维氏气单胞菌 ECPs 对宿主细胞具有毒性作用后,本研究使用 Hoechst 33342 进行染核观察。Hoechst 33342 染料是一种可透过细胞膜对细胞核进行染色的蓝色荧光染料。从图 4 中可以看出对照组在光镜下为完整的细胞,在荧光显微镜下可以观察到完整的细胞核;而实验组在光镜下观察其细胞内部出现明显的空泡,Hoechst 33342 荧光染料显示宿主细胞的细胞核发生碎裂,出现凋亡小体,表明细胞出现早期凋亡现象。细胞在发生凋亡时,一些 DNA 内切酶被激活,将核小体间的基因组 DNA 切断,从而暴露 3'-OH,并在脱氧核苷酸转移酶的催化下与带有荧光的 dUTP 结合^[23-24]。从图 5 结果中可以看出对照组细胞没有被 TUNEL 荧光染色,并且光镜观察结果显示其细胞形态无明显变化,表明细胞仍然处于正常状态;实验组细胞中出现明显的绿色荧光,并且光镜观察结果显示试验组细胞出现不同程度的破坏,表明细胞中出现 3'-OH,进一步说明细胞的基因组 DNA 被切断。

根据上述结果可以初步判定致病性草鱼源维氏气单胞菌会导致宿主细胞发生细胞凋亡。细菌在自然界中广泛存在,并且在适宜条件下会大量繁殖,其产生的胞外产物更是具有一定的毒性,所以深入研究其导致宿主细胞死亡的机制,对于开发高效的抗病功能产品具有重要意义。

4 结论

致病性草鱼源维氏气单胞菌细胞外分泌物 ECPs 在高浓度时对草鱼背鳍细胞具有明显的破坏作用。而 Hoechst 33342 及 TUNEL 技术检测,初步确定草鱼源维氏气单胞菌导致宿主细胞死亡是通过凋亡途径发生的,即维氏气单胞菌对宿主细胞具有明显的毒性,而且会导致宿主细胞发生细胞凋亡。

参考文献

- [1] DAI J, ZHANG L, ZHANG P, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits grass carp reovirus replication in grass carp ovarian epithelial cells [J]. *GSL J Clin Microbiol*, 2018, 1(1): 2-6.
- [2] ZHAO H, CHONG J, TANG R, et al. Metabolomics investigation of dietary effects on flesh quality in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Gigascience*, 2018, 7(10): 1-18.
- [3] 李鹏飞, 余庆, 覃仙玲, 等. 广西北部湾海水养殖业现状与病害防控技术体系研究展望[J]. *广西科学*, 2018, 25(1): 15-25.
- [4] 余庆, 李菲, 王一兵, 等. 广西北部湾大宗海水养殖鱼类卵形鲳鲹感染溶藻弧菌及其致病性研究[J]. *广西科学*, 2018, 25(1): 68-73.
- [5] LI P, YU Q, LI F, et al. First identification of the nervous necrosis virus isolated from cultured golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Guangxi, China [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(7): 1177-1180.
- [6] 高彩霞, 任燕, 王庆, 等. 草鱼源致病性维氏气单胞菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 46(3): 409-415.
- [7] 吴同垒, 单晓枫, 孟庆峰, 等. 维氏气单胞菌研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2011, 45(7): 41-44.
- [8] SGONC R, GRUBER J. Apoptosis detection; An overview [J]. *Experimental Gerontology*, 1998, 33(6): 525-33.
- [9] ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S. Carcinogenesis and apoptosis; Paradigms and paradoxes [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(10): 1939-1945.
- [10] HIPFNER D, COHEN S M. Connecting proliferation and apoptosis in development and disease [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(10): 805-815.
- [11] WHITE E. Life, death, and the pursuit of apoptosis [J]. *Genes & Development*, 1996, 10(1): 1-15.
- [12] 余庆, 李菲, 覃仙玲, 等. 广西卵形鲳鲹小脑来源细胞系的建立及特征分析[J]. *广西科学*, 2018, 25(1): 74-79.
- [13] ZHOU L, LI P, LIU J, et al. Establishment and characterization of a mid-kidney cell line derived from golden pompano *Trachinotus ovatus*, a new cell model for virus pathogenesis and toxicology studies [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2017, 53(4): 320-327.
- [14] LI P, ZHOU L, NI S, et al. Establishment and characterization of a novel cell line from the brain of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2016, 52(4): 410-418.
- [15] 王魁云, 蒋霞云, 江小妹, 等. 团头鲂和草鱼肠道纤维素酶产生菌的筛选和鉴定[J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(4): 624-632.
- [16] HICKMAN-BRENNER F W, MACDONALD K L, STEIGERWALT A G, et al. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(5): 900-906.
- [17] SKWOR T, SHINKO J, AUGUSTYNIAK A, et al. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* Predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant aeromonas isolates from Lake Erie [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(3): 841-848.

- [18] DEODHAR L P, SARASWATHI K, VARUDKAR A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29(5): 853-856.
- [19] GONZÁLEZ-SERRANO C J, SANTOS J A, GARCÍA-LÓPEZ M L, et al. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(3): 414-419.
- [20] 黄小丽, 吴春艳, 邓永强, 等. 斑点叉尾鲷维氏气单胞菌病的病理组织学观察[J]. *中国兽医科学*, 2010, 40(7): 738-742.
- [21] CHI-JUNG W, JIUNN-JONG W, JING-JOU Y, et al. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan [J]. *Journal of Infection*, 2007, 54(2): 151-158.
- [22] BORRELL N, FIGUERAS M J, GUARRO J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(2): 103-108.
- [23] HUANG X, HUANG Y, OUYANG Z, et al. Singapore grouper iridovirus, a large DNA virus, induces non-apoptotic cell death by a cell type dependent fashion and evokes ERK signaling [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(8): 831-845.
- [24] CHEN S P, YANG H L, HER G M, et al. Betanodavirus induces phosphatidylserine exposure and loss of mitochondrial membrane potential in secondary necrotic cells, both of which are blocked by bongkrekic acid [J]. *Virology*, 2006, 347(2): 379-391.

Study on Cytotoxicity and Apoptosis of *Aeromonas veronii* to Grass Carp Pectoral Fin Cell

LIU Mingzhu¹, YU Qing², XIAO Hehe³, LI Siqiao⁴, KE Ke¹, QIN Xianling¹, CHEN Xianyun¹, ZHU Donglin¹, XU Youhou⁵, LI Pengfei^{1,4}

(1. Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanography, Guangxi Academy of Sciences, Beihai, Guangxi, 536000, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan, 453007, China; 4. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Nanning, Guangxi, 530007, China; 5. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, College of Marine Sciences, Beibu Gulf University, Qinzhou, Guangxi, 535011, China)

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) is an important commercially cultured freshwater fish in China. In recent years, with the advent of intensive aquatic farming, various diseases emerged in commercial populations, which caused enormous economic loss, even threatened human safety. *Aeromonas veronii* is one of the zoonotic pathogens. This study aimed to explore the lethal mechanism of *A. veronii* causing to host cell death and provide data supports and theoretical basis for further development of anti-bacterial fishery functional products against *A. veronii*. This paper first determined the protein concentration of extracellular products (ECPs) of *A. veronii*. Then, based on the ECPs of different concentrations, the cell toxicity of extracellular ECPs of *A. veronii* was determined according to the results of light microscopy and cell viability. Hoechst 33342 and TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) were used to detect the changes of nucleus, and finally the toxic lethal mechanism of *A. veronii* to host cells was determined. It can be seen from the toxicity experiment that high concentrations of *A. veronii* ECPs have obvious toxicity to grass carp pectoral fin (GCPF) cells, and the appearance of apoptotic bodies can be seen from Hoechst 33342 results. Meanwhile, TUNEL showed positive results with green fluorescence in test group and no fluorescence in the control group. It is indicated that *A. veronii* ECPs is obviously toxic to host cells and can cause apoptosis of host cells.

Key words: grass carp, *Aeromonas veronii*, ECPs, pathogenesis, apoptosis