



王瑜, 武周慧, 陆彦, 王之王, 杜衡, 肖爽, 王真. 邻菲罗啉抗大肠杆菌作用机制的初步研究[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(01): 109-118.
WANG Yu, WU Zhouhui, LU Yan, WANG Zhiwen, DU Heng, XIAO Shuang, WANG Zhen. Study on the antibacterial mechanism of 1, 10-Phenanthroline monohydrate against *E. coli*[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(01): 109-118.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.01.10

邻菲罗啉抗大肠杆菌作用机制的初步研究

王瑜 武周慧 陆彦 王之王 杜衡 肖爽 王真*

(北京农学院 动物科学技术学院/兽医学(中兽医)北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要 为分析邻菲罗啉对大肠杆菌的抗菌作用机制, 本研究测定了邻菲罗啉对大肠杆菌的最小抑菌浓度及最小生物被膜抑制浓度, 并通过扫描电镜观察邻菲罗啉对大肠杆菌微观形态的影响, 随后利用 RNA-seq 技术和 qPCR 对邻菲罗啉处理大肠杆菌差异表达基因进行分析。结果表明: 1) 终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 的邻菲罗啉可完全抑制大肠杆菌生长, 50 $\mu\text{mol/L}$ 可抑制其生物被膜形成。2) 电镜结果显示邻菲罗啉可使大肠杆菌菌体皱缩, 细胞膜及细胞壁受到破坏。3) 使用邻菲罗啉处理大肠杆菌后, 786 个基因出现显著上调, 850 个基因出现显著下调, 差异表达基因主要参与细菌代谢过程、双组分系统、群体感应、抗生素合成等通路, 如下调基因 *ompW* 在革兰氏阴性菌生物被膜形成、黏附、应激耐受方面发挥重要作用, *PepN* 蛋白是宿主抵抗细菌感染的靶点, 上调基因 *citT* 编码蛋白可影响细菌的能量供应及药物外排系统。4) 选择 9 个与生物被膜形成及耐药性相关基因进行 qPCR 验证, 与转录组测序结果一致。综上, 邻菲罗啉对大肠杆菌具有显著的抑制作用, 且可调控大肠杆菌代谢及耐药基因表达水平。本研究初步分析了邻菲罗啉对大肠杆菌的抗菌作用机制, 为寻找抗生素替代药物提供新思路。

关键词 邻菲罗啉; 大肠杆菌; 耐药性; 抗菌活性; 作用机制

中图分类号 S852.61

文章编号 1007-4333(2024)01-0109-10

文献标志码 A

Study on the antibacterial mechanism of 1, 10-Phenanthroline monohydrate against *E. coli*

WANG Yu, WU Zhouhui, LU Yan, WANG Zhiwen, DU Heng, XIAO Shuang, WANG Zhen*

(Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine/Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract In order to analyze the antibacterial mechanism of 1, 10-PHEN against *E. coli*, the minimum inhibitory concentration and the minimum biofilm inhibition concentration of 1, 10-PHEN on *E. coli* was determined, and the effect of 1, 10-PHEN on the micro-morphology of *E. coli* by scanning electron microscope was observed. Then, the differentially expressed genes in *E. coli* treated with 1, 10-PHEN by RNA-seq technology and qPCR were analyzed. The results showed that: 1) The final concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ 1, 10-PHEN could completely inhibit the growth of *E. coli*, and 50 $\mu\text{mol/L}$ 1, 10-PHEN could inhibit the formation of its biofilm. 2) The results of electron microscope showed that 1, 10-PHEN could shrink *E. coli* and destroy its cell membrane and cell wall. 3) 1, 10-PHEN could shrink *E. coli* and destroy its cell membrane and cell wall. After treating *E. coli* with 1, 10-PHEN, 786 genes were significantly up-regulated and 850 genes were significantly down-regulated. The differentially expressed genes mainly participated in bacterial metabolism, two-

收稿日期: 2023-05-16

基金项目: 2023 年北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(5056516030/003); 北京市优秀人才培养资助项目(2017000026833ZK18); 现代农业产业技术体系北京市创新团队 BAIC08-2023; 北京农学院青年科学基金项目(QNKJ202107)

第一作者: 王瑜(ORCID:0009-0007-4937-1290), 硕士研究生, E-mail: 1763494880@qq.com

通讯作者: 王真(ORCID:0000-0003-4002-7892), 副教授, 主要从事病原菌致病机制研究, E-mail: wangzhen3355@163.com

component system, quorum sensing, antibiotic synthesis, and other pathways. The down-regulated gene *ompW* played an important role in biofilm formation, adhesion and stress tolerance of gram-negative bacteria, and PepN protein was the target of host to resist bacterial infection. Up-regulating the protein encoded by *citT* gene can affect the energy supply and drug excretion system of bacteria. 4) Nine genes related to biofilm formation and drug resistance were selected for qPCR verification, which was consistent with the results of transcriptome sequencing. In conclusion, 1, 10-PHEN exhibits a significant inhibitory effect on the antibacterial activity of *E. coli*, and exerts regulatory control over the metabolism and expression levels of drug resistance genes in this bacterium. This study provides preliminary insights into the antibacterial mechanism of 1, 10-PHEN against *E. coli*, and offers novel perspectives for identifying alternative antibiotics.

Keywords 1, 10-Phenanthroline monohydrate; *E. coli*; antimicrobial resistance; antibacterial activity; action mechanism

大肠杆菌是人类和多种动物中最常见的条件性致病菌,可利用许多毒力因子和效应分子破坏宿主细胞的功能介导致病,是引起肠道和肠外疾病的主要病原体,引发胃肠炎、尿路感染和血液感染^[1-2]。大肠杆菌可能通过种间和种内水平基因转移(Horizontal gene transfer, HGT)获得耐药基因^[3],对多种抗生素产生高度耐药性^[4],导致多重耐药性(Multi-drug resistance, MDR)大肠杆菌数量在世界范围内迅速增加^[5]。在临床感染治疗中,同样面临着原有抗菌药物有效性下降的问题,迫切需要开发与传统抗生素结构和作用方式不同的新型抗菌化合物对抗相关细菌引起的感染。

小分子抑制剂是一类能够与靶蛋白结合降低靶蛋白生物活性的小分子化合物,某些信号小分子通过非杀菌机制参与调控细菌生长过程,不易产生耐药性问题,可以作为抗生素发展的互补策略^[6]。基础研究中用于抗菌抑制剂的靶标主要针对细菌因子,如针对大肠杆菌脂蛋白运输途径、III型分泌系统 ATPase EscN 蛋白、AraC 家族转录因子 Rns 蛋白等,这类抑制剂一般作用于单一靶标,药物靶标的微小变化将影响药物作用效果^[7-8]。邻菲罗啉(1, 10-Phenanthroline monohydrate, 1, 10-PHEN)由 3 个六元芳环组成,是一种金属螯合剂,可防止链脲佐菌素诱导染色体畸变,也是基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMP)的抑制剂。多项研究表明,邻菲罗啉及其衍生物均表现出广谱抗菌和抗真菌活性,可在金属螯合作用和生物功能之间建立紧密联系^[9-10]。邻菲罗啉可干扰白色念珠菌酶促反应中关键金属的获取和利用,强烈抑制其金属肽酶及锌依赖性金属酶水解活性,有选择性地隔离细胞代谢必需金属离子,干扰真菌的细胞稳态,导致细胞死亡^[11]。邻菲罗啉类药物与细菌结合

非单一结合靶点,脱靶可能性小,已在临床上作为局部抗菌剂应用^[12]。

实验室前期研究通过虚拟筛选技术获得候选小分子抑制剂邻菲罗啉,初步研究发现邻菲罗啉对大肠杆菌具有抑菌活性,且能抑制大肠杆菌生物被膜的形成。为进一步了解邻菲罗啉对大肠杆菌细菌转录调控的影响和抗菌作用机制,本研究借助 RNA-seq 技术分析邻菲罗啉影响的细菌基因表达谱,为邻菲罗啉作用机制的阐释提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

大肠杆菌 ATCC 25922 由本实验室于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件保存。

邻菲罗啉购自上海陶术生物科技有限公司;细菌 RNA 快速提取试剂盒和 TRUEscript SYBR Green qPCR Kit 购自北京艾德莱生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、LB 琼脂培养基和 LB 液体培养基购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大肠杆菌 ATCC 25922 菌液制备

取出冻存的 ATCC 25922 菌种甘油管,划线接种于 LB 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养约 16 h。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床 200 r/min 培养至 OD_{630} 为 0.5,对菌液进行微量接种菌落计数^[13],调整菌液浓度为 $1\times 10^6\text{ CFU/mL}$,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 邻菲罗啉溶液的配制

准确称取邻菲罗啉 25 mg,用 DMSO 溶解配置成 190 mmol/L 母液,使用时用 LB 液体培养基稀释为所需浓度。

1.2.3 邻菲罗啉的最小抑菌浓度(MIC)测定

采用微量稀释法^[14]和 OD 值测定法,分别测定

不同浓度的邻菲罗啉对大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)。使用含邻菲罗啉的LB培养基(终浓度为6.25、12.5、25、50、100、200、400和800 $\mu\text{mol/L}$)将大肠杆菌培养物浓度调整为 10^6 CFU/mL,大肠杆菌菌液为阳性对照,LB培养基为空白对照,稀释后菌液接种于96孔培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h后使用酶标仪测量在630 nm处的OD值。

1.2.4 邻菲罗啉的最小生物被膜抑制浓度测定(MBIC)

使用含邻菲罗啉的LB培养基(终浓度为1/32 MIC、1/16 MIC、1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC、2 MIC)将大肠杆菌培养物浓度调整为 10^6 CFU/mL,接种于96孔培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养48 h后取出培养物,用结晶紫染色法对生物被膜进行定量分析,使用酶标仪测量在570 nm处的OD值。

1.2.5 扫描电镜(SEM)观察邻菲罗啉处理后大肠杆菌的形态

将6 mm的细胞爬片放入12孔板底部,邻菲罗啉组加入300 μL 含浓度为1/2 MIC邻菲罗啉的LB培养基及300 μL 菌液,EC组(不添加邻菲罗啉),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h。孵育后用PBS洗涤,爬片用2.5%戊二醛4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,乙醇分级脱水。样品临界点干燥后溅射涂金,在扫描电镜下观察。

1.2.6 邻菲罗啉胁迫下大肠杆菌转录组学分析

大肠杆菌在LB培养基中过夜培养,设置2个组,未处理对照组、邻菲罗啉组(添加1/2 MIC邻菲罗啉),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{630} 为0.6。使用细菌RNA快速提取试剂盒分离各样品中的总RNA,在1%琼脂糖凝胶上检测RNA是否降解和污染,使用Agilent 2100生物分析仪(Agilent Technologies, CA, USA)完成RNA定量,使用NanoDrop分光光度计评估质量和完整性,送至北京奥维森基因科技有限公司完成转录组测序。

1.2.7 差异表达基因的筛选、功能注释和富集分析

根据转录组测序结果,以大肠杆菌K-12 MG1655基因组为参考序列,使用Trimmomatic软件、Bowtie 2(Bowtie 2-2.3.5.1)比对软件及DESeqR包(1.12.0)^[15],对未处理大肠杆菌EC组、邻菲罗啉处理组(1/2 MIC邻菲罗啉)进行差异基因

表达分析,差异基因进行筛选的阈值为: $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 $q\text{ value} < 0.005$ 。对差异表达基因进行GO和KEGG富集分析。

1.2.8 邻菲罗啉对大肠杆菌差异表达基因的qPCR验证

为验证RNA-seq结果,选取大肠杆菌抗生素生物合成及生物被膜形成相关的4个显著上调和5个显著下调的基因作为目标扩增基因,根据NCBI上大肠杆菌序列设计引物。根据TRUEscript SYBR Green qPCR Kit说明书,以16S rRNA为内参基因,用qPCR对所选基因进行相对定量检测。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因mRNA的转录水平。

1.3 统计分析

应用Graphpad Prism 8.0对所得数据进行分析,并制作结果图。获得数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示。 $*P < 0.05$,与未处理大肠杆菌组相比差异显著; $**P < 0.01$,与未处理大肠杆菌组相比差异极显著。

2 结果与分析

2.1 邻菲罗啉对大肠杆菌的抗菌活性分析

最小抑菌浓度(MIC)、最小生物被膜抑制浓度(MBIC)用于评估各种抗菌化合物的抗菌功效。不同浓度邻菲罗啉作用大肠杆菌24 h后,测定其MIC及MBIC,结果如图1所示。邻菲罗啉对大肠杆菌的MIC为100 $\mu\text{mol/L}$ (图1(a)),MBIC为50 $\mu\text{mol/L}$ (图1(b)和1(c)),由此可知,邻菲罗啉对大肠杆菌具有良好的抑菌活性,对大肠杆菌生物被膜有明显抑制作用且呈浓度依赖性。

2.2 邻菲罗啉对大肠杆菌细胞形态的影响

扫描电子显微镜可以清晰显示细菌的表面形态和内部超微结构。邻菲罗啉作用大肠杆菌48 h后,通过电子显微镜观察细胞形态的变化,结果如图2所示。未处理的大肠杆菌细胞形态完整,成短杆状,菌体饱满,表面较为光滑,细胞壁完整(图2(a));经邻菲罗啉处理后的大肠杆菌细胞出现破损,菌体皱缩,表面粗糙且有多处凹陷,细胞边界模糊,细胞膜及细胞壁破坏严重(图2(b))。结果表明,邻菲罗啉处理大肠杆菌后,可显著破坏细菌细胞的正常形态,导致细胞受到破坏。

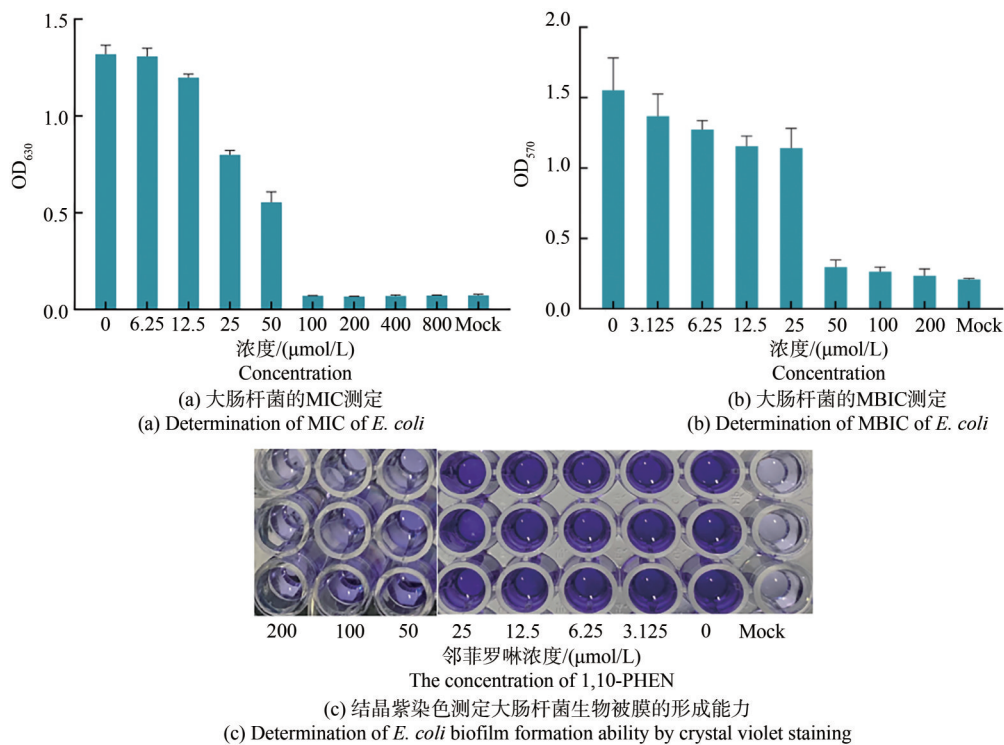


图1 邻菲罗啉对大肠杆菌的抑菌效果
Fig. 1 Bacteriostatic effect of 1,10-PHEN on *E. coli*

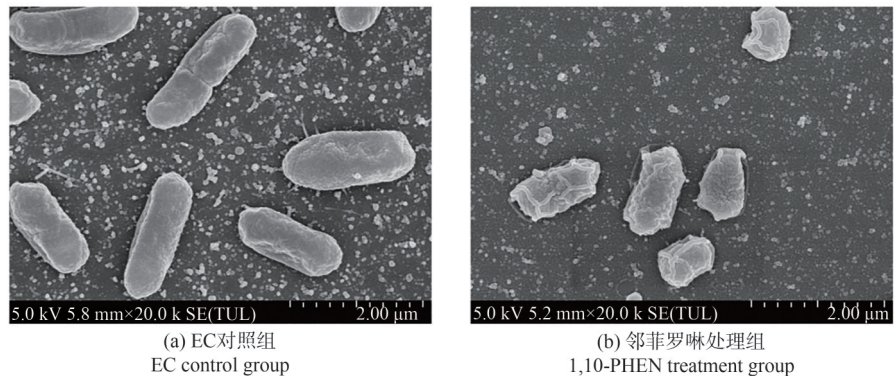


图2 扫描电镜观察邻菲罗啉对大肠杆菌形态的影响
Fig. 2 SEM observation of the effect of 1,10-PHEN on the morphology of *E. coli*

2.3 邻菲罗啉对大肠杆菌转录组的影响

2.3.1 差异基因表达分析

利用 Illumina 二代高通量测序平台,采用 PE150 测序策略,利用 Bowtie 2 和 Rockhopper 软件完成比对和转录本拼接分析,对所有基因进行定量分析,以未处理大肠杆菌组与邻菲罗啉处理组作为差异组合,分别获得 16 379 242 和 16 461 344 个序列,与大肠杆菌 K-12 的基因组比对,筛选标准为基因表达差异倍数大于 2 且 FDR 组比对,筛选显著差异的基因,结果如图 3 所示,共获得显著上调基因

786 个,下调基因 850 个。

2.3.2 差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析

邻菲罗啉处理大肠杆菌后,对差异表达基因进行 GO 分析,如图 4(a) 所示,邻菲罗啉处理后前 30 个差异富集最显著的基因通路包括:在生物学过程方面主要参与有机氮化合物合成与代谢、氧化还原反应、小分子合成与代谢、蛋白质代谢等过程;在细胞组分方面主要参与细胞内、细胞内细胞器和非膜界细胞器等;在分子功能方面主要富集于催化活性、离子结合、氧化还原酶活性、结构分子活性等,

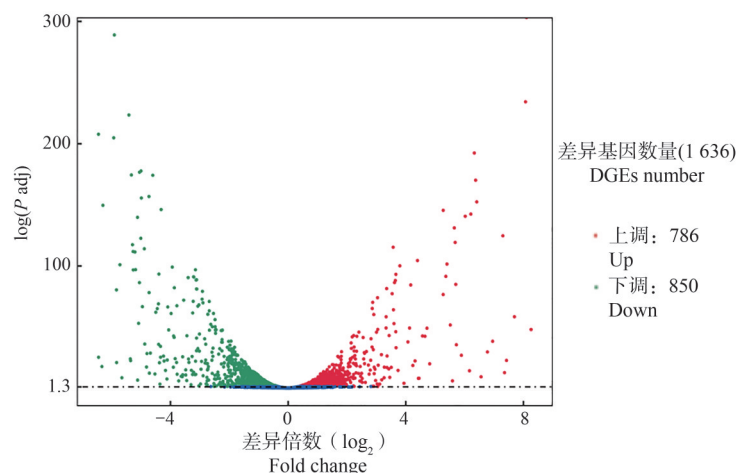


图 3 邻菲罗啉对大肠杆菌转录组差异基因的分布状况

Fig. 3 Distribution of DEGs in *E. coli* transcriptome by 1,10-PHEN

这些功能分类包括上调基因和下调基因。其中,与生物素合成、青霉素结合相关基因均表达上调,与跨膜运输、对抗生素反应、转运酶活性、生殖调节、应激反应调节相关基因均表达下调。结果表明,邻菲罗啉可影响大肠杆菌催化活性和转运蛋白活性等分子功能,导致大肠杆菌的耐药和毒力表型发生变化。

对差异表达基因进行KEGG分析,结果如图4(b)所示,大肠杆菌经邻菲罗啉处理后共有96条通路发生差异富集,其中前20条富集最显著的通路涉及多个代谢途径,包括精氨酸和脯氨酸等氨基酸合成与代谢、淀粉和蔗糖合成与代谢、柠檬酸循环等;次生代谢产物的生物合成、抗生素的生物合成、细菌趋化性、阳离子抗菌肽耐药性、 β -内酰胺抗性、鞭毛集合体、ABC转运、生物被膜的形成、群体感应等多个途径,这些途径可能直接或间接与大肠杆菌的致病性及耐药性相关。

2.3.3 邻菲罗啉对大肠杆菌代谢的调节作用

邻菲罗啉可造成大肠杆菌能量代谢的紊乱。转录组分析结果显示,共有595个差异表达基因涉及多个代谢途径,如图5所示,包括次生代谢物的生物合成、碳代谢、糖酵解与糖异生及氨基酸的生物合成等。其中涉及的基因包括*fdhDEF*(编码甲酸脱氢酶)、*hycABCDE*(参与*hyc*和*hyp*操纵子的转录抑制)、*galS*(编码半乳糖超诱导因子)、*garD*(编码半乳糖酸脱水酶)、*fucO*(编码乙醇脱氢酶)、*hybABCDEO*(参与编码氢化酶)、*lysA*(参与赖氨酸

2.3.5 邻菲罗啉对大肠杆菌铁载体的调控

合成)、*pepEN*(编码丙氨酸氨基肽酶)、*argI*(编码精氨酸酶)等显著下调,*dcuABC*、*dctA*、*glpA*、*aspA*、*frdABCD*、*fum*和*citDEF*等显著表达上调,其中*fum*基因编码延胡索酸水解酶可催化延胡索酸与苹果酸的相互转化,*citD*、*citE*和*citF*基因产物分别为柠檬酸裂解酶的 γ 、 β 和 α 亚基,*citT*基因编码产物为柠檬酸盐/琥珀酸盐抗转运剂,这些基因的差异表达表明邻菲罗啉可以影响大肠杆菌电子传递链、三羧酸循环过程。此外,*nar*基因可编码硝酸盐还原酶复合物允许细菌在厌氧生长过程中使用硝酸盐作为电子受体在邻菲罗啉的刺激下发生上调,*hmp*基因在有氧过程中参与NO解毒,也发生了显著下调。表明在邻菲罗啉的作用下大肠杆菌存在呼吸抑制现象。

2.3.4 邻菲罗啉对大肠杆菌环境应答的分子调控

邻菲罗啉对大肠杆菌双组份系统、ABC转运系统、生物被膜形成、群体感应、细菌趋化性等多个环境应答调控机制具有显著调节作用。转录组分析结果显示,共有91个双组份系统及85个ABC转运蛋白调控基因发生差异表达(图6),其中*citT*、*atoABE*和*hyaC*等47个基因显著下调,共34个基因发生了显著上调如*torACD*和*narGHZ*。共有26个群体感应及28个生物被膜形成相关基因发生差异表达,包括*sdiA*、*flu*和*bcsA*等21个上调基因,*gcvA*、*dgcC*、*glgCP*、*ygiS*和*ompW*等30个下调基因。表明邻菲罗啉可影响大肠杆菌的ATP形成和能量供应,降低大肠杆菌对环境的适应力。

邻菲罗啉对大肠杆菌铁载体调控基因的表达

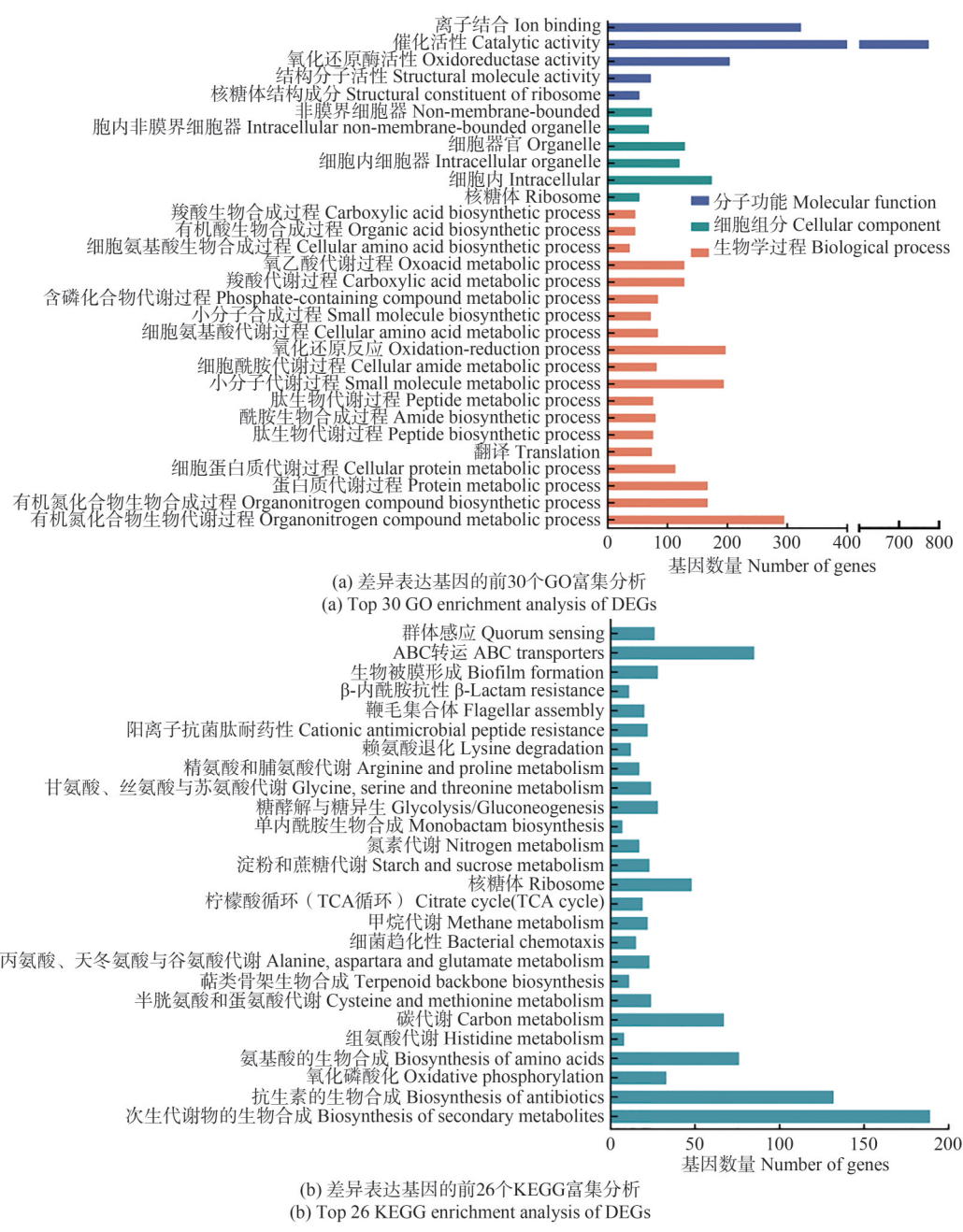


图4 邻菲罗啉对大肠杆菌转录组差异基因表达分析的影响
Fig. 4 Effect of 1,10-PHEN on DEGs analysis of *E. coli* transcriptome

也产生了影响,共有6个与铁载体生物合成直接相关基因发生表达上调(图7),*ent*基因参与细菌铁载体肠杆菌素的生物合成,*suf*基因可在铁限制下促进细胞外铁螯合剂中铁的摄取,异氢胺酸型铁载体(*fhu*)参与络合铁的吸收,*efe*参与外源性血红素铁的回收,这些基因均发生显著上调。其余间接相关如铁硫簇蛋白形成相关的基因 *ftnAB*、*ytfE* 和 *nuoIGH*,与调节金属结合相关的基因 *ydjY*、*yiaY* 和

mocA 均发生显著下调。表明邻菲罗啉可影响环境及大肠杆菌内铁离子的浓度,减少铁离子摄入及利用。

2.4 邻菲罗啉对大肠杆菌差异表达基因的 qPCR 验证

为验证 RNA-seq 分析差异表达基因的准确性,根据基因功能,选择与生物被膜形成及在耐药性产生方面具有潜在作用的9个差异表达功能基因进行

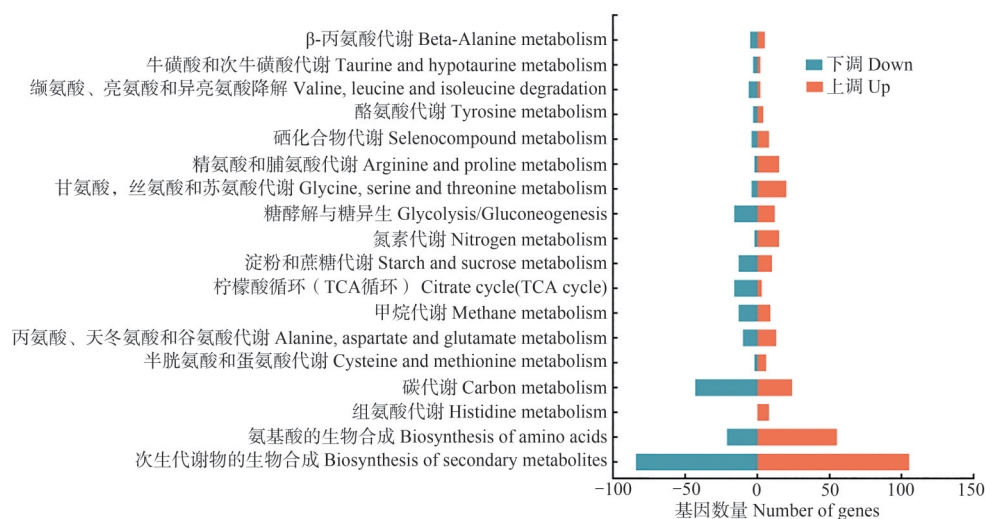


图 5 邻菲罗啉对大肠杆菌代谢通路的影响

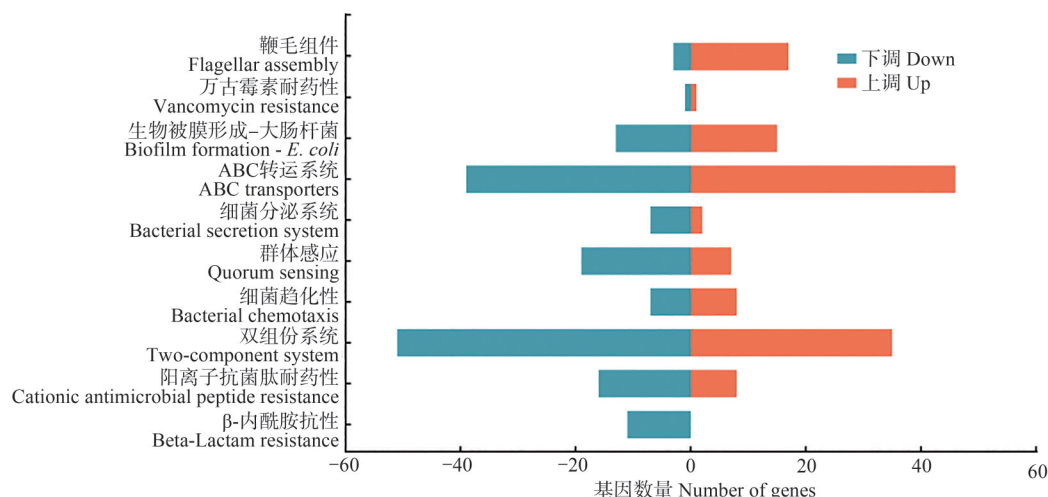
Fig. 5 Effect of 1,10-PHEN on metabolic pathways in *E. coli*

图 6 邻菲罗啉对大肠杆菌环境应答通路的影响

Fig. 6 Effect of 1,10-PHEN on response to environment pathways in *E. coli*

了 qPCR 验证。结果如图 8 所示,在邻菲罗啉处理组中, *degP*、*ldtC*、*ompW*、*hybA* 和 *frdC* 共 5 个基因表达下调, *flgB*、*marA*、*flu* 和 *entF* 共 4 个基因表达上调, qPCR 验证结果与 RNA-seq 分析结果一致。由此说明, qPCR 和 RNA-seq 分析之间的相关性及其基因表达的真实性。

3 讨论

大肠杆菌可引起胃肠道感染、食物中毒、伤口细菌性感染、褥疮以及阑尾炎或憩室炎,在治疗过程中易产生耐药性,耐药谱广,耐药机制复杂,解决细菌耐药性的关键在于新型抗菌药物的筛选和研发。邻菲罗啉是一种金属螯合剂,通过干扰酶促反

应中关键金属的获取和利用从而抑制胞外金属型肽酶活性。本研究表明,邻菲罗啉对大肠杆菌具有显著的抗菌活性,当浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 可完全抑制细菌生长, 50 $\mu\text{mol/L}$ 可显著抑制细菌生物被膜形成。使用邻菲罗啉处理大肠杆菌后进行 RNA-seq,表明邻菲罗啉对大肠杆菌具有调控大肠杆菌代谢及耐药基因表达水平的作用。

细菌关键代谢途径三羧酸循环和电子传递链等途径产生多种代谢产物和能量供细菌生长所需^[16]。转录组结果显示,在邻菲罗啉的作用下大肠杆菌代谢过程中富马酸代谢(如 *cit*、*frd* 和 *nar*)及细菌厌氧生长过程中的相关基因(如 *hmp*)表达上调,因此推测邻菲罗啉使大肠杆菌的三羧酸循环过程

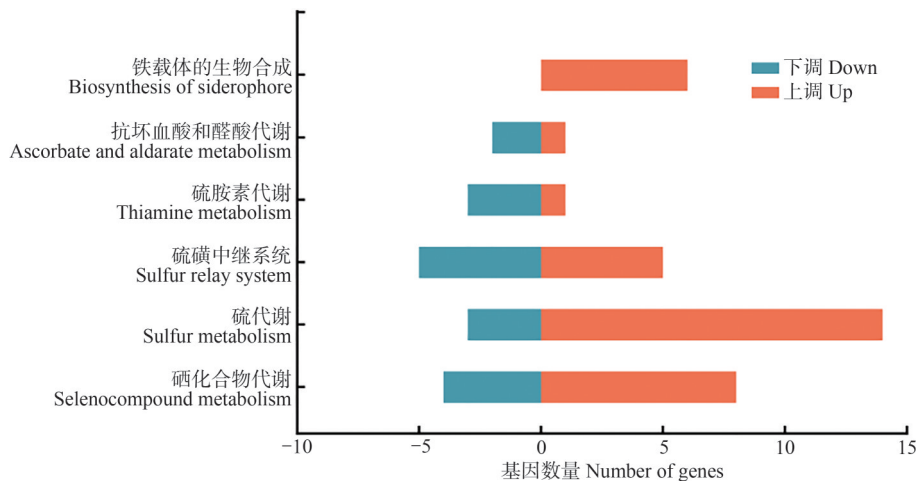
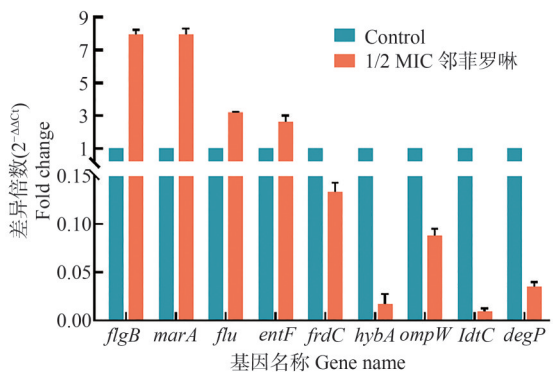


图7 邻菲罗啉对大肠杆菌铁载体通路的影响

Fig. 7 Effect of 1,10-PHEN on ironophore pathways in *E. coli*



2^{-ΔΔCt} < 1 表示基因表达下调, 2^{-ΔΔCt} > 1 表示基因表达上调。
2^{-ΔΔCt} < 1 indicated down-regulated gene expression, 2^{-ΔΔCt} > 1 indicated up-regulated gene expression。

图8 差异表达基因的qPCR验证分析

Fig. 8 qPCR validation analysis of differentially expressed genes

及电子传递链受到影响,进而发生呼吸抑制。富马酸作为氧化剂在生物合成和氧化还原平衡中具有关键作用,是肠杆菌在厌氧生长过程中的关键底物,富马酸代谢过程相关基因如 *citT* 基因主要负责柠檬酸盐的摄取与琥珀酸盐、富马酸盐或酒石酸盐的外排交换,可影响细菌三羧酸循环过程及ATP形成和能量供应^[17-19];富马酸还原酶操纵子(FRD)可以有效地催化还原反应,并允许富马酸在厌氧生长中作为电子受体发挥作用^[20]。此外,大肠杆菌 *nar* 基因可编码硝酸盐还原酶复合物允许细菌在厌氧生长过程中使用硝酸盐作为电子受体, *hmp* 基因在有氧过程中参与NO解毒。这些基因表达上调均可说明邻菲罗啉影响大肠杆菌对氧的摄取,导致细菌生长所需能量供应不足,同时,在有氧呼吸过程中产

生有毒自由基,抑制其生长。

氨基酸的代谢是逆转耐药性的一种策略,如丙氨酸氨基肽酶PepN是大肠杆菌唯一不依赖ATP降解胞质蛋白的肽酶,可能是抵抗细菌感染的有效靶点^[21-22]。转录组结果显示,邻菲罗啉使大肠杆菌氨基酸代谢相关的基因显著上调, *fabI*、*frdD*、*marR* 和 *acrR* 等基因与β内酰胺酶、多药外排泵系统和膜通透性的转录调节相关基因发生显著下调^[23]。表明邻菲罗啉可能促进大肠杆菌对β内酰胺类抗生素、氨基糖苷类抗生素、其他小分子抑制剂转运和敏感性,具有协同抗菌作用。本研究发现,邻菲罗啉可抑制大肠杆菌生物被膜的形成,且邻菲罗啉处理组可在扫描电镜下观察到细胞膜及细胞壁破坏严重,转录组结果也显示,与生物被膜形成相关基因发生表达下调,如可以抑制细菌的运动以减少生物被膜形成的 *gcvA* 基因,在革兰氏阴性菌生物被膜形成、黏附、应激耐受方面发挥了重要作用的 *ompW* 基因^[24-25]。同时,大肠杆菌在邻菲罗啉的刺激下,其双组份系统通路的正调控基因也均发生了下调。生物被膜可影响细菌对抗生素的耐受性和对机体的免疫抗性,但生物被膜的形成依赖于细菌的群体感应通信系统,破坏生物被膜可阻断细菌通讯信号^[26]。双组份系统是细胞内重要的环境信号感受器,通过感受多种调节细胞的生命活动,抗生素抗性决定簇可作为质粒和整合素在病原体之间传播,导致耐药性分布于细菌种群中^[27]。以上结果均可说明,邻菲罗啉可降低大肠杆菌对环境的适应力及对抗生素的耐药性。

通过转录组分析可知,在邻菲罗啉的作用下使大肠杆菌铁硫簇蛋白形成相关基因与调节金属结合相关的基因均发生显著下调,参与细菌铁载体肠杆菌素合成的基因发生显著上调,表明大肠杆菌在邻菲罗啉刺激下发生铁限制并增强了细胞外铁螯合剂、络合铁中铁的摄取及外源性血红素铁的回收。铁是细菌生存所必需的营养素,细菌分泌铁载体,并在外膜上表达特异性转运蛋白,该蛋白负责摄取铁载体复合物,产生特定环境信号(如局部铁浓度)的毒力因子(如铁载体、大肠杆菌素和铁载体-微菌素),使大肠杆菌能够适应肠道和/或血液的竞争环境^[28]。其中肠杆菌素可被用于传递分子的载体,增强革兰氏阴性菌外膜通透性,运送小分子物质到大肠杆菌细胞质,影响细菌毒力,也可杀灭无法分泌特异性肠杆菌素免疫蛋白的近缘细菌,有调节菌群数量的作用^[29-30]。邻菲罗啉有较强的金属螯合作用,可与金属离子形成稳定配合物。因此,推测邻菲罗啉通过降低环境及大肠杆菌内铁离子的浓度,减少细菌铁离子摄入及利用,造成细菌铁死亡,同时促进大肠杆菌铁载体肠杆菌素的生物合成,提高细菌对抗生素的运输效率,增强大肠杆菌对邻菲罗啉的敏感性。

4 结 论

邻菲罗啉对大肠杆菌具有显著的抑制作用,可能通过螯合金属离子并形成稳定的螯合物,影响环境及大肠杆菌内铁离子的摄入及利用而抑制大肠杆菌生长;同时,邻菲罗啉可能刺激大肠杆菌在有氧呼吸过程中产生有毒自由基,对细菌产生毒性从而发挥抗菌作用。本研究为寻找抗生素替代药物提供新思路。

参考文献 References

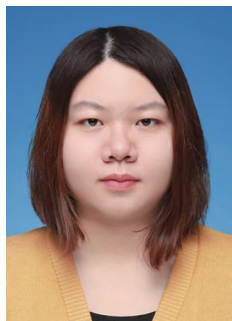
- [1] Zhang X F, Doi Y, Huang X, Li H Y, Zhong L L, Zeng K J, Zhang Y F, Patil S, Tian G B. Possible transmission of mcr-1-harboring *Escherichia coli* between companion animals and human[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(9): 1679-1681
- [2] Pakbin B, Brück B M, Rossen J W A. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(18): 9922
- [3] 潘航,李肖梁,方维焕,乐敏. 美国近20年主要食源性致病菌的分布及耐药性分析:对我国细菌耐药性监控工作的启示[J]. *浙江大学学报:农业与生命科学版*, 2018, 44(2): 237-246
Pan H, Li X L, Fang W H, Yue M. Analysis of major human and

foodborne pathogens and their resistance to antimicrobials in the USA in the past two decades: Implications for surveillance and control of antimicrobial[J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences*, 2018, 44(2): 237-246 (in Chinese)

- [4] Zhang S Q, Abbas M, Rehman M U, Wang M S, Jia R Y, Chen S, Liu M F, Zhu D K, Zhao X X, Gao Q, Tian B, Cheng A C. Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 799: 149280
- [5] Abavisani M, Bostanghadiri N, Ghahramanpour H, Kodori M, Akrami F, Fathizadeh H, Hashemi A, Rastegari-Pouyani M. Colistin resistance mechanisms in Gram-negative bacteria: A Focus on *Escherichia coli*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2023, 76(2): ova023
- [6] Nadar S, Khan T, Patching S G, Omri A. Development of antibiofilm therapeutics strategies to overcome antimicrobial drug resistance [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 303
- [7] Case H B, Mattock D S, Miller B R, 3rd, Dickenson N E. Novel noncompetitive type three secretion system ATPase inhibitors shut down *Shigella* effector secretion[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(28): 2667-2678
- [8] Lv C, Li Y, Wei Y X, Wang J Y, Yu H, Gao F, Zhu C, Jia X D, Tong M Q, Dong P X, Gao Q Q, Geng L L. Research progress on small molecular inhibitors of the type 3 secretion system[J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8348
- [9] Lobana T S, Indoria S, Sood H, Arora D S, Kaur M, Jasinski J P. Synthesis of (3-nitro-2-oxo-benzaldehyde thiosemicarbazonato)-zinc (II) complexes: The position of nitro group in phenyl ring alters antimicrobial activity against *K. pneumoniae* 1, *S. typhimurium* 2, MRSA and *C. albicans*[J]. *Dalton transactions*, 2021, 50(20): 6823-6833
- [10] Falkievich D B, Martinez Medina J J, Alegre W S, López Tévez L L, Franca C A, Ferrer E G, Williams P A M. Computational studies, antimicrobial activity, inhibition of biofilm production, and safety profile of the cadmium complex of 1,10-phenanthroline and cyanoguanidine[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2022, 36(6): e6695
- [11] McCann M, Kellett A, Kavanagh K, Devereux M, Santos A L S. Deciphering the antimicrobial activity of phenanthroline chelators [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(17): 2703-2714
- [12] Coulibaly S, Cimino M, Ouattara M, Lecoutey C, Buchieri M V, Alonso-Rodriguez N, Briffotiaux J, Mornico D, Gicquel B, Rochais C, Dallemagne P. Phenanthroline analogs of quinolones show antibacterial activity against *M. tuberculosis* [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 207: 112821
- [13] 李二卫. 食品卫生微生物学检验菌落总数测定方法的探讨[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(8): 1940-1941
Li E W. Three kinds of food colony of the total number of testing methods [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2010, 20(8): 1940-1941 (in Chinese)
- [14] 金虹,李海帅,帖金凤,韩杰,苏裕心. 应用微量稀释法测定消毒剂最小抑菌浓度方法的建立[J]. *中国消毒学杂志*, 2018, 35(11): 801-804, 808
Jin H, Li H S, Tie J F, Han J, Su Y X. Establishment of a broth microdilution MIC testing method for disinfectants[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2018, 35(11): 801-804, 808 (in Chinese)
- [15] 刘洪蕾,甄思慧,王家伟,程如楠,岳亮,王真. 转录调节因子DeoT对大肠埃希氏菌多重耐药性的影响[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(12): 38-43
Liu H L, Zhen S H, Wang J W, Cheng R N, Yue L, Wang Z. Effect of transcriptional regulator DeoT on *Escherichia coli* multi-drug resistance [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(12): 38-43 (in Chinese)
- [16] Stokes J M, Lopatkin A J, Lobritz M A, Cillins J J. Bacterial metabolism

- and antibiotic efficacy[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 30(2): 251-259
- [17] Christopher S, Gottfried U. Fumarate, a central electron acceptor for Enterobacteriaceae beyond fumarate respiration and energy conservation [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2023, 82: 267-299
- [18] Bott M, Dimroth P. Klebsiella pneumoniae genes for citrate lyase and citrate lyase ligase: Localization, sequencing, and expression [J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 14(2): 347-356
- [19] Takahashi S, Miyachi M, Tamaki H, Suzuki H. The *Escherichia coli* CitT transporter can be used as a succinate exporter for succinate production [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2021, 85(4): 981-988
- [20] Kim J S, Cho D H, Heo P, Jung S C, Park M, Oh E J, Sung J, Kim P J, Lee S C, Lee D H, Lee S, Lee C H, Shin D, Jin Y S, Kweon D H. Fumarate-mediated persistence of *Escherichia coli* against antibiotics [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(4): 2232-2240
- [21] 黄璐璐, 谷宇锋, 吴翠蓉, 黄俊红, 程古月. 细菌的应激反应和生理代谢与耐药性及其控制策略 [J]. *生物工程学报*, 2020, 36(11): 2287-2297
- Huang L L, Gu Y F, Wu C R, Huang J H, Cheng G Y. Bacterial stress response, physiological metabolism and antimicrobial tolerance and the control strategies [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(11): 2287-2297 (in Chinese)
- [22] Valverde-Pozo J, Paredes J M, Salto-Giron C, Herrero-Foncubierta P, Giron M D, Miguel D, Cuerva J M, Alvarez-Pez J M, Salto R, Talavera E M. Detection by fluorescence microscopy of N-aminopeptidases in bacteria using an ICT sensor with multiphoton excitation: Usefulness for super-resolution microscopy [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 321: 128487
- [23] Spencer M E, Guest J R. Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1973, 114(2): 563-570
- [24] Tang Q, Feng M L, Xia H, Zhao Y M, Hou B B, Ye J, Wu H Z, Zhang H Z. Differential quantitative proteomics reveals the functional difference of two *yigP* locus products, UbiJ and EsrE [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2019, 59: 1125-1133
- [25] Beketskaia M S, Bay D C, Turner R J. Outer membrane protein OmpW participates with small multidrug resistance protein member EmrE in quaternary cationic compound efflux [J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(10): 1908-1914
- [26] Mooney J A, Pridgen E M, Manasherob R, Suh G, Blackwell H E, Barron A E, Bollyky P L, Goodman S B, Amanatullah D F. Periprosthetic bacterial biofilm and quorum sensing [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2018, 36(9): 2331-2339
- [27] Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria and clinical pathogens [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2928
- [28] Tonziello G, Caraffa E, Pinchera B, Granata G, Petrosillo N. Present and future of siderophore-based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases [J]. *Infectious Disease Reports*, 2019, 11(2): 8208
- [29] Zheng T F, Bullock J L, Nolan E M. Siderophore-mediated cargo delivery to the cytoplasm of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: Syntheses of monofunctionalized enterobactin scaffolds and evaluation of enterobactin-cargo conjugate uptake [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(44): 18388-18400
- [30] Barraza D E, Rios Colombo N S, Galván A E, Acuna L, Minahk C J, Bellomio A, Chalón M C. New insights into enterocin CRL35: Mechanism of action and immunity revealed by heterologous expression in *Escherichia coli* [J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(6): 922-933

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 王瑜,农学学士学位,北京农学院动物科学技术学院在读硕士研究生,研究方向为病原菌防治技术研究。在读期间学习认真刻苦,获得2次一等学业奖学金和二等禾丰企业奖学金,共参与发表7篇文章,以第一作者发表中文核心期刊论文1篇,参加第八届中国国际“互联网+”大学生创新创业大赛获北京赛区复赛三等奖。积极参加专业相关实习,实习期参与完成多项动物疫病胶体金免疫层析试纸条的研发项目。



通讯作者简介: 王真,博士,北京农学院动物科学技术学院副教授,硕士研究生导师。2018年入选北京市高层次创新创业人才支持计划青年拔尖人才,2019年入选北京市属高校高水平教师队伍建设支持计划青年拔尖人才培养计划。指导本科生和研究生参加中国国际“互联网+”大学生创新创业大赛、首都“挑战杯”、全国大学生生命科学竞赛、北京市大学生生物学竞赛等获得国赛铜奖、北京赛区一等奖和三等奖多项。长期从事动物疫病防控技术开发和病原菌致病机制研究。主持完成国家自然科学基金青年基金、大北农青年基金、北京市教委科技项目等;现主持北京市优秀人才培养资助项目、北京市教委青年拔尖人才项目、横向合作等6项课题。以第一作者和通讯作者发表研究论文30余篇,其中SCI论文15篇,单篇影响因子最高9.04;授权国家发明专利3项;编著《动物病原菌检测技术指南》1部。