

# 大肠杆菌银离子耐受性机制研究进展

吴钰煌<sup>1,2#</sup>, 郑锡<sup>1,2#</sup>, 安皓月<sup>1,2</sup>, 沈舒楚<sup>1,2</sup>, 伍中宝<sup>1,2</sup>, 周素<sup>1,2</sup>, 王君<sup>3,4</sup>, 邹黎黎<sup>1,2\*</sup>

1 三峡大学 基础医学院 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2 三峡大学 基础医学院 宜昌市感染与炎症损伤重点实验室, 湖北 宜昌 443002

3 宜昌市第二人民医院 湖北省老年胃肠癌精准防治临床医学研究中心, 湖北 宜昌 443000

4 三峡大学 国家中医药管理局中药药理科研三级实验室, 湖北 宜昌 443002

吴钰煌, 郑锡, 安皓月, 沈舒楚, 伍中宝, 周素, 王君, 邹黎黎. 大肠杆菌银离子耐受性机制研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1252-1267.

WU Yuhuang, ZHENG Xi, AN Haoyue, SHEN Shuchu, WU Zhongbao, ZHOU Su, WANG Jun, ZOU Lili. Research progress in silver ion tolerance mechanisms of *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1252-1267.

**摘 要:** 含银敷料、镀银涂层等医疗耗材与器械在临床治疗中的广泛应用, 以及畜牧业饲料中抗菌剂和重金属剂的大量使用, 增加了致病以及环境大肠杆菌对银离子的获得性耐受。为系统性了解大肠杆菌银离子耐受性机制, 本文综述了大肠杆菌银离子耐受的复杂调控网络和多种生理机制, 即调节外膜孔蛋白、能量代谢调节、外排系统的作用、运动性调节以及银离子还原能力。大肠杆菌通过缺失或突变外膜孔蛋白如 OmpR、OmpC、OmpF 等来减少银离子的内流; 在高浓度银离子胁迫下, 通过内源性的 Cus 系统和外源性的 Sil 系统提高银离子的外排能力; 通过调节 ArcA/B 蛋白的表达来适应更高浓度的银离子环境。细菌的运动性也与银的耐受能力相关。此外, 大肠杆菌还具还原银离子的能力, 可降低银离子诱导的氧化应激。本文为理解细菌银离子耐受性的形成和传播提供了新的视角, 并对下一代银基抗菌药物和疗法开发进行了展望。

**关键词:** 大肠杆菌; 银离子; 耐受机制; 抗菌策略; 耐药性

资助项目: 国家自然科学基金(32170191); 三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室 2023 年度开放基金(2023PTCM07)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170191) and the Third Level Laboratory of TCM Pharmacological Research, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University 2023 Open Fund (2023PTCM07).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: zoulili@ctgu.edu.cn

Received: 2024-10-21; Accepted: 2025-02-05; Published online: 2025-02-06

## Research progress in silver ion tolerance mechanisms of *Escherichia coli*

WU Yuhuang<sup>1,2#</sup>, ZHENG Xi<sup>1,2#</sup>, AN Haoyue<sup>1,2</sup>, SHEN Shuchu<sup>1,2</sup>, WU Zhongbao<sup>1,2</sup>, ZHOU Su<sup>1,2</sup>,  
WANG Jun<sup>3,4</sup>, ZOU Lili<sup>1,2\*</sup>

1 Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

2 Yichang Key Laboratory of Infection and Inflammation, College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

3 Hubei Provincial Clinical Research Center for Precise Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer in the Elderly, the Second People's Hospital of Yichang, Yichang 443000, Hubei, China

4 Third-grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

**Abstract:** Due to the wide application of silver-containing dressings and silver-coated medical devices in clinical treatment; the extensive use of antibacterial agents and heavy metal agents in feed factories, *Escherichia coli* has formed the tolerance to silver ions. To systematically understand the known silver ion resistance mechanisms of *E. coli*, this article reviews the complex regulatory network and various physiological mechanisms of silver ion tolerance in *E. coli*, including the regulation of outer membrane porins, energy metabolism modulation, the role of efflux systems, motility regulation, and silver ion reduction. *E. coli* reduces the influx of silver ions by missing or mutating outer membrane porins such as OmpR, OmpC, and OmpF. It adapts to high concentrations of silver ions by altering the expression of ArcA/B and enhances the efflux capacity of silver ions under high-concentration silver stress via the endogenous Cus system and exogenous Sil system. Furthermore, the motility of bacteria is related to silver tolerance. *E. coli* has the ability to reduce silver ions, thereby alleviating the oxidative stress induced by silver ions. These findings provide a new perspective for understanding the formation and spread of bacterial tolerance and provide directions for the development of next-generation silver-based antimicrobials and therapies.

**Keywords:** *Escherichia coli*; silver ions; tolerance mechanism; antibacterial strategy; drug resistance

细菌感染对人类造成的威胁持续存在, 开发新型抗菌药物与提高传统抗生素疗效已成为全球公共卫生领域的研究重点。银是一种天然金属矿物, 因其得天独厚的药石特性被人类应用于细菌感染的治疗<sup>[1]</sup>。随着研究的不断深入, 研究者逐渐阐明银是以银离子的形式发挥氧化应激、破坏细菌的胞膜和胞壁结构、抑制蛋白功能和能量代谢等抗菌作用<sup>[1]</sup>(图 1)。基于银的抗菌特性, 纳米银、磺胺嘧啶银、硝酸银等各种形式的银基化合物陆续被用于抗微生物感

染<sup>[2-4]</sup>。其中, 银离子主要产生以氧化应激为主的抗菌作用; 而纳米银尽管也被普遍认为是通过释放银离子的方式来抑制细菌活性, 但也有部分研究认为氧化应激并非其主要作用机制<sup>[5]</sup>。

相较于抗生素, 银离子在抗细菌感染过程中的耐药性问题尚未得到充分重视<sup>[1]</sup>。目前, 已在多种细菌中发现银离子耐受机制, 包括葡萄球菌属<sup>[6]</sup>、沙门氏菌属<sup>[7]</sup>、克雷伯氏菌属<sup>[8]</sup>、不动杆菌属<sup>[9]</sup>、肠杆菌属<sup>[10]</sup>等。尤其是在大肠杆菌中, 已有报道证实其发展出了具有遗传倾

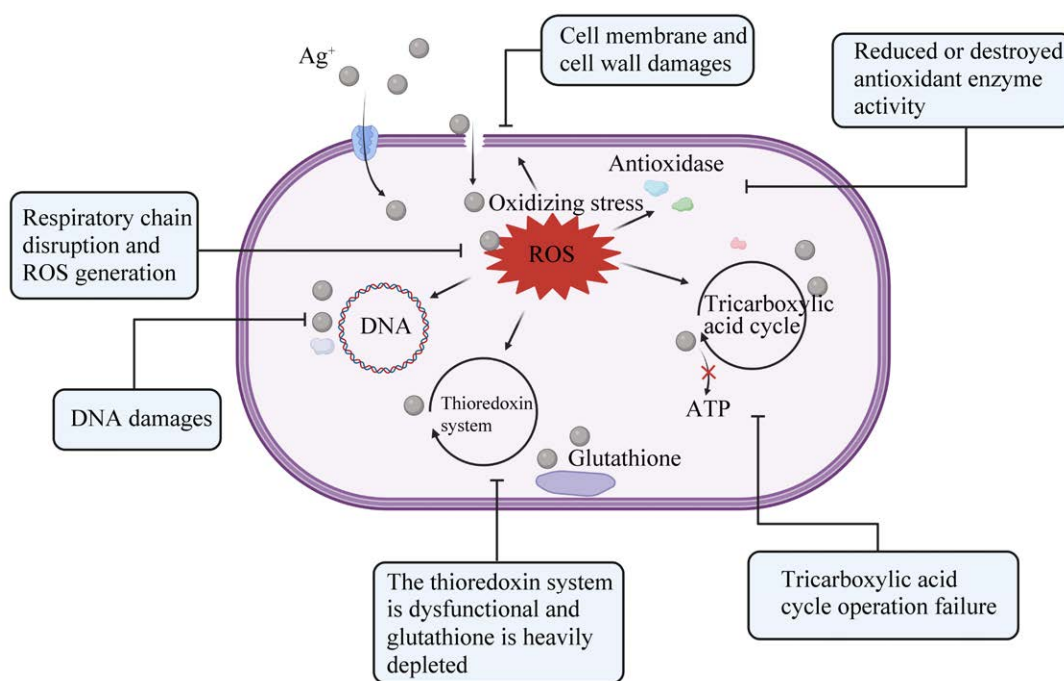


图1 银离子的抗菌机制

Figure 1 Antibacterial mechanism of silver ion. ROS: Reactive oxygen species.

向的银离子耐受能力<sup>[5]</sup>。包括在低浓度银离子时,大肠杆菌通过缺失/突变外膜孔蛋白(outermembrane porin, OMP) OmpR、OmpC、OmpF等来调节胞内外渗透以防止银离子入胞<sup>[11]</sup>;当银离子浓度升高,银离子外排系统的启动和能量代谢蛋白 ArcA/B 的表达水平改变是大肠杆菌主要的适应手段<sup>[11]</sup>。另外最新研究发现,细菌的运动性也与银离子的耐受能力相关<sup>[12]</sup>。

目前具有银离子耐受性的大肠杆菌常见于烧伤治疗患者和金属污染环境中,相关研究仍处于起步阶段。鉴于耐药性大肠杆菌导致的感染性疾病已给全球公共卫生带来了巨大的挑战,探索大肠杆菌耐受银离子的内在机制可为防控银离子耐受基因的传播提供新视角。虽然细菌对银离子的耐药机制尚未完全阐明,但已有研究表明,大肠杆菌可通过诱导银离子聚积和银离子还原、抑制银离子与细菌细胞的接触和入胞、细菌胞内银离子的外流及损伤修复

机制的激活来获得耐药性<sup>[1]</sup>;同时研究人员正在探索如何利用现有的信息,建立包括“特洛伊木马”伪装、使用外排泵抑制剂、配合“扫雷”等策略来开发下一代银基抗菌药物和疗法<sup>[1]</sup>。本文通过对大肠杆菌银离子耐受机制的全面总结,以期对相关研究人员开展科研活动提供参考。

## 1 胞外阻隔机制

### 1.1 外膜屏障

#### 1.1.1 银离子入胞

革兰氏阴性菌的细胞膜结构由外膜(outermembrane, OM)和质膜(plasma membrane, PM)组成。OM 被携带高负电荷的脂多糖覆盖,允许带电的小分子通过孔蛋白进入周质,而 PM 对无机离子和亲水性化合物不具有渗透性<sup>[13]</sup>。由于呼吸链、脂质生物合成、蛋白分泌和运输等重要膜相关功能都在 PM 中进行,因此其对细菌生存至关重要<sup>[13]</sup>。

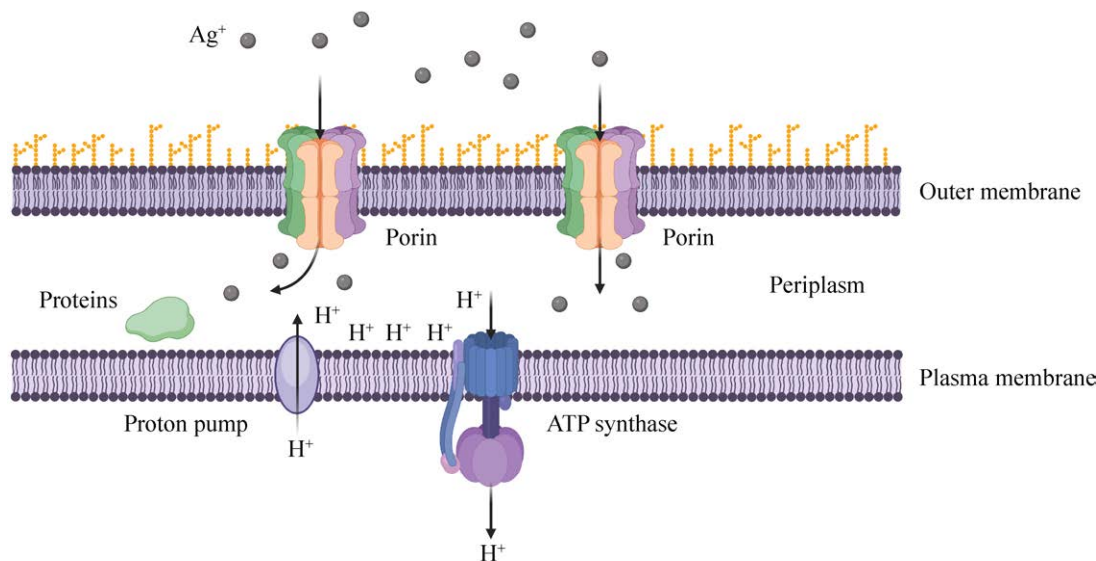
为达到有效的抗菌效果,银离子必须越过细菌的胞膜结构。传统的研究认为,因为静电作用,带正电荷的银离子可吸附于带负电荷的细胞膜表面;同时,银离子也能与细胞膜上的巯基结合<sup>[1]</sup>。而 Bondarenko 等<sup>[14]</sup>在其研究中为银离子的靶向入胞作出了较好的解释,即银离子/纳米银在不破坏 OM 的前提下,穿过 OM 靶向 PM,作用于 PM 上的酶的巯基,使 PM 去极化及胞内钾离子外流。这个结果在一定程度上支持了低浓度的银离子通过 OMP 入胞的猜想(图 2)。

综上,阻滞银离子入胞可能是大肠杆菌提升银离子耐受的重要方式之一。一些研究也发现,银离子耐受性大肠杆菌的外膜孔蛋白 OmpR、OmpC、OmpF 发生了相应的改变,OmpC 和 OmpF 作为 OMP 的组成成员,在银离子的胁迫下表达显著下调,甚至发生基因缺失<sup>[5]</sup>。结

合 Bondarenko 等<sup>[14]</sup>的研究结果以及细菌的银离子耐受性反应,推测银离子可能通过 OMP 透膜的方式来入胞,但仍需进一步实验验证。现有的国内外研究均表明 OMP 的缺失是大肠杆菌阻滞银离子入胞的重要手段<sup>[5,11]</sup>。

### 1.1.2 OmpR 调控

OmpR (图 3A)在低渗透压下激活 *ompF* 的转录;而在高渗透压下,激活 *ompC* 的转录并抑制 *ompF* 的表达<sup>[15]</sup>。OmpR 蛋白的 138–233 残基被认为与银离子耐受性密切相关<sup>[11]</sup>。在大肠杆菌 BW25113 菌株中,当 *ompR* 发生 R199H、Q204P 错义突变时,与  $\Delta ompR$  一样,都会导致 *ompC* 和 *ompF* 不表达而产生银离子耐受性<sup>[11]</sup>。此外,研究还发现,OmpR 突变时,Cus/Sil 外排系统也常常高表达<sup>[11]</sup>。综上,*ompF* 和 *ompC* 基因的突变/缺失是提高大肠杆菌银离子耐受能力的关键。



**图 2 OMP 转运银离子的方式** 银离子通过阳离子选择性 OMP 进入周质。进入周质的银离子作用于 PM 上的酶的巯基,使 PM 去极化及胞内钾离子外流。

Figure 2 The way OMP transports silver ions. Silver ions enter periplasm through cation-selective OMP. The silver ions enter the periplasms act on the sulfhydryl group of the enzyme on PM, causing PM depolarization and intracellular potassium ion outflow.

### 1.1.3 OmpCF 缺失

OmpC 和 OmpF 具有相似的空间结构(图 3B、3C), 包含 1 个大的  $\beta$ -桶状结构。本课题组前期研究<sup>[16]</sup>观察到,  $\Delta ompC$  阻滞银离子入胞的能力优于  $\Delta ompF$ , 说明 OmpC 是银离子的主要入胞通道。但正常情况下鉴于环境中银离子的浓度差异变化, 大肠杆菌常常选择以同时缺失 *ompC* 和 *ompF* 的保守方式来抵抗银离子的入侵<sup>[11]</sup>。Kędziora 等<sup>[17]</sup>在研究中发现, OmpC 和 OmpF 特定氨基酸残基的侧链具有与银离子形成配位键的官能团, 部分带负电的残基与银离子可发生电荷间的相互作用; 同时通道内存在的 2 种不同区域: 富含氧的区域(更有效)和富含氮的区域(较无效)也影响着银离子的传输路径和效率。因而, 面对银离子的胁迫, OmpC 和 OmpF 共同突变对大肠杆菌而言更为必要。

## 1.2 细菌运动性

细菌运动性赋予了细菌从恶劣环境中逃脱并寻找更有利生存环境的能力, 而这种能力主要依赖于鞭毛、菌毛等辅助结构。研究认为鞭毛能够吸附少部分的银离子来阻滞其入胞<sup>[18]</sup>, 也有研究发现编码鞭毛的 RNA 聚合酶  $\sigma$  因子 *fliA* 基因在银离子胁迫下表达下调<sup>[19]</sup>。

Stabryla 等<sup>[12]</sup>的研究发现, 在亚抑制浓度银离子作用下, 高运动性的大肠杆菌具备了较强

的耐受能力, 而低运动性的细菌并未表现出耐受性; 进一步通过敲除鞭毛调节因子 *flhD* 操纵子, 验证了该表型。另外, 有研究表明 OmpR 可负向调控 *flhD* 的表达<sup>[20-21]</sup>。因此存在一种可能, 即银离子诱导 OmpR 表达量降低, 会导致 *flhD* 表达量升高, 从而增加细菌的运动性, 最终增加细菌对银离子的抵抗能力<sup>[20-22]</sup>。

此外, Stabryla 等<sup>[12]</sup>的研究还发现, 在高运动性大肠杆菌中, *cusS* 发生了永久性突变, 表明银离子外排增加可能是其对银离子耐受的主要机制, 因此高运动性和 *cusS* 突变两者叠加作用会赋予细菌更强的耐银离子能力。随后, 2023 年 Russell 等<sup>[23]</sup>发现在银离子胁迫的环境中, 细菌运动速度减慢 70% 以上, 翻滚/暂停频率增高了 77%, 原因是细菌的鞭毛马达的旋转被抑制。这可能是细菌为了持续抵御银离子的胁迫, 不得已采取的“节能”防御措施。另有研究发现, 细菌鞭毛会通过促进银纳米颗粒的聚集来逃逸银纳米颗粒的杀伤作用, 这一作用机制仅与鞭毛蛋白的表达相关, 并不涉及基因突变<sup>[18]</sup>。

大肠杆菌鞭毛通过不同的机制来抵抗环境中银离子的胁迫压力。高运动性使得大肠杆菌具有逃离银离子环境的能力, 当无法逃离时可通过表达黏性鞭毛蛋白促使银离子黏附聚集, 甚至启动“节能”防御措施, 降低鞭毛蛋白表达。

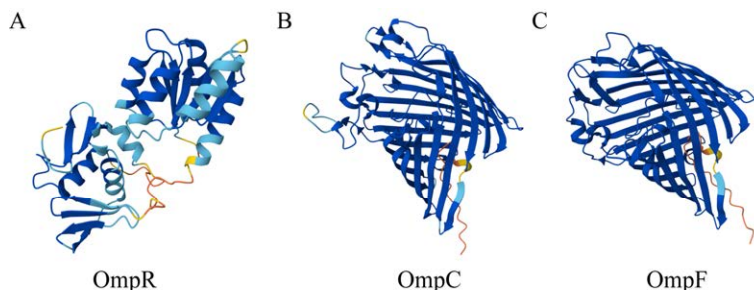


图 3 OmpR、OmpC、OmpF 三维结构模拟示意图 A: OmpR 三维结构; B: OmpC 三维结构; C: OmpF 三维结构。

Figure 3 The three-dimensional structure of OmpR, OmpC and OmpF. A: Three-dimensional structure of OmpR; B: Three-dimensional structure of OmpC; C: Three-dimensional structure of OmpF.

### 1.3 银离子还原

银离子介导的氧化应激是其产生抗菌效应的主要机制,氧化损伤的程度亦随着银离子浓度的增高而加重<sup>[1]</sup>。为避免不利因素的影响并提高自身适应银离子环境的能力,大肠杆菌也相应发展出了将胞外银离子还原的能力。

Li 等<sup>[24]</sup>的研究发现,大肠杆菌所分泌的胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)可将银离子还原,并转化为纳米银颗粒。而对于一些具有独特光化学特性的 EPS,光的照射增加了其对银离子的还原效率;其机制是 EPS 中的还原官能团充当了电子供体,光的作用导致电子向银离子转移<sup>[25]</sup>。另外, EPS 也可被光激活,产生具有还原性的物质(如超氧化物),对银离子具有一定的还原作用<sup>[26-27]</sup>。

绿脓菌素是可将银离子还原的另一种分泌物,研究中发现它可辅助大肠杆菌还原银离子<sup>[28]</sup>,研究结果显示,10  $\mu\text{mol/L}$  绿脓菌素能够使原本对 60  $\mu\text{mol/L}$  硝酸银敏感的大肠杆菌正常生长。原因是绿脓菌素通过电子穿梭,将银离子作为末端电子受体<sup>[6]</sup>,使银离子被还原。另外,大肠杆菌还依赖于分泌还原性物质来应对胞外银离子胁迫,且该机制可单独发挥作用,无须与其他银离子耐受机制协同<sup>[6]</sup>。但除了 EPS 和绿脓菌素之外,大肠杆菌是否还存在其他可将银离子还原的物质仍有待进一步探索。

## 2 胞内调节机制

### 2.1 外排泵

改变 OMP 表达只能起到阻滞胞外银离子入胞的作用,无法避免流入胞内的银离子所带来的负面影响。大肠杆菌还需依赖于其耐药-结瘤-细胞分裂(resistance-nodulation-cell division, RND)家族中的 Cus 和 Sil 外排泵来清除已经入胞的银离子(图 4)。

#### 2.1.1 内源性 Cus 系统外排银离子机制

1997 年,主导大肠杆菌银离子耐受的内源性 Cus 外排系统首次被发现,它由调控操纵子 CusRS 和结构操纵子 CusCFBA 组成<sup>[29]</sup>。从 OM 进入到细胞周质中的银离子一旦被 CusS 识别, CusR 则将接受 CusS 呈递的磷酸基团而被激活,随后启动下游 *cusCFBA* 的转录表达,促进银离子外排(图 4A)<sup>[29]</sup>。

CusS(图 5A)与银离子结合时,其周质结构域发生二聚化,同时激酶结构域的 H271 残基 N1 位点发生顺式自磷酸化,并激活 CusS<sup>[30-31]</sup>。CusS 对于率先识别周质中的银离子和启动银离子外排至关重要,本课题组前期通过敲除大肠杆菌 *cusS* 发现,与对照组相比,细菌对银离子表现出更高的敏感性<sup>[32]</sup>。Yamamoto 等<sup>[33]</sup>的研究也发现, *cusCFBA* 外排泵需要 *cusS* 的表达至少上调 2 倍才能输出过量的金属离子。大肠杆菌常常以突变的方式来提高 CusS 的表达(表 1),从而增强其对银离子的抵抗能力。

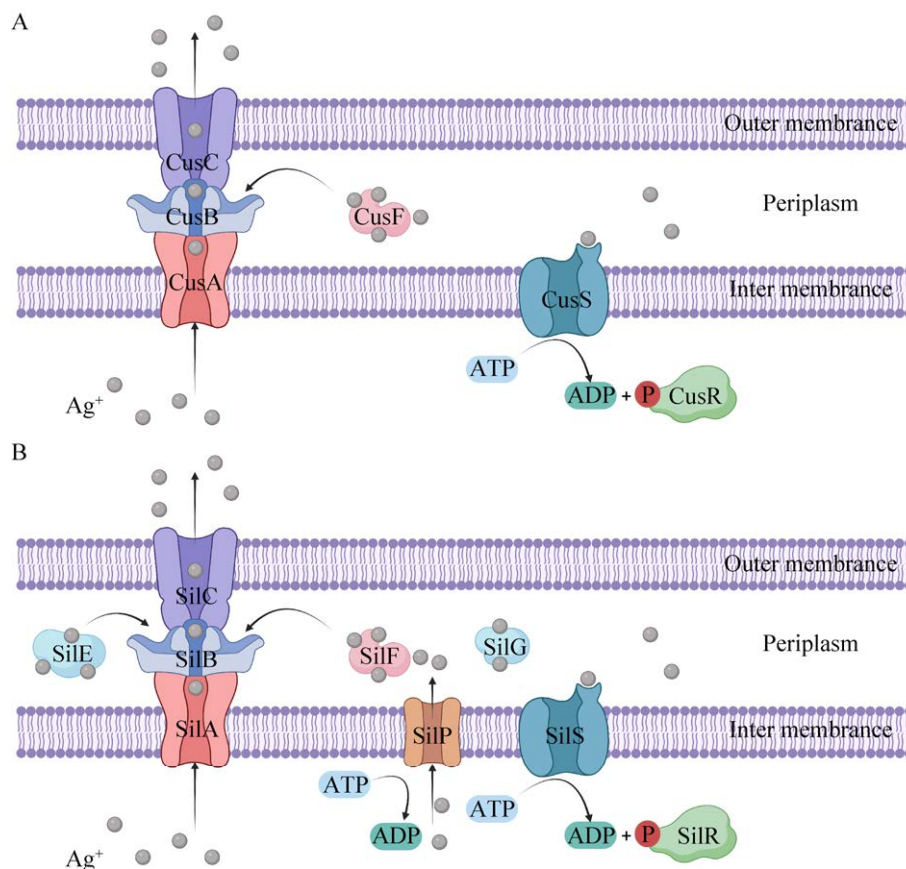
CusR(图 5B)的 D51 残基接受来自 CusS 的磷酸基团后,发生二聚化并紧密结合到 CusR 染色体上,以不同方式激活 *cusCFBA* 基因的转录<sup>[31,37]</sup>。

在形成的银离子外排通道 CusCBA 中,位于 PM 上的内膜蛋白 CusA 是泵出胞内银离子和提供源动力的第 1 个蛋白(图 5C),可表现出“结合”和“泵出”这 2 种状态; CusA 可结合来自周质和细胞质中的金属离子并运输到 CusBC<sup>[38]</sup>。CusB(图 5D)的 N 端结构域中, M49、M64 和 M66 形成了一个三蛋氨酸金属结合位点<sup>[39]</sup>,可将金属离子转移到 CusA 的周质裂隙或 CusC 通道中<sup>[40]</sup>。而 Bagai 等<sup>[39]</sup>的研究结果表明, CusB 的 M21、M36 和 M38 也可形成金属离子结合位点,不仅可与金属伴侣蛋白 CusF 进行金属转移,还赋予了 CusB 感应金属离子的能力<sup>[41]</sup>。基于该能力, CusB 能够在 *cusCFBA* 操纵子转

录激活之前快速启动 CusCBA 的动态组装；因为在无金属离子胁迫下，CusCBA 处于拆卸状态<sup>[41]</sup>。此外，与 CusS 相比，CusB 与周质中金属离子结合能力更强<sup>[41]</sup>，且结合了金属离子的 CusB (holo-CusB) 结构变得更加紧凑<sup>[42]</sup>，并负责激活 CusA 以促进金属离子外排<sup>[43]</sup>。CusC (图 5E) 被认为不具有金属离子结合位点<sup>[40]</sup>，其仅充

当了金属离子流通通道的角色。

周质中的金属伴侣蛋白 CusF (图 5F) 负责将周质中的金属离子收集并呈递给 CusB<sup>[43]</sup>。还原态的 CusF 能迅速结合金属离子，以此维持周质中过量金属离子的高转运效率，从而避免细菌被金属离子诱导的超氧化物损伤<sup>[44]</sup>。目前，内膜 ATP 酶 CopA 被发现可与 CusF 协同工



**图 4 Cus 和 Sil 外排泵主导的银离子耐受机制** A: Cus 外排泵主导的内源性银离子耐受机制。胞内银离子激活 CusS, CusS 自磷酸化后将磷酸基团呈递给 CusR, 并激活 CusR 与 DNA 结合, 启动 CusCFBA 转录, 促使银离子外排。B: Sil 外排泵主导的外源性银离子耐受机制。胞内银离子激活 SilS, 产生的磷酸基团与 SilR 结合后, 启动 SilCFBA 转录, 促使银离子外排。

**Figure 4 Cus and Sil efflux pump dominated silver ion tolerance mechanism.** A: Endogenous silver ion tolerance mechanism led by Cus efflux pump. Intracellular silver ions activate CusS, which present phosphoric acid groups to CusR after self-phosphorylation, activate CusR to bind to DNA, initiate CusCFBA transcription, and promote silver ion efflux. B: Endogenous silver ion tolerance mechanism led by Sil efflux pump. Intracellular silver ions activate SilS, which, after self-phosphorylation, present phosphoric acid groups to SilR, activate SilR to bind to DNA, initiate SilCFBA transcription, and promote silver ion efflux.

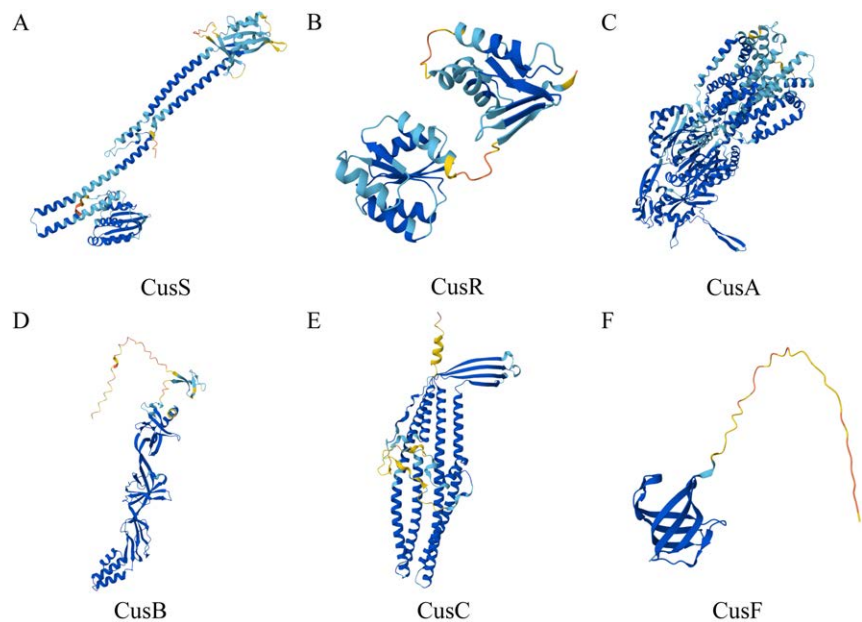


图 5 Cus 外排系统各组件三维结构模拟示意图 A: CusS 三维结构; B: CusR 三维结构; C: CusA 三维结构; D: CusB 三维结构; E: CusC 三维结构; F: CusF 三维结构。

Figure 5 The three-dimensional structure of components of Cus efflux system. A: Three-dimensional structure of CusS; B: Three-dimensional structure of CusR; C: Three-dimensional structure of CusA; D: Three-dimensional structure of CusB; E: Three-dimensional structure of CusC; F: Three-dimensional structure of CusF.

表 1 CusS 的重要突变位点及功能

Table 1 Important mutation sites and functions of CusS

| Mutation site                   | Function                                                            | References |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| T17P, I213S, A312E, R377H       | Promoting CusCFBA expression and improving tolerance to silver ions | [11]       |
| D435A, R438C                    | Improving silver ion tolerance                                      | [34]       |
| L12R, T14P, R15L, N279H         | Adapting to high concentrations of silver ion environment           | [35]       |
| R292L                           | Autophosphorylation of CusS and increasing efflux of silver ions    | [12]       |
| P209S                           | Improving silver ion tolerance                                      | [36]       |
| L9Q, L238Q, P273L, S309L, R374W | Adapting to the presence of silver ions                             | [8]        |

作，外排铜离子<sup>[45]</sup>；对于银离子，这 2 种蛋白是否也可发挥相同的作用则还需进一步探索。

综上所述，CusCFBA 构成了一个高效转运金属离子的互作模式，CusB 的金属感应能力为 CusCBA 外排通道的组建奠定了基础。CusA 为外排提供了动力，CusF 的存在缓解了周质中过量金属离子的负载，而 CusC 的“门户”作用保证了金属离子的顺利外排。

2.1.2 外源性 Sil 系统外排银离子机制

Sil 系统主导的外源性银离子耐受也是大

肠杆菌重要的银离子耐受机制<sup>[46]</sup>。相应的 sil 操纵子由 9 个基因组成，在阅读框中的顺序依次为 silE、silS、silR、silC、silF、silB、silA、silG 和 silP。SilCFBA (图 6A–6D)与 CusCFBA 具有超过 80%的同源性，SilRS (图 6E、6F)与 CusRS 在功能上也可一一对应<sup>[46]</sup>。因此，本文将不再赘述 Sil 系统外排银离子的机制，转而阐述 2 个系统的不同之处(图 4B)。与 CusCFBA 系统相比，Sil 系统还具有周质结合蛋白 SilE (图 6G)、P 型 ATP 酶家族的转运蛋白 SilP (图 6H)

和金属伴侣蛋白 SilG (图 6I)。其中 SilE 被认为是周质结合蛋白 PcoE 的同源物,被喻为周质中的一种固有无序的吸附金属离子的“分子海绵”,每个 SilE 最多可结合 8 个银离子<sup>[47]</sup>。Asiani 等<sup>[48]</sup>推测, SilE 可能还会与 SilS 发生结合,将启动银离子外排的信号传递给 SilS。最近的研究证明, SilE 更可能通过隔离周质中多余的银离子来避免银离子诱导的损害,使 SilF-银离子-SilB 复合物保持最佳的结合和互作状态<sup>[49]</sup>。

目前, SilP 和 SilG 的功能尚未阐明。研究

人员推测 SilP 可能通过其 ATPase 活性与 SilE、SilCFBA 等其他组分协同,参与银离子外排<sup>[50]</sup>。SilG 因与伴侣蛋白 CopG 具有同源性而被确定为金属伴侣蛋白,它的缺失并不影响大肠杆菌银离子耐受水平,目前推测它可能通过其金属结合特性,参与银离子的捕获和转移,分担周质中的金属离子压力<sup>[11]</sup>。

综上所述,相比于 Cus 外排系统, Sil 具有更复杂的组成结构,其可能在细菌耐银离子中起着重要作用。

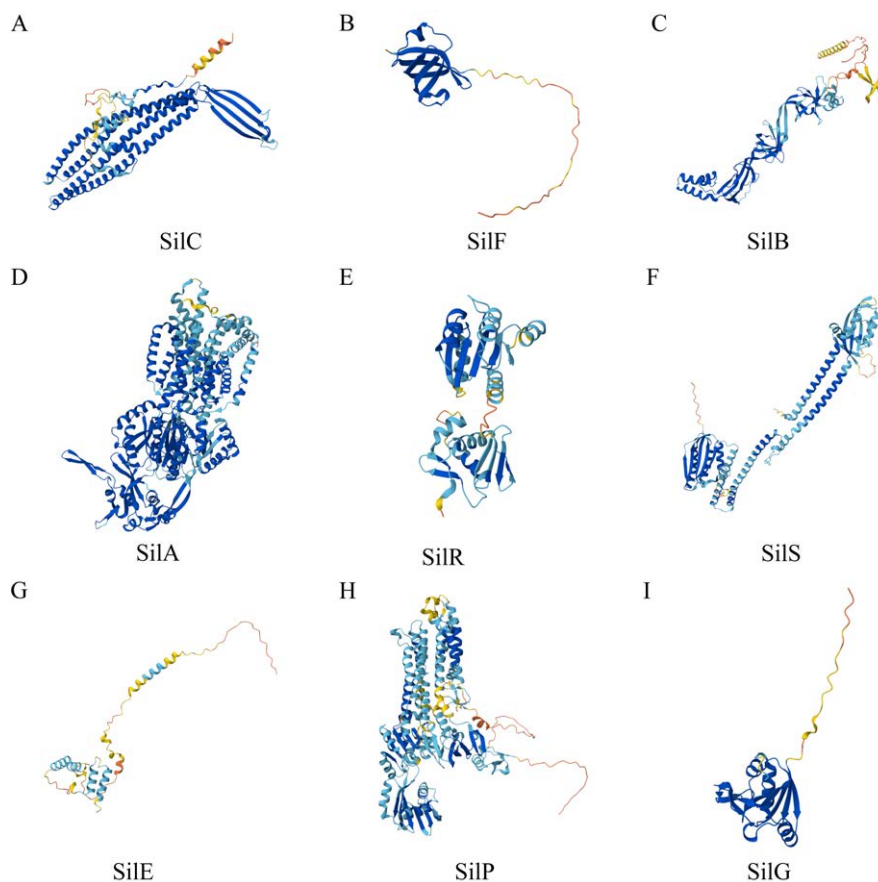


图 6 Sil 外排系统各组件三维结构模拟示意图 A: SilC 三维结构; B: SilF 三维结构; C: SilB 三维结构; D: SilA 三维结构; E: SilR 三维结构; F: SilS 三维结构; G: SilE 三维结构; H: SilP 三维结构; I: SilG 三维结构。

Figure 6 The three-dimensional structure of the components of the Sil efflux system. A: Three-dimensional structure of SilC; B: Three-dimensional structure of SilF; C: Three-dimensional structure of SilB; D: Three-dimensional structure of SilA; E: Three-dimensional structure of SilR; F: Three-dimensional structure of SilS; G: Three-dimensional structure of SilE; H: Three-dimensional structure of SilP; I: Three-dimensional structure of SilG.

## 2.2 能量代谢应对机制

银离子在进入胞内的过程中可能就启动了抗菌反应,大肠杆菌无法保证在银离子发挥作用前将其隔绝和外排,因此需要调整自身的代谢状态和适应性来应对胞内潜在的损害。

有 2 项研究发现,在银离子的诱导下,大肠杆菌通过突变全局调控因子 ArcA 来激活一系列与应激反应、能量代谢相关的基因表达以提高耐受能力和环境适应性;值得注意的是, ArcA 属于厌氧呼吸调控网络的重要调节因子,银离子对细菌细胞呼吸链和能量代谢的干扰使细菌无法维持正常的有氧呼吸而处于缺氧状态<sup>[5,51]</sup>。ArcA 通过激活硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶等与厌氧呼吸相关的编码基因,协助细菌通过硝酸盐呼吸来产生能量<sup>[51]</sup>,确保细菌在银离子环境下可维持正常的能量代谢,为细胞的外排银离子工作提供动力基础。银离子对细菌呼吸链和能量代谢具有显著影响,因此细菌可能并不简单地依赖单一的调控蛋白来抵御损伤。但目前该方面的研究并未深入,尽管已经有研究鉴定出了其他因银离子影响而异常表达的基因<sup>[5]</sup>,可尚未发现和深入研究能量代谢相关调控因子及其机制。

## 2.3 损伤修复和防御机制

由于银离子可诱导氧化应激促使细胞膜、蛋白质和 DNA 损伤。为此,大肠杆菌采取相应的损伤修复机制来保证各细胞组件正常运作,并通过分泌 EPS、形成生物膜等方式抵御银离子胁迫。

面对银离子诱导的高水平活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 氧化损伤,大肠杆菌也相应地激活抗氧化系统发挥防御作用。亚致死浓度的 ROS 即可激活抗氧化机制,而细菌通过上调 ROS 清除酶表达来加速 ROS 失活和损伤<sup>[52-53]</sup>。Dale 等<sup>[54]</sup>的研究表明,抗氧化机制受 OxyR 和 SoxR 的调节,它们分别响应过氧化

氢和超氧阴离子诱导的应激。当受到银离子胁迫时,细菌通过上调 *soxR*、*oxyR*、*sodA*、*sodB* 和 *sodC* 等基因来防止氧化应激,并产生超氧化物歧化酶将超氧化物降解为过氧化氢;其间 *katE* 和 *katG* 基因也相应地被上调,负责将过氧化氢转化为氧气<sup>[55]</sup>。当唯一的抗氧化系统失效,大肠杆菌将无法承受银离子的氧化压力<sup>[56]</sup>。面对银离子对 DNA 的损伤,大肠杆菌依赖于 *recA* 催化 DNA 链交换反应进行基因重组并对受损的 DNA 进行修复<sup>[57]</sup>。Xiu 等<sup>[56]</sup>的研究也发现,缺乏 *recA* 基因的大肠杆菌对银离子的敏感性增加,存活率降低。此外,在大肠杆菌中发现的 ATP 依赖性 Lon 蛋白酶可通过降解异常蛋白来控制蛋白质质量,以及特异性控制其他调节蛋白表达<sup>[58]</sup>。还有研究发现  $\Delta lon$  突变体缺乏修复受损蛋白质的能力,导致异常蛋白在胞内过度积累,使得大肠杆菌对银离子的敏感性显著增强,表明降解和修复受损蛋白的能力在细菌银离子耐受中也起着至关重要的作用<sup>[56]</sup>。同理,细胞膜修复亦是如此,缺乏 *fabR* (编码一种脂肪酸生物合成的调节因子) 的菌株,可能无法在银离子的胁迫下对细胞膜进行修复<sup>[56]</sup>。

此外, EPS 还可将溶解的银离子包绕形成银纳米颗粒,起到屏障保护作用;而一旦 *pgaB* 或 *wcaB* 缺失,将导致 EPS 合成受阻,使大肠杆菌对环境中银离子的敏感性增强<sup>[56]</sup>。同样,在非致死浓度银离子的作用下,大肠杆菌会通过增加 EPS 和生物膜多糖产生来促进生物膜的形成和发展,来抵抗银离子的损伤<sup>[1]</sup>。

综上,损伤修复机制、抗氧化应激、EPS 以及生物膜形成等防御策略是细菌积极响应银离子胁迫的有效抵御措施,它们维持了细胞的正常生物结构,保证了各细胞元件发挥正常的生理功能。但这些措施并非银离子耐受性细菌所特有,任何引起氧化应激损伤的药物都会触

发细菌的抗氧化应激机制。

### 3 总结

大肠杆菌通过复杂的调控机制来实现对银离子的耐受(图 7),其可能具备了感知胞外环境中银离子的能力,且一旦银离子达到可影响细菌生存的程度,细菌即会启动一系列银离子耐受性机制来调节自身以适应不利的环境;当胞内银离子被大量排出,胞外银离子无法对细胞造成有效损害,大肠杆菌才会减缓一系列银离子耐受活动。因此,细菌的运动性和分泌还原性物质是应对胞外环境银离子变化的首要防

线。具有还原性的分泌物使银离子被还原并失去相应的抗菌作用<sup>[24,28]</sup>。而高运动状态的细菌具备了脱离银离子压力的能力,鞭毛蛋白固定了一部分银离子,减少了银离子进入胞内的概率<sup>[18]</sup>。细菌运动性建立的银离子耐受性机制刚处于研究起始阶段,除了 *flhD* 之外<sup>[20-22]</sup>,是否还有其他基因操控着大肠杆菌的附属器参与抵御银离子的胁迫,值得进一步研究。上游调控 *flhD* 的 *OmpR* 在调控 OMP 方面也作出重要贡献(*OmpR* 调控的 *OmpCF* 缺失后,阻滞了银离子进入周质和胞质)<sup>[20-21]</sup>。但无论是 *OmpC* 还是 *OmpF*,确定何种 OMP 亚型更容易介导银离子

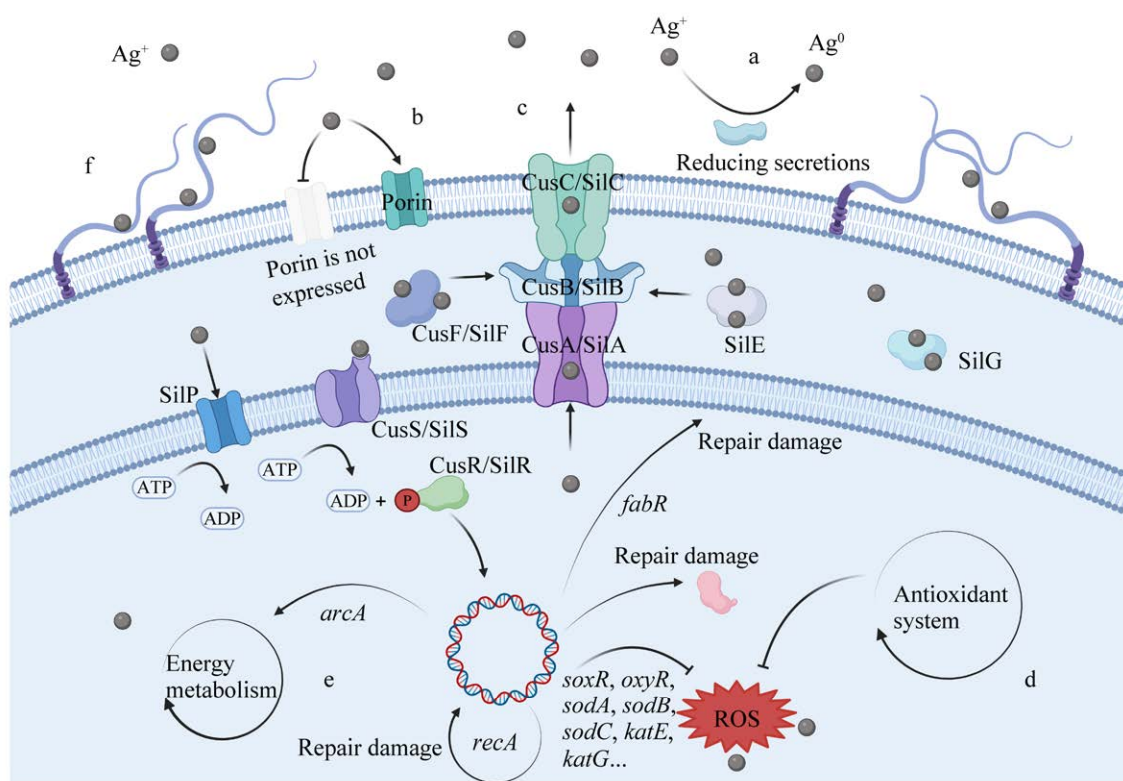


图 7 大肠杆菌的银离子耐受性机制 a: 分泌胞外聚合物还原银离子; b: 抑制 OMP 表达; c: Cus/Sil 外排系统感受入胞银离子启动外排程序; d: 启动氧化损伤防御机制; e: 维持能量代谢; f: 细菌运动。  
Figure 7 Mechanism of silver ion tolerance in *Escherichia coli*. a: Secreting extracellular polymers to reduce silver ions; b: Inhibited OM protein expression; c: Cus/Sil efflux system sensed silver ions to initiate efflux process; d: Activate oxidative damage defense mechanism; e: Maintenance of energy metabolism; f: Bacterial motility.

通过可能并不是研究和讨论的重点内容, 确认 OmpCF 是银离子进入胞内的特异性通道更具价值。值得注意的是, OmpCF 主要阻拦低浓度的银离子入胞, 在面对较高浓度的银离子时, 还需依赖于 Cus 和 Sil 系统将银离子外排。综上, 减少银离子进入细胞和促进细胞内银离子外排是大肠杆菌耐银离子胁迫的 2 个重要手段。

CusS 是细菌周质中感受银离子的主要蛋白, 且编码基因的突变会增加其蛋白表达量。因此, 明确关键突变位点并下调其表达水平有助于抑制 CusRS 的激活。由于 CusRS 的紧密结构, 一旦银离子被识别, 在极短的时间内 CusR 即可启动表达<sup>[30]</sup>。但目前对于 CusR 的了解较少, 其调控机制有待进一步研究。对于周质中的银离子, CusB 可能先于 CusS 对银离子进行识别, 率先组建 CusCBA 外排通道<sup>[41]</sup>。对于 CusFBA 而言, 蛋氨酸残基在识别、捕获、呈递银离子方面发挥重要作用, 这可能归因于蛋氨酸上的巯基与银离子间的高亲和力<sup>[41,43]</sup>。基于蛋氨酸残基间的相互配合, CusB 承接了来自 CusF 的银离子, 并将其转移到 CusA 的周质裂隙<sup>[43]</sup>。而 CusA 和 CusF 的角色十分关键, 前者既是外排系统的源动力, 又负责将胞质中的银离子吸附并外排; 后者缓解了周质中银离子的过量累积, 保护了 PM 结构的完整性<sup>[38,44]</sup>。PM 是完成细胞许多代谢活动的场所, Sil 系统中的 SilPGE 蛋白在保障 PM 的正常功能中也发挥着重要作用。SilGE 缓解了周质中过大的银离子压力, SilP 可能调配着各组件间的工作, 但 SilPG 的结构和功能仍不明确<sup>[48-50]</sup>。

虽然运动性、OMP、Cus 和 Sil 系统等赋予了细菌对银离子的耐受能力, 但银离子对大肠杆菌呼吸链、能量代谢的影响仍然存在, 所以大肠杆菌赖于 ArcA 的突变来调整能量代谢、应对恶劣的缺氧环境并维持细胞的正常活动<sup>[5,51]</sup>。

ArcA 是除运动性、OMP、Cus 和 Sil 系统之外, 大肠杆菌抵御银离子胁迫的关键蛋白<sup>[51]</sup>。细菌的损伤修复和防御机制对于维持细胞正常功能也十分重要。氧化损伤是银离子对细胞的破坏作用之一<sup>[1]</sup>。在银离子作用下, 细菌需及时对损伤的 DNA、蛋白质、细胞膜等、重要细胞组件进行修复, 且细菌还需降低胞内 ROS 水平以减少氧化损伤, 在此过程中 OxyR 和 SoxR 等调控因子在抗氧化防御中发挥着重要作用<sup>[54]</sup>。另外 *narU*、*pheU*、*cueO* 等基因在银离子作用下存在差异表达<sup>[5]</sup>, 但其调控机制尚不明确。总之, 大肠杆菌的银离子耐受能力是多系统多基因共同作用下的体现。而以银离子耐受性相关基因(表 2)为靶点开发相关药物, 能有望减缓大肠杆菌对银离子的耐受。

## 4 展望

临床、畜牧业和环境不断分离鉴定出的银离子耐受性大肠杆菌<sup>[59]</sup>, 提示耐药细菌对人类、动物和生态系统的共同危害。银离子耐受性机制与细菌的多耐药机制既有差异也有共同之处。因而, 参照多耐药机制, 可能是探寻和解决银离子耐受性机制的重要突破口之一。“特洛伊木马”伪装模式被发现能够用于“诱骗”细菌将被营养物质包裹的银离子吸收入胞, 一旦外层包裹结构被分解, 释放的银离子即可杀伤细胞<sup>[1]</sup>。Wang 等<sup>[60]</sup>利用该模式, 将包裹银离子的 LB 培养基提取物在光的掩饰下成功诱骗细菌主动摄入, 并在胞内释放实现杀菌作用。然而, 伪装模式面临被识破的高风险, 并非一劳永逸的可靠措施。此外, 基于细菌鞭毛和外膜的阻滞作用, 可联用抗生素抑制鞭毛基因表达并破坏外膜结构来“掩护”银离子进入胞内。Panáček 等<sup>[18]</sup>采用了该策略, 他们利用石榴皮提取物联合纳米银来提高抗菌效果, 石榴皮提取

表2 银离子耐受性关键基因及功能

Table 2 Key genes and functions of silver resistance

| Protein type              | Silver tolerant gene | Description                                                                                                                                                                                                                                 | Reference  |
|---------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| OMP                       | <i>ompC</i>          | Outer membrane porin; deletion mutants are more tolerant to silver ions                                                                                                                                                                     | [11,16-17] |
|                           | <i>ompF</i>          | Outer membrane porin; deletion mutants are more tolerant to silver ions                                                                                                                                                                     | [11,17]    |
|                           | <i>ompR</i>          | DNA-binding transcriptional dual regulator, regulates OmpCF transcription; deletion mutants are more tolerant to silver ions                                                                                                                | [11]       |
| Efflux pump               | <i>cusA</i>          | Copper/silver export system RND permease, providing power, delivering silver ions                                                                                                                                                           | [38,43]    |
|                           | <i>cusB</i>          | Copper/silver export system membrane fusion protein, connect CusA and CusC, feel the silver ions and start CusCBA assembly                                                                                                                  | [39,41]    |
|                           | <i>cusC</i>          | Copper/silver export system outer membrane channel, silver ion efflux                                                                                                                                                                       | [40]       |
|                           | <i>cusR</i>          | DNA-binding transcriptional activator, receives the CusS phosphoric acid signal and initiates <i>cusCFBA</i> transcription                                                                                                                  | [31,34]    |
|                           | <i>cusF</i>          | Copper/silver export system periplasmic binding protein, silver ions in periplasm were collected and presented to CusB                                                                                                                      | [43-44]    |
|                           | <i>cusS</i>          | Sensor histidine kinase, sensing silver ions, self-phosphorylation and transmitting phosphoric acid signals to CusR                                                                                                                         | [30,32]    |
|                           | <i>silCFBA-RS</i>    | The function corresponds to CusCFBA-RS                                                                                                                                                                                                      | [46]       |
|                           | <i>silE</i>          | Silver-binding protein, present silver ions to SilCBA                                                                                                                                                                                       | [46-47]    |
| Energy metabolism         | <i>arcA</i>          | DNA-binding transcriptional dual regulator; anaerobic respiration regulatory network factors; activate a variety of reductase and anaerobic respiration related coding genes; assist bacteria through nitrate respiration to produce energy | [51]       |
| Damage repair and defense | <i>sodB</i>          | Superoxide dismutase; deletion mutant is more sensitive to silver ions                                                                                                                                                                      | [56]       |
|                           | <i>recA</i>          | DNA recombination/repair protein; deletion mutants are more sensitive to silver ions                                                                                                                                                        | [56-57]    |
|                           | <i>fabR</i>          | DNA-binding transcriptional repressor, code for fatty acid biosynthesis regulatory factors, affects membrane lipid homeostasis; deletion mutants are more sensitive to silver ions                                                          | [56]       |
|                           | <i>lon</i>           | Lon protease; deletion mutants are more sensitive to silver ions                                                                                                                                                                            | [56]       |
|                           | <i>pgaB</i>          | Poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine N-deacetylase and beta-1,6 glycoside hydrolase; involved in the formation of EPS and biofilm; deletion mutants are more sensitive to silver ions                                                       | [56]       |
|                           | <i>wcaA</i>          | Colanic acid biosynthesis acetyltransferase; involved in the formation of EPS; deletion mutants are more sensitive to silver ions                                                                                                           | [56]       |
|                           | <i>wcaB</i>          | Colanic acid biosynthesis acetyltransferase; involved in the formation of EPS; deletion mutants are more sensitive to silver ions                                                                                                           | [56]       |

物可抑制大肠杆菌鞭毛蛋白相关基因的表达并减少鞭毛蛋白的产生<sup>[61]</sup>。抗菌肽可扰乱细菌磷脂双分子层,导致形成瞬时孔,纳米银则可由此穿过细菌细胞膜发挥抗菌作用<sup>[62]</sup>。因此,以此为基础的多药联合银离子抗菌模式也是抗感

染的重要措施。同时,考虑到多药组合模式可能发挥较好的治疗效果,但无法从根本上解决银离子耐受性问题,未来还可尝试在研究大肠杆菌具体的银离子耐受性机制过程中,通过人为干预,利用不同浓度梯度银离子胁迫条件下

获得的“脱耐银”菌株,借助组学鉴定,进一步深入研究其“脱耐银”机制。另外,结合 Zhao 等<sup>[63]</sup>建立的细菌对银离子敏感程度定量分析模型,确定不同环境中细菌耐受的银离子浓度,建立可评估模型,对防止过度使用银离子也具有重要意义。对于 Cus 和 Sil 这 2 个重要的外排系统,则需通过抑制其发挥作用,减少银离子的外排。无论是抑制 CusRS/SilRS 的启动作用,还是抑制 CusCBA 的任一环节,亦是抑制 CusA 的外排动力,都是潜在的有效策略。此外, Sedlak 等<sup>[64]</sup>通过在大肠杆菌周质中表达银离子结合肽,提高了大肠杆菌的银离子耐受性。这种基因工程细菌具备合成细胞生物修复材料的潜质,或许也可服务于生产。

## 作者贡献声明

吴钰煌、郑锡:初稿写作、稿件润色修改;  
安皓月、沈舒楚:文献收集和整理;伍中宝、周素:图片绘制;王君、邹黎黎:监督指导、稿件润色修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明没有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。

## REFERENCES

- [1] LI H, XU HY. Mechanisms of bacterial resistance to environmental silver and antimicrobial strategies for silver: a review[J]. *Environmental Research*, 2024, 248: 118313.
- [2] HUANG Y, KANG HF, WANG Y, LIU K, WEI WY, DAI HL. One stone three birds: silver sulfadiazine modulates the stability and dynamics of hydrogels for infected wound healing[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(19): e2400242.
- [3] POKHREL LR, JACOBS ZL, DIKIN D, AKULA SM. Five nanometer size highly positive silver nanoparticles are bactericidal targeting cell wall and adherent fimbriae expression[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 6729.
- [4] PORMOHAMMAD A, FIRRINCIELI A, SALAZAR-ALEMÁN DA, MOHAMMADI M, HANSEN D, CAPPELLETTI M, ZANNONI D, ZAREI M, TURNER RJ. Insights into the synergistic antibacterial activity of silver nitrate with potassium tellurite against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0062823.
- [5] WU K, LI HC, CUI X, FENG RB, CHEN WZ, JIANG YC, TANG C, WANG YH, WANG Y, SHEN XP, LIU YF, LYNCH M, LONG HA. Mutagenesis and resistance development of bacteria challenged by silver nanoparticles[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2022, 66(10): e0062822.
- [6] MULLER M. Bacterial silver resistance gained by cooperative interspecies redox behavior[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(8): e00672-18.
- [7] HOOTON SPT, PRITCHARD ACW, ASIANI K, GRAY-HAMMERTON CJ, STEKEL DJ, CROSSMAN LC, MILLARD AD, HOBMAN JL. Laboratory stock variants of the archetype silver resistance plasmid pMG101 demonstrate plasmid fusion, loss of transmissibility, and transposition of Tn7/*pco/sil* into the host chromosome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 723322.
- [8] WOOLLEY CA, MARK SUTTON J, WAND ME. Mutations in SilS and CusS/OmpC represent different routes to achieve high level silver ion tolerance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 113.
- [9] McNEILLY O, MANN R, HAMIDIAN M, GUNAWAN C. Emerging concern for silver nanoparticle resistance in *Acinetobacter baumannii* and other bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 652863.
- [10] FINLEY PJ, NORTON R, AUSTIN C, MITCHELL A, ZANK S, DURHAM P. Unprecedented silver resistance in clinically isolated Enterobacteriaceae: major implications for burn and wound management[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(8): 4734-4741.
- [11] RANDALL CP, GUPTA A, JACKSON N, BUSSE D, O'NEILL AJ. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(4): 1037-1046.
- [12] STABRYLA LM, JOHNSTON KA, DIEMLER NA, COOPER VS, MILLSTONE JE, HAIG SJ, GILBERTSON LM. Role of bacterial motility in differential resistance mechanisms of silver nanoparticles and silver ions[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16(9): 996-1003.
- [13] STRAHL H, ERRINGTON J. Bacterial membranes: structure, domains, and function[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2017, 71: 519-538.
- [14] BONDARENKO OM, SIHTMÄE M, KUZMIČIOVA J, RAGELIENĖ L, KAHRU A, DAUGELAVIČIUS R. Plasma membrane is the target of rapid antibacterial action of silver nanoparticles in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13: 6779-6790.
- [15] MASI M, WINTERHALTER M, PAGÈS JM. Outer membrane porins[J]. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2019, 92: 79-123.
- [16] 沈舒楚, 吴钰煌, 蔡丹, 安皓月, 伍中宝, 王君, 杜幼芹, 邹黎黎. 大肠杆菌 OmpC 响应银胁迫初探及生物信息学分析[J/OL]. *中国测试*, [2024-10-20]. <http://kns.cnki>.

- net/kcms/detail/51.1714.TB.20240412.1523.008.html. SHEN SC, WU YH, CAI D, AN HY, WU ZB, WANG J, DU YQ, ZOU LL. Preliminary study and bioinformatics analysis of *E. coli* OmpC response to silver stress[J/OL]. China Test, [2024-10-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1714.TB.20240412.1523.008.html> (in Chinese).
- [17] KĘDZIÓRA A, WIECZOREK R, SPERUDA M, MATOLÍNOVÁ I, GOSZCZYŃSKI TM, LITWIN I, MATOLÍN V, BUGLA-PŁOSKOŃSKA G. Comparison of antibacterial mode of action of silver ions and silver nanoformulations with different physico-chemical properties: experimental and computational studies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 659614.
  - [18] PANÁČEK A, KVÍTEK L, SMĚKALOVÁ M, VEČEROVÁ R, KOLÁŘ M, RÖDEROVÁ M, DYČKA F, ŠEBELA M, PRUCEK R, TOMANEC O, ZBOŘIL R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it[J]. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13(1): 65-71.
  - [19] MASRI A, KHAN NA, ZOQRATT MZHM, AYUB Q, ANWAR A, RAO K, SHAH MR, SIDDIQUI R. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* K1 after therapy with hesperidin conjugated with silver nanoparticles[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 51.
  - [20] SAMANTA P, CLARK ER, KNUTSON K, HORNE SM, PRÜß BM. OmpR and RcsB abolish temporal and spatial changes in expression of *flhD* in *Escherichia coli* biofilm[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 182.
  - [21] CHEN YG, MAO RB, XU JT, HUANG YX, XU JY, CUI SD, ZHU ZH, JI X, HUANG SH, HUANG YZ, HUANG HY, YEN SC, LIN YCD, HUANG HD. A causal regulation modeling algorithm for temporal events with application to *Escherichia coli*'s aerobic to anaerobic transition[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(11): 5654.
  - [22] FRANCEZ-CHARLOT A, LAUGEL B, van GEMERT A, DUBARRY N, WIOROWSKI F, CASTANIÉ-CORNET MP, GUTIERREZ C, CAM K. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(3): 823-832.
  - [23] RUSSELL B, ROGERS A, YODER R, KURILICH M, KRISHNAMURTHI VR, CHEN JY, WANG Y. Silver ions inhibit bacterial movement and stall flagellar motor[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11704.
  - [24] LI SW, ZHANG X, SHENG GP. Silver nanoparticles formation by extracellular polymeric substances (EPS) from electroactive bacteria[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2016, 23(9): 8627-8633.
  - [25] ZHANG X, YANG CW, YU HQ, SHENG GP. Light-induced reduction of silver ions to silver nanoparticles in aquatic environments by microbial extracellular polymeric substances (EPS)[J]. *Water Research*, 2016, 106: 242-248.
  - [26] LI Y, ZHAO J, SHANG EX, XIA XH, NIU JF, CRITTENDEN J. Effects of chloride ions on dissolution, ROS generation, and toxicity of silver nanoparticles under UV irradiation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(8): 4842-4849.
  - [27] YANG Y, CHEN X, ZHANG N, SUN BB, WANG KK, ZHANG YQ, ZHU LY. Self-defense mechanisms of microorganisms from the antimicrobial effect of silver nanoparticles: Highlight the role of extracellular polymeric substances[J]. *Water Research*, 2022, 218: 118452.
  - [28] MULLER M, MERRETT ND. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to ionic silver[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(9): 5492-5499.
  - [29] LI XZ, NIKAIIDO H, WILLIAMS KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(19): 6127-6132.
  - [30] AFFANDI T, ISSAIAN AV, McEVOY MM. The structure of the periplasmic sensor domain of the histidine kinase CusS shows unusual metal ion coordination at the dimeric interface[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(37): 5296-5306.
  - [31] AFFANDI T, McEVOY MM. Mechanism of metal ion-induced activation of a two-component sensor kinase[J]. *Biochemical Journal*, 2019, 476(1): 115-135.
  - [32] 安皓月, 谭超, 沈舒楚, 伍中宝, 吴钰煌, 邓凯红, 邹黎黎, 王君. 大肠杆菌 CusS 的生物信息学分析及对银离子胁迫的响应[J]. *微生物学报*, 2024, 64(4): 1187-1202.
  - AN HY, TAN C, SHEN SC, WU ZB, WU YH, DENG KH, ZOU LL, WANG J. Bioinformatics of CusS in *Escherichia coli* in response to silver ion stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(4): 1187-1202 (in Chinese).
  - [33] YAMAMOTO K, HIRAO K, OSHIMA T, AIBA H, UTSUMI R, ISHIHAMA A. Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(2): 1448-1456.
  - [34] GRAVES JL Jr, TAJKARIMI M, CUNNINGHAM Q, CAMPBELL A, NONGA H, HARRISON SH, BARRICK JE. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2015, 6: 42.
  - [35] EWUNKEM AJ, RODGERS L, CAMPBELL D, STALEY C, SUBEDI K, BOYD S, GRAVES JL Jr. Experimental evolution of magnetite nanoparticle resistance in *Escherichia coli*[J]. *Nanomaterials*, 2021, 11(3): 790.
  - [36] WANG HC, LI J, MIN CH, XIA FJ, TANG ML, LI J, HU YM, ZOU MX. Characterization of silver resistance and coexistence of *sil* operon with antibiotic resistance genes among Gram-negative pathogens isolated from wound samples by using whole-genome sequencing[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2022, 15: 1425-1437.
  - [37] GUDIPATY SA, LARSEN AS, RENSING C, McEVOY MM. Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 330(1): 30-37.
  - [38] MOSENG MA, LYU MN, PIPATPOLKAI T, GLAZA P, EMERSON CC, STEWART PL, STANSFELD PJ, YU EW. Cryo-EM structures of CusA reveal a mechanism of metal-ion export[J]. *mBio*, 2021, 12(2): e00452-21.
  - [39] BAGAI I, LIU WB, RENSING C, BLACKBURN NJ, McEVOY MM. Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(49): 35695-35702.

- [40] DELMAR JA, SU CC, YU EW. Structural mechanisms of heavy-metal extrusion by the Cus efflux system[J]. *Biometals*, 2013, 26(4): 593-607.
- [41] SANTIAGO AG, CHEN TY, GENOVA LA, JUNG W, GEORGE THOMPSON AM, McEVOY MM, CHEN P. Adaptor protein mediates dynamic pump assembly for bacterial metal efflux[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(26): 6694-6699.
- [42] MEIR A, WALLE G, SCHWERDTFEGER F, GEVORKYAN AIRAPETOV L, RUTHSTEIN S. Exploring the role of the various methionine residues in the *Escherichia coli* CusB adapter protein[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0219337.
- [43] CHACÓN KN, MEALMAN TD, McEVOY MM, BLACKBURN NJ. Tracking metal ions through a Cu/Ag efflux pump assigns the functional roles of the periplasmic proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(43): 15373-15378.
- [44] VERGNES A, HENRY C, GRASSINI G, LOISEAU L, EL HAJJ S, DENIS Y, GALINIER A, VERTOMMEN D, AUSSEL L, EZRATY B. Periplasmic oxidized-protein repair during copper stress in *E. coli*: a focus on the metallochaperone CusF[J]. *PLoS Genetics*, 2022, 18(7): e1010180.
- [45] PADILLA-BENAVIDES T, GEORGE THOMPSON AM, McEVOY MM, ARGÜELLO JM. Mechanism of ATPase-mediated Cu<sup>+</sup> Export and Delivery to Periplasmic Chaperones the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(30): 20492-20501.
- [46] BLANCO MASSANI M, KLUMPP J, WIDMER M, SPECK C, NISPLE M, LEHMANN R, SCHUPPLER M. Chromosomal Sil system contributes to silver resistance in *E. coli* ATCC 8739[J]. *Biometals*, 2018, 31(6): 1101-1114.
- [47] ZIMMERMANN M, UDAGEDARA SR, SZE CM, RYAN TM, HOWLETT GJ, XIAO ZG, WEDD AG. PcoE: a metal sponge expressed to the periplasm of copper resistance *Escherichia coli*. Implication of its function role in copper resistance[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, 115: 186-197.
- [48] ASIANI KR, WILLIAMS H, BIRD L, JENNER M, SEARLE MS, HOBMAN JL, SCOTT DJ, SOULTANAS P. SilE is an intrinsically disordered periplasmic “molecular sponge” involved in bacterial silver resistance[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 101(5): 731-742.
- [49] ARRAULT C, MONNEAU YR, MARTIN M, CANTRELLE FX, BOLL E, CHIROT F, COMBY ZERBINO C, WALKER O, HOLOGNE M. The battle for silver binding: how the interplay between the SilE, SilF, and SilB proteins contributes to the silver efflux pump mechanism[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(8): 105004.
- [50] MIJNENDONCKX K, LEYS N, MAHILLON J, SILVER S, van HOUTDT R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance[J]. *Biometals*, 2013, 26(4): 609-621.
- [51] DU HM, LO TM, SITOMPUL J, CHANG MW. Systems-level analysis of *Escherichia coli* response to silver nanoparticles: the roles of anaerobic respiration in microbial resistance[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 424(4): 657-662.
- [52] LOI VV, ROSSIUS M, ANTELMANN H. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 187.
- [53] Van der HEIJDEN J, VOGT SL, REYNOLDS LA, PEÑA-DÍAZ J, TUPIN A, AUSSEL L, FINLAY BB. Exploring the redox balance inside Gram-negative bacteria with redox-sensitive GFP[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 91: 34-44.
- [54] DALE AL, LOWRY GV, CASMAN EA. Modeling nanosilver transformations in freshwater sediments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(22): 12920-12928.
- [55] GOU N, ONNIS-HAYDEN A, GU AZ. Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(15): 5964-5970.
- [56] XIU ZM, LIU YY, MATHIEU J, WANG J, ZHU DQ, ALVAREZ PJJ. Elucidating the genetic basis for *Escherichia coli* defense against silver toxicity using mutant arrays[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(5): 993-997.
- [57] COURCELLE J, HANAWALT PC. RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks[J]. *Annual Review of Genetics*, 2003, 37: 611-646.
- [58] van MELDEREN L, AERTSEN A. Regulation and quality control by lon-dependent proteolysis[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(9): 645-651.
- [59] SCHWAN CL, BASTOS LM, YOUNG S, DOMESLE K, GE BL, HSU CH, LI C, STRAIN E, VIPHAM J, JONES C, AMACHAWADI R, NAGARAJA TG, TRINETTA V. Genotypic and phenotypic characterization of antimicrobial and heavy metal tolerance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from swine feed mills[J]. *Journal of Food Protection*, 2023, 86(8): 100113.
- [60] WANG ZP, FANG YS, ZHOU XF, LI ZB, ZHU HG, DU FL, YUAN X, YAO QF, XIE JP. Embedding ultrasmall Ag nanoclusters in Luria-Bertani extract via light irradiation for enhanced antibacterial activity[J]. *Nano Research*, 2020, 13(1): 203-208.
- [61] ASADISHAD B, HIDALGO G, TUFENKJI N. Pomegranate materials inhibit flagellin gene expression and flagellar-propelled motility of uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334(2): 87-94.
- [62] MOHANTY S, JENA P, MEHTA R, PATI R, BANERJEE B, PATIL S, SONAWANE A. Cationic antimicrobial peptides and biogenic silver nanoparticles kill mycobacteria without eliciting DNA damage and cytotoxicity in mouse macrophages[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(8): 3688-3698.
- [63] ZHAO G, STEVENS SE Jr. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion[J]. *Biometals*, 1998, 11(1): 27-32.
- [64] SEDLAK RH, HNILOVA M, GROSH C, FONG H, BANEYX F, SCHWARTZ D, SARIKAYA M, TAMERLER C, TRAXLER B. Engineered *Escherichia coli* silver-binding periplasmic protein that promotes silver tolerance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(7): 2289-2296.