

β -桉木醇联合替加环素对 *tet(X4)*阳性大肠杆菌的体外协同抗菌作用

张慕琛^{1,2#}, 宋黄威^{1,2#}, 邹之宇¹, 杨思源¹, 李会³, 代重山^{1,2}, 刘德俊^{1,2}, 邵兵³, 吴聪明^{1,2}, 沈建忠^{1,2}, 汪洋^{1,2*}

1 中国农业大学动物医学院 农业农村部动物源细菌耐药性监测重点实验室, 北京 100193

2 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642

3 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013

张慕琛, 宋黄威, 邹之宇, 杨思源, 李会, 代重山, 刘德俊, 邵兵, 吴聪明, 沈建忠, 汪洋. β -桉木醇联合替加环素对 *tet(X4)*阳性大肠杆菌的体外协同抗菌作用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1621-1632.

ZHANG Muchen, SONG Huangwei, ZOU Zhiyu, YANG Siyuan, LI Hui, DAI Chongshan, LIU Dejun, SHAO Bing, WU Congming, SHEN Jianzhong, WANG Yang. Synergistic effect of β -thujaplicin and tigecycline against *tet(X4)*-positive *Escherichia coli* in vitro[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1621-1632.

摘要: 质粒介导 *tet(X4)*基因的出现和流行, 严重影响替加环素(tigecycline)对临床多重耐药细菌感染的治疗效果, 急需寻找有效的佐剂遏制替加环素耐药性。本研究采用微量棋盘稀释法、时间-杀菌曲线测定 β -桉木醇(β -thujaplicin)和替加环素的体外联合抗菌表征, 通过测定细菌细胞膜通透性、细菌胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量、铁含量以及替加环素含量等指标, 来探究 β -桉木醇和替加环素联合使用对 *tet(X4)*基因阳性大肠杆菌(*Escherichia coli*)的抗菌作用机制。结果表明, β -桉木醇联合替加环素对 *tet(X4)*基因阳性大肠杆菌具有体外协同抗菌效果, 且 β -桉木醇在抗菌作用浓度范围内无显著溶血性和细胞毒性。机制研究发现, β -桉木醇能显著增大细菌细胞膜的通透性, 降低细菌胞内铁含量, 干扰铁稳态, 诱导胞内 ROS 显著增加, 从而发挥抗菌效果。进一步研究发现, β -桉木醇可通过干扰细菌铁代谢和增大细菌细胞膜通透性, 协同增强替加环素的抗菌效果。本研究结果为 β -桉木醇联合替加环素治疗 *tet(X4)*基因阳性大肠杆菌感染提供了理论和实践基础。

关键词: β -桉木醇; 替加环素; *tet(X4)*; 协同抗菌; 铁稳态

资助项目: 岭南现代农业实验室科研项目(NT2021006); 国家自然科学基金(31930110)

This work was supported by the Laboratory of Lingnan Modern Agriculture Project (NT2021006) and the National Natural Science Foundation of China (31930110).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wangyang@cau.edu.cn

Received: 2022-08-03; Accepted: 2023-02-22

Synergistic effect of β -thujaplicin and tigecycline against *tet(X4)*-positive *Escherichia coli* *in vitro*

ZHANG Muchen^{1,2#}, SONG Huangwei^{1,2#}, ZOU Zhiyu¹, YANG Siyuan¹, LI Hui³,
DAI Chongshan^{1,2}, LIU Dejun^{1,2}, SHAO Bing³, WU Congming^{1,2}, SHEN Jianzhong^{1,2},
WANG Yang^{1,2*}

1 Key Laboratory of Animal Antimicrobial Resistance Surveillance, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

2 Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, Guangdong, China

3 Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China

Abstract: The widespread of tigecycline resistance gene *tet(X4)* has a serious impact on the clinical efficacy of tigecycline. The development of effective antibiotic adjuvants to combat the looming tigecycline resistance is needed. The synergistic activity between the natural compound β -thujaplicin and tigecycline *in vitro* was determined by the checkerboard broth microdilution assay and time-dependent killing curve. The mechanism underlining the synergistic effect between β -thujaplicin and tigecycline against *tet(X4)*-positive *Escherichia coli* was investigated by determining cell membrane permeability, bacterial intracellular reactive oxygen species (ROS) content, iron content, and tigecycline content. β -thujaplicin exhibited potentiation effect on tigecycline against *tet(X4)*-positive *E. coli* *in vitro*, and presented no significant hemolysis and cytotoxicity within the range of antibacterial concentrations. Mechanistic studies demonstrated that β -thujaplicin significantly increased the permeability of bacterial cell membranes, chelated bacterial intracellular iron, disrupted the iron homeostasis and significantly increased intracellular ROS level. The synergistic effect of β -thujaplicin and tigecycline was identified to be related to interfere with bacterial iron metabolism and facilitate bacterial cell membrane permeability. Our studies provided theoretical and practical data for the application of combined β -thujaplicin with tigecycline in the treatment of *tet(X4)*-positive *E. coli* infection.

Keywords: β -thujaplicin; tigecycline; *tet(X4)*; synergistic antibacterial effect; iron homeostasis

多重耐药革兰阴性菌的出现及蔓延严重威胁人类和动物健康^[1]。替加环素作为第3代四环素类(甘氨酸环类)药物,由于其抗菌谱广且耐药率低,被认为是治疗多重耐药革兰阴性菌感染的最后一道防线^[2]。早期研究发现,非特异性外排泵过表达、核糖体保护以及药物修饰酶 Tet(X) 均能介导细菌对替加环素产生耐药,但这些耐药基因大多不能水平传播^[3-4]。其中, Tet(X)是黄素依赖单加氧酶,能对四环素类药物分子的 C11a

位点进行羟基化修饰,从而导致该类药物(包括替加环素)失活^[5]。2019年,我国两个研究团队发现了2种 *tet(X)* 基因变异体: *tet(X3)* 和 *tet(X4)*^[6-7]。令人担忧的是, *tet(X3)* 和 *tet(X4)* 基因多位于接合型质粒上,可在不同种属细菌间进行水平传播。后期研究陆续发现, *tet(X4)* 基因已经在人、环境、畜禽等多种来源的细菌中广泛存在,且大肠杆菌是携带 *tet(X4)* 基因的主要病原菌^[8-10]。*tet(X4)* 基因的广泛流行加剧了替加环素

耐药性的蔓延,给人医临床上替加环素治疗多重耐药菌感染的疗效造成了巨大挑战。因此,急需开展针对替加环素耐药性的控制措施。

抗菌药物是治疗细菌感染的重要手段。然而,目前新型抗生素开发面临研发难度大、成本高、周期长等困境^[11]。由于抗生素佐剂能恢复甚至增强抗生素的抗菌效果,从而延长现有抗菌药物使用寿命^[12]。因此,开发安全有效的替加环素佐剂已成为遏制其耐药性发展的重要策略之一。例如, Liu 等^[13]发现抗人类免疫缺陷病毒药物齐多夫定(azidothymidine)可与 Tet(X)活性位点特异性结合并抑制其催化活性,从而恢复 *tet(X)*基因阳性菌对替加环素的敏感性。此外, Xu 等^[14]发现从白花丹中分离的萘醌类天然化合物兰雪醌不仅可破坏细菌细胞膜的完整性,还能与 Tet(X3)和 Tet(X4)活性中心结合,抑制 Tet(X3)和 Tet(X4)的催化活性,从而恢复 *tet(X4)*基因阳性菌对四环素类药物的敏感性。以上研究表明,开发替加环素佐剂具备理论和实践上的可行性。但目前尚未有替加环素佐剂成功进入临床应用,因此急需进一步开发。

由于结构和功能具有丰富的多样性,来源于植物的天然化合物在药物开发中发挥着巨大作用,已备受各国科学家的关注^[15]。本研究通过对天然化合物库进行高通量筛选,发现 β -桉木醇(β -thujaplicin)联合替加环素对携带 *tet(X4)*基因的大肠杆菌具有较好的协同抗菌效果。 β -桉木醇是从中国台湾扁柏的树干中提取的一种具有卓酚酮骨架的单萜类天然化合物,具有抗病毒、抗菌和抗炎作用。由于生物安全性较好, β -桉木醇被广泛应用于医药、农业等行业中^[16-17]。本研究初步探究了 β -桉木醇的抗菌机理及与替加环素协同抗菌机制,为 β -桉木醇联合替加环素治疗 *tet(X4)*基因阳性大肠杆菌引起的感染提供了理论和实践基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验药物

β -桉木醇(β -thujaplicin),纯度 99.78%,购自上海陶术生物科技有限公司(货号:T3717);替加环素(tigecycline),纯度 $\geq 96\%$,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(货号:E129449)。

1.1.2 试验菌株

*tet(X4)*基因阳性大肠杆菌 J53-47R,标准菌株 ATCC 25922 均由本实验室保存。

1.1.3 主要试验试剂

Mueller-Hinton 肉汤培养基(Mueller-Hinton broth, MHB, 货号:CM901), Mueller-Hinton 琼脂培养基(Mueller-Hinton agar, MHA, 货号:CM902),购自北京陆桥技术股份有限公司;活性氧检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司(货号:S0033M);铁测定试剂盒购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(货号:MAK025)。

1.2 方 法

1.2.1 微量棋盘稀释法药敏试验

采用微量棋盘稀释法^[18]测定 β -桉木醇和替加环素联合使用对 *tet(X4)*基因阳性大肠杆菌 J53-47R 的抗菌效果。在 96 孔板中加入 100 μ L MHB 培养基,将 a 药加入 H1-H10 孔中,依次向上倍比稀释至 B 行。在第 1 列 A1 到 H1 孔中加入 b 药,从左向右倍比稀释至第 9 列。1-10 列均加入 100 μ L 的菌液(1×10^6 CFUs/mL)。第 11 和 12 列分别为只含 MHB 培养基的阴性对照和含有 100 μ L MHB 肉汤和 100 μ L 菌液的阳性对照,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中静置培养 18 h 后读取结果。结果判读标准为:以肉眼能分辨的抑制细菌生长的最低药物浓度为该药物的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。利用公式(1)计算联合抑菌指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)。每个试验孔设置 2 个重复。

FICI =

$$\frac{\text{MIC}(\text{a药联用}) + \text{MIC}(\text{b药联用})}{\text{MIC}(\text{a药单用}) + \text{MIC}(\text{b药单用})} \quad (1)$$

若 $\text{FICI} \leq 0.5$, 则判定两种药物具有协同作用; $0.5 < \text{FICI} \leq 4$, 则判定两种药物具有相加或无关作用; 若 $\text{FICI} > 4$, 则判定两种药物具有拮抗作用。

1.2.2 时间-杀菌曲线

挑取 *E. coli* J53-47R 单克隆于 1 mL MHB 肉汤培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至对数期。调整菌液浓度至麦氏比浊度为 0.5, 再 1:100 稀释至 5 mL 的无菌 MHB 肉汤中, 使菌液终浓度约为 1×10^6 CFUs/mL, 并分装至不同试管中。然后在不同试管中分别加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) (阴性对照)、 β -桉木醇 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、替加环素 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 β -桉木醇 (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 替加环素 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 并于 37 °C、200 r/min 振荡培养。分别于药物处理后的第 0、1、2、4、8、12、24 h 取样, 并进行梯度稀释涂板计数。每根试管设置 2 个重复。

1.2.3 溶血性试验

将无菌脱纤维绵羊血 800 \times g 离心 5 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 配制成 8% 的红细胞悬液。使用 PBS 将 β -桉木醇进行梯度稀释, 并加入 8% 的红细胞悬液, 使 β -桉木醇的终浓度为 2、4、8、16、32、64、128 和 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时, 分别以 PBS 和 0.2% 的 triton X-100 作为阴性和阳性对照。将体系于 37 °C 孵育 1 h 后, 100 \times g 离心 5 min 后吸取上清液, 使用多功能酶标仪 (TECAN 公司: Infinite M plex) 测定上清液在 576 nm 处的吸光值。设置 3 个重复。

溶血性 (%) =

$$\frac{OD_{\text{样品}} - OD_{\text{阴性对照}}}{OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{阴性对照}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 细胞毒性试验

采用 CCK-8 (cell counting kit) 法^[19]测定 β -桉木醇对人胚胎肾细胞 HEK293 的细胞毒性。用含 1% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的最低必

需培养基 (minimum essential medium, MEM) 倍比稀释药物, 使 β -桉木醇终浓度为 2、4、8、16、32、64、128 和 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以 10 000 个/孔的数目吸取 100 μL HEK293 细胞接种于 96 孔平底细胞板中, 于含 5% CO_2 的培养箱中 37 °C 培养 24 h。弃去培养液, 在 96 孔板中加入 100 μL 不同浓度的 β -桉木醇, 并分别以细胞培养液和 1% FBS 的 MEM 培养基作为阴性对照和空白对照。在含 5% CO_2 的培养箱中 37 °C 孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8, 37 °C 继续孵育 1 h。最后使用多功能酶标仪测定培养体系在 OD_{450} 处的数值。设置 3 个重复。半数抑制浓度 (half-inhibitory concentration, IC_{50}) 为细胞存活率降为 50% 时的药物浓度 (采用 Logit 法计算)。

存活率 (%) =

$$\frac{OD_{\text{药物}} - OD_{\text{空白对照}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白对照}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.5 β -桉木醇耐药突变株的诱导和筛选

参考 Song 等^[18]的试验方法诱导筛选对 β -桉木醇耐药的突变菌株。将生长至对数期的大肠杆菌 ATCC 25922 菌液浓度调整至麦氏比浊度为 0.5, 再 1:100 稀释并加入到含有不同浓度 β -桉木醇 (0.25 \times MIC, 0.5 \times MIC, 1 \times MIC, 2 \times MIC, 4 \times MIC) 的 MHB 肉汤培养基中。37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 后, 观察细菌生长情况并测定细菌对 β -桉木醇的敏感性。根据细菌对 β -桉木醇的 MIC 值, 调整培养基中的药物浓度, 每 24 h 传代一次。

选取对 β -桉木醇 MIC 值升高的菌株, 在无药的 MHB 培养基中继续连续传代 7 d。7 d 后再测定细菌对 β -桉木醇的敏感性。选取传代 7 d 后对 β -桉木醇 MIC 值升高的菌株, 提取 DNA 并进行全基因组测序和单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 分析。

1.2.6 细胞膜通透性测定

采用荧光探针 1-N-苯基萘胺 (1-N-phenyl naphthylamine, NPN) 测定细菌外膜通透

性^[20]。离心收集对数期 *E. coli* J53-47R 菌体,并用 5 mmol/L HEPES 缓冲液(含 5 mmol/L 葡萄糖)洗涤并重悬,调整菌液浓度至 $OD_{600}=0.5$ 。加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的荧光探针 NPN, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 30 min。吸取 190 μL 装载荧光探针的菌液至 96 孔酶标板中,然后分别加入 10 μL 不同浓度的 β -桉木醇(8、16、32、64、128、256 $\mu\text{g/mL}$)和多黏菌素(4 $\mu\text{g/mL}$, 阳性对照), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后采用多功能酶标仪测定各个体系荧光强度(激发波长=350 nm, 发射波长=420 nm)。

利用荧光探针碘化丙啶(propidium iodide, PI)测定细菌细胞膜通透性^[21]。离心收集对数期 *E. coli* J53-47R 菌体,并用 PBS 缓冲液洗涤并重悬,调整菌液浓度至 $OD_{600}=0.5$ 。加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PI, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 30 min。吸取 190 μL 装载荧光探针的菌液至 96 孔酶标板中,然后分别加入 10 μL 不同浓度的 β -桉木醇(8、16、32、64、128、256 $\mu\text{g/mL}$)和多黏菌素(4 $\mu\text{g/mL}$, 阳性对照), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后采用多功能酶标仪测定各个体系荧光强度(激发波长=535 nm, 发射波长=615 nm)。

1.2.7 细菌胞内活性氧含量测定

将过夜培养的 *E. coli* J53-47R 扩大培养(1:100)至 100 mL LB 肉汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至对数生长期。4 000 \times g 离心收集菌体,用 PBS 洗涤 3 遍并重悬,调整菌液浓度至 $OD_{600}=0.5$ 。加入荧光探针 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA),使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 30 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 \times g 离心 8 min 收集菌体,并用 PBS 洗涤 3 次,去除未装载的探针。向 96 孔酶标板中加入 190 μL 装载荧光探针的菌液,以及 10 μL 不同浓度的 β -桉木醇(8、16、32、64、128、256 $\mu\text{g/mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。最后,利用多功能酶标仪测定各个体系荧光强度(激发波长=488 nm, 发射波长=525 nm)。

1.2.8 细菌胞内铁含量测定

E. coli J53-47R 培养至对数期后,用 PBS 洗涤并调整菌液浓度为 $OD_{600}=0.5$,并吸取 1 mL 分装至 1.5 mL 离心管中。加入不同浓度的 β -桉木醇、替加环素或 β -桉木醇+替加环素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。然后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 \times g 离心 5 min,弃上清液,菌体用 PBS 洗涤 2 次并重悬。将体系置于液氮和 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,反复冻融 3 次,充分裂解细菌。最后,利用铁测定试剂盒(Sigma-Aldrich: MAK025),按照操作规范测定细菌胞内铁含量^[22]。

1.2.9 补充铁离子后 β -桉木醇的时间-杀菌曲线

E. coli J53-47R 过夜培养后,调整菌液浓度约为 1×10^6 CFUs/mL 的菌液,并加入 PBS (阴性对照)、不同浓度的药物、药物组合及 Fe^{3+} (1.25 mmol/L),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养。分别于药物处理的第 0、1、2、4、8、12、24 h 处取样,进行梯度稀释和涂板计数。每个处理设置 3 个重复。

1.2.10 细菌胞内替加环素含量的测定

参考 Tong 等研究方法^[23]测定细菌胞内替加环素的含量。将 *E. coli* J53-47R 在 LB 肉汤中培养至对数期后离心收集菌体。利用 PBS 将菌体洗涤 3 次后调整菌液浓度至 1×10^{10} CFUs/mL,分装至 1.5 mL 离心管中。分别加入替加环素(32 $\mu\text{g/mL}$)、不同浓度的 β -桉木醇(32、64、128 $\mu\text{g/mL}$)或 β -桉木醇+替加环素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡孵育 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 \times g 离心 3 min 收集菌体,加入 500 μL 无菌水重悬,并将其置于液氮和 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,反复冻融 3 次裂解细菌。12 000 \times g 离心 3 min 收集上清液,并将细菌沉淀用 200 μL 甲醇重悬,12 000 \times g 离心 3 min 收集上清液。将两次上清液合并后,12 000 \times g 离心 3 min 收集上清液。最后,利用氮吹挥发上清液,并用 0.1%甲酸水对药物进行复溶。

通过 Waters ACQUITY UPLC-I-Class/Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪(Waters Corporation)定量分析替加环素的含量。以 0.1%甲酸水为流动相 A,

甲醇为流动相 B, 使用 ACQUITY UPLC HSS T3 column 色谱柱, 流速为 0.3 mL/min。梯度洗脱程序如下: 0.0–0.5 min, 95% A; 0.5–2.5 min, 95%–50% A; 2.5–4.0 min, 50%–5% A; 4.0–4.1 min, 5%–95%; 4.1–6.0 min, 95% A。进样体积为 5 μ L。采用电喷雾离子源, 以多离子反应监测的方式进行正离子模式扫描来测定细菌胞内替加环素的含量。

1.2.11 数据分析

试验数据均采用平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,

并利用 GraphPad Prism version 8.4.3 软件 (GraphPad software Inc.)进行统计学分析并作图。

2 结果与分析

2.1 β -桉木醇和替加环素具有协同抗菌作用

通过筛选 2 592 种天然化合物, 发现 β -桉木醇和替加环素联用对替加环素耐药菌 *E. coli* J53-47R 的 FICI 为 0.5, 具有协同抗菌作用(图 1A)。时间-杀菌曲线结果显示, 当单独使用

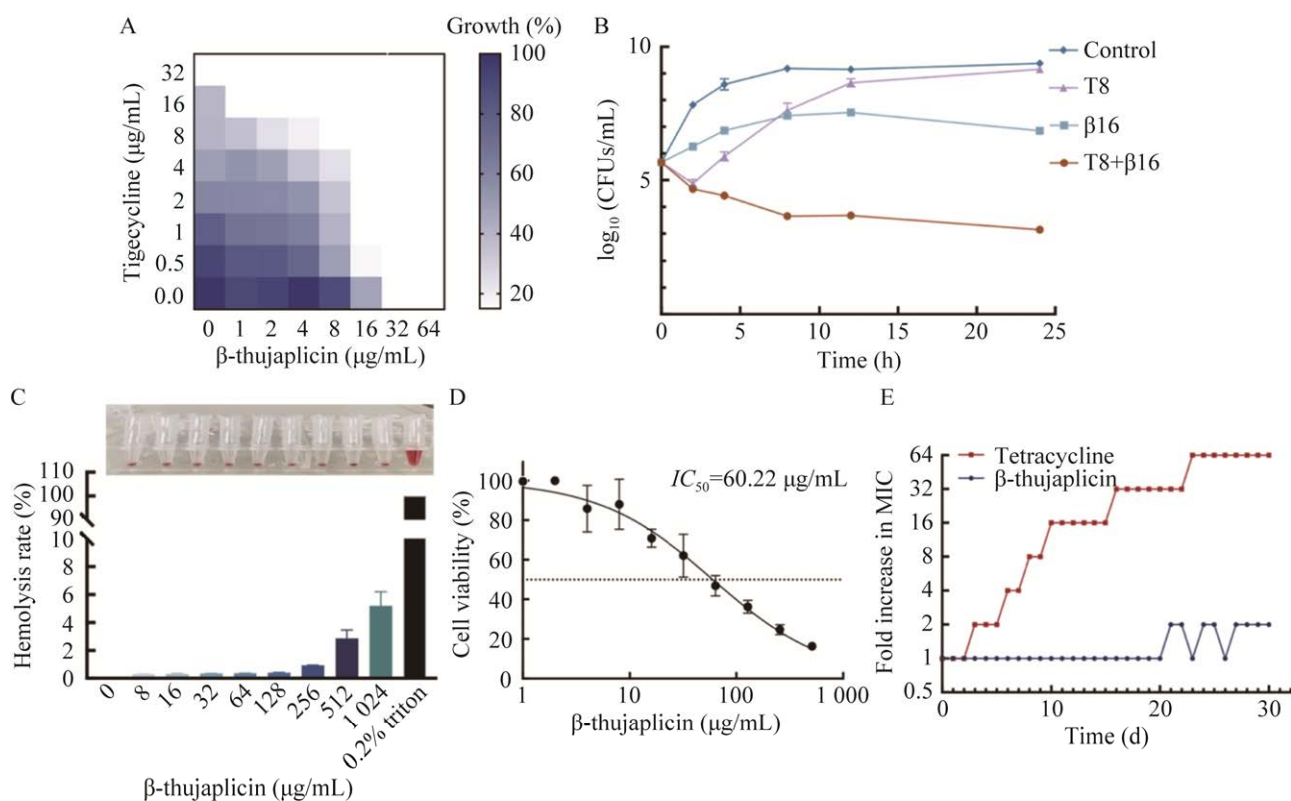


图 1 β -桉木醇联合替加环素的体外协同效果及 β -桉木醇的安全性评价 A: β -桉木醇和替加环素联合使用对大肠杆菌 J53-47R 的微量棋盘稀释法药敏结果. B: 单独或联合使用 β -桉木醇和替加环素对大肠杆菌 J53-47R 的时间-杀菌曲线. C: β -桉木醇对绵羊红细胞的溶血性. D: β -桉木醇对 HEK293 细胞的毒性. E: β -桉木醇和四环素连续诱导大肠杆菌 30 d 产生耐药突变菌株的动态曲线

Figure 1 Synergistic effect of β -thujaplicin combined with tigecycline *in vitro* and selectivity of β -thujaplicin. A: Checkerboard broth microdilution assays between β -thujaplicin and tigecycline against *E. coli* J53-47R. B: Time-dependent killing curve of β -thujaplicin, tigecycline or β -thujaplicin combined with tigecycline against *E. coli* J53-47R. C: Hemolysis of β -thujaplicin against sheep red blood cell. D: Cytotoxicity of β -thujaplicin against HEK293 cell. E: Dynamic curve of drug-resistant *E. coli* mutants induced by β -thujaplicin or tetracycline for 30 days.

16 $\mu\text{g/mL}$ ($0.5\times\text{MIC}$)的 β -桉木醇或 8 $\mu\text{g/mL}$ ($0.25\times\text{MIC}$)的替加环素时,均无杀菌作用。但当 2 种药物联合使用则具有显著的杀菌效果,且在 24 h 时,联用组与替加环素单独使用组相比菌量降低了 6 lg (CFU/mL) (图 1B)。以上结果表明 β -桉木醇和替加环素联合使用对替加环素耐药的 *E. coli* J53-47R 具有协同抗菌效果。

2.2 β -桉木醇细胞毒性较低

为了探究 β -桉木醇的生物安全性,首先检测了 β -桉木醇对绵羊红细胞的溶血性。结果显示,当 β -桉木醇浓度为 1 024 $\mu\text{g/mL}$ 和 512 $\mu\text{g/mL}$ 时,溶血率分别为 5.19%和 2.86%;而当 β -桉木醇浓度低于 512 $\mu\text{g/mL}$ 时,溶血率均小于 1% (图 1C)。此外,采用人胚胎肾细胞 HEK293 模型测定 β -桉木醇的细胞毒性,发现 β -桉木醇对 HEK293 的 IC_{50} 为 60.22 $\mu\text{g/mL}$ (图 1D)。以上结果显示, β -桉木醇在其发挥抗菌作用浓度范围内无明显的溶血性和细胞毒性。

2.3 β -桉木醇不易诱导细菌产生耐药性

抗菌药物失效大多是由于药物在使用过程中导致细菌产生了耐药性。为了验证 β -桉木醇

是否容易诱导细菌产生耐药性,本研究分别利用不同浓度的 β -桉木醇和四环素(对照)对 *E. coli* ATCC 25922 进行诱导。在连续诱导 30 d 后,*E. coli* ATCC 25922 对四环素的 MIC 值提高了 64 倍,而对 β -桉木醇的 MIC 值仅升高了 2 倍(图 1E)。该结果表明相较于四环素, β -桉木醇更不易使细菌产生耐药突变。

2.4 β -桉木醇能增大细菌细胞膜通透性

NPN 是具有疏水性特征的荧光染料。当细菌外膜通透性增大时,NPN 可与磷脂的疏水尾部结合并发出强烈荧光,因此可作为检测革兰阴性菌细胞外膜通透性的指示剂。结果显示,在 β -桉木醇处理细菌 1 h 后,与空白对照相比,药物处理组的荧光强度显著增大(图 2A),证明 β -桉木醇能增大细菌外膜的通透性。荧光染料 PI 无法通过正常的细菌细胞质膜,只有当细菌细胞质膜通透性增大时,其才能进入细菌胞内与 DNA 结合,并发出强烈的荧光。试验结果发现, β -桉木醇能呈浓度依赖性地增大体系中 PI 的荧光强度(图 2B),证明 β -桉木醇能增大细菌细胞质膜的通透性。以上结果表明, β -桉木醇可增大细菌细胞膜的通透性。

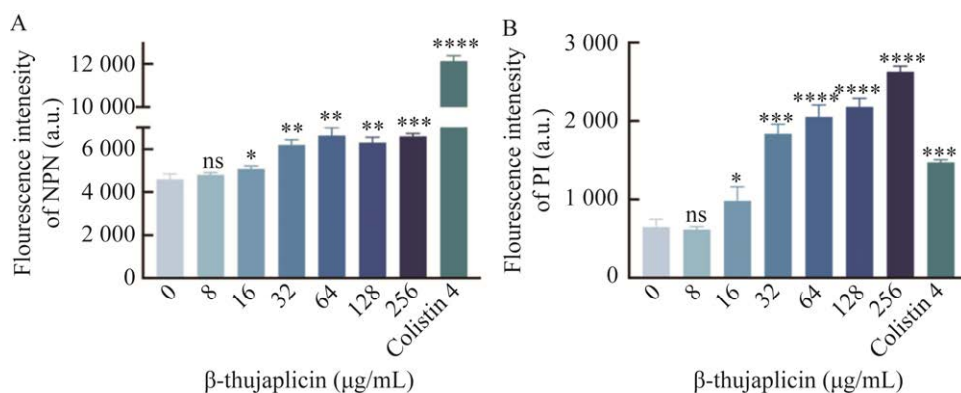


图 2 β -桉木醇对细菌细胞膜通透性的影响 β -桉木醇对大肠杆菌 J53-47R 外膜通透性(A)和质膜通透性(B)的影响;差异显著性采用单因素方差分析(one-way ANOVA)

Figure 2 Effects of β -thujaplicin on the bacterial cell membrane permeability. Effect of β -thujaplicin on the permeability of *E. coli* J53-47R outer membrane (A) and plasma membrane (B). The significances were determined by one-way ANOVA (ns: No significant differences; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$).

2.5 β -桉木醇扰乱细菌铁稳态

铁离子参与细菌氧运输、能量代谢、DNA合成和转录调控等关键生命活动过程,对细菌的生长繁殖至关重要^[24-25]。前期研究发现, β -桉木醇中的羟基酮结构可螯合铁,从而恢复铁转运蛋白缺陷的动物对肠道中铁吸收的能力^[26]。因此,本研究利用铁测定试剂盒探究 β -桉木醇对细菌铁稳态的影响。结果如图3A所示, β -桉木醇可呈浓度依赖式降低细菌胞内铁含量。进一步通过测定添加三价铁离子(Fe^{3+})对 β -桉木醇杀菌效果的影响,结果发现补充 Fe^{3+} 组的菌量比单独使用 β -桉木醇处理组的菌量提高了3 lg (CFU/mL) (图3B)。以上结果表明, β -桉木醇可通过降低细菌胞内铁含量,干扰铁稳态,从而实现杀菌效果。

2.6 β -桉木醇导致细菌胞内活性氧积累

已有研究表明当细菌胞内铁含量降低时,电子传递链活性会被抑制,并导致胞内活性氧

(reactive oxygen species, ROS)的积累^[27]。本研究利用荧光探针 DCFH-DA 检测 β -桉木醇处理后细菌胞内 ROS 含量的变化。与未经药物处理的对照组相比, β -桉木醇处理细菌 1 h 后,细菌胞内 ROS 含量显著升高(图 4A)。添加 6 mmol/L 的活性氧抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)后可显著抑制 β -桉木醇的杀菌效果(图 4B)。上述结果表明细菌胞内 ROS 的积累对 β -桉木醇发挥抗菌作用具有一定程度的贡献。

2.7 β -桉木醇和替加环素的协同抗菌机制

2.7.1 β -桉木醇能显著增加细菌胞内替加环素的累积量

抗生素在细菌胞内的累积量是其发挥抗菌作用的关键^[28]。通过液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定 β -桉木醇和替加环素联合使用及替加环素单独使用时细菌胞内替加环素的累积量。结果显示,单独使用替加环素时,细菌胞内替加环

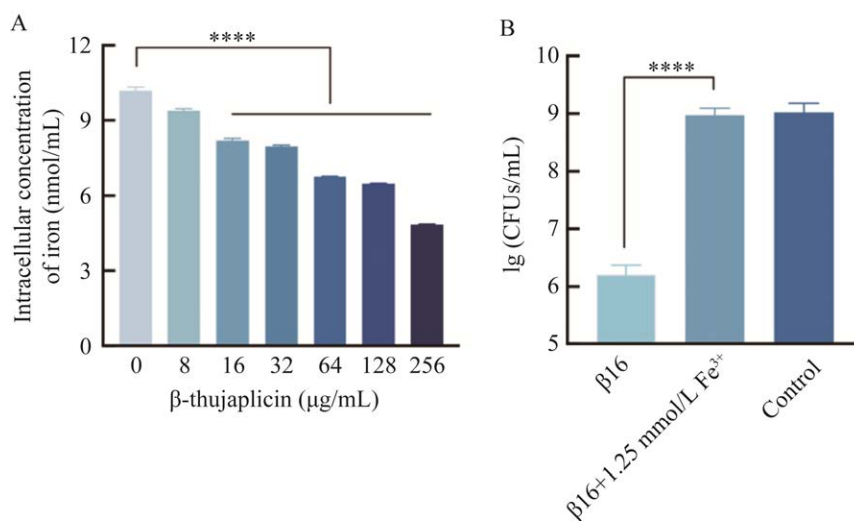


图3 β -桉木醇对细菌铁稳态的影响 A: β -桉木醇对大肠杆菌 J53-47R 胞内铁含量的影响. B: 补充 Fe^{3+} 对 β -桉木醇杀菌效果的影响. 差异显著性采用单因素方差分析(one-way ANOVA) (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$)

Figure 3 Effects of β -thujaplicin on bacterial iron homeostasis. A: Effect of β -thujaplicin on the intracellular iron concentration of *E. coli* J53-47R. B: Effect of supplementing ferric ion on rescuing β -thujaplicin mediated killing of *E. coli* J53-47R. The significances were determined by one-way ANOVA (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$).

素的累积量为 (22.74 ± 1.22) nmol/ 10^{10} CFUs; 而 β -桉木醇能呈浓度依赖性地增加细菌胞内替加环素的累积量。当 β -桉木醇浓度为 128 $\mu\text{g/mL}$ 时,

细菌胞内替加环素累积量是单独使用替加环素组的 20 倍以上(图 5A)。结果表明 β -桉木醇能显著增加替加环素在细菌胞内的累积量。

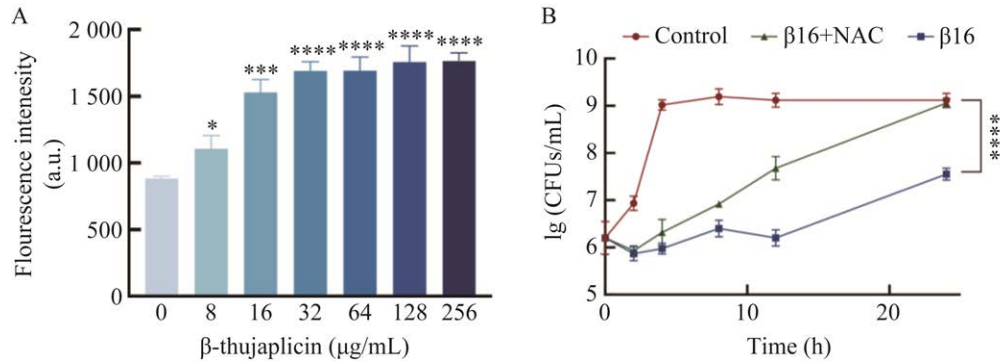


图 4 β -桉木醇对细菌 ROS 积累量的影响 A: β -桉木醇处理 1 h 后, 大肠杆菌 J53-47R 胞内 ROS 含量的变化. B: NAC 对 β -桉木醇杀菌效果的影响. 差异显著性采用单因素方差分析(one-way ANOVA) (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$)

Figure 4 Effects of β -thujaplicin on bacterial ROS generation. A: Intracellular ROS level of *E. coli* J53-47R after 1 h treatment with β -thujaplicin. B: Effect of NAC on rescuing β -thujaplicin mediated killing of *E. coli* J53-47R. The significances were determined by one-way ANOVA (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$).

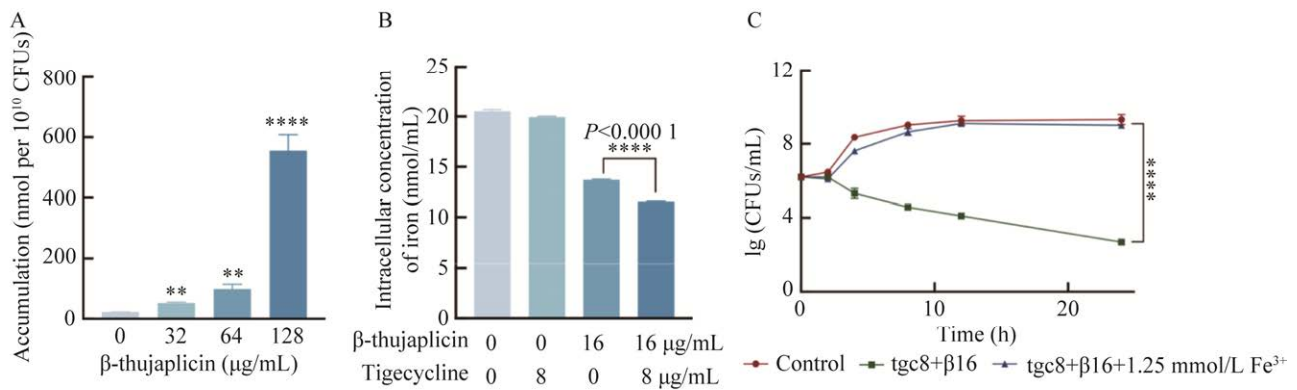


图 5 β -桉木醇联合替加环素对细菌胞内替加环素累积量和铁含量的影响 A: β -桉木醇处理 30 min 后, 大肠杆菌 J53-47R 胞内替加环素累积量. B: β -桉木醇和替加环素单独或联合使用对大肠杆菌 J53-47R 胞内铁含量的影响. C: 补充 Fe^{3+} 对 β -桉木醇和替加环素联合杀菌效果的影响. 差异显著性采用单因素方差分析(one-way ANOVA) (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$)

Figure 5 Effects of β -thujaplicin combined with tigecycline on bacterial intracellular tigecycline accumulation and iron content. A: Intracellular tigecycline accumulation of *E. coli* J53-47R after β -thujaplicin treatment for 30 min. B: Effect of β -thujaplicin and tigecycline monotherapy or combination on the intracellular iron content of *E. coli* J53-47R. C: Effect of supplementing ferric ion on rescuing β -thujaplicin combined with tigecycline mediated killing of *E. coli* J53-47R. The significances were determined by one-way ANOVA (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$).

2.7.2 β -桉木醇和替加环素联合使用可降低细菌胞内铁含量

已有研究表明四环素类药物也具有铁螯合作用^[29]。为进一步探究桉木醇和替加环素的联合抗菌机制,本研究采用铁测定试剂盒,分别在单独使用替加环素(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 β -桉木醇(16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或两者联合使用处理细菌 1 h 后,进行细菌胞内铁含量测定。结果显示,与替加环素单独使用相比,替加环素与 β -桉木醇联合使用显著降低了细菌胞内铁含量(图 5B)。此外,进一步探究补充 Fe^{3+} 对 β -桉木醇与替加环素协同抗菌作用的影响。结果显示替加环素(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 β -桉木醇(16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)联合使用时具有显著的杀菌作用;而补充 Fe^{3+} 显著抑制了该联用组合的杀菌效果(图 5C)。结果表明 β -桉木醇联合替加环素能协同降低细菌胞内铁含量,从而实现协同抗菌效果。

3 讨论

近年来,可转移 *tet(X)*基因及其变异体的广泛流行对替加环素的临床疗效造成了潜在威胁。在新药研发速度不断放缓的现状下,合理充分地利用现有抗菌药物是极为重要的研究课题。鉴于抗生素佐剂能逆转细菌对现有药物耐药性,开发抗生素佐剂是目前遏制耐药性进一步发展的重要手段之一^[30]。天然化合物因具有结构多样、生物活性丰富等特点,是抗生素佐剂开发的重要储库^[31-32]。于是,本研究通过对天然化合物库进行高通量筛选,发现 β -桉木醇联合替加环素对 *tet(X4)*基因阳性大肠杆菌在体外具有协同抗菌效果。同时, β -桉木醇对多种正常人类细胞系均具有较低的细胞毒性^[33]。因此, β -桉木醇与替加环素联合使用治疗 *tet(X4)*基因阳性大肠杆菌造成的体内感染具有进一步探索的潜力。

β -桉木醇通过干扰铁稳态、增大细菌细胞膜通透性从而发挥抗菌作用。本研究发现, β -桉木

醇能呈浓度依赖性地降低大肠杆菌胞内铁含量,并造成 ROS 的积累,从而发挥抗菌作用。同时,补充 Fe^{3+} 可抑制 β -桉木醇的抗菌作用,进一步证实了引起铁代谢紊乱是 β -桉木醇发挥抗菌作用的关键因素。该结果与前期研究发现的 β -桉木醇抗真菌机制类似。 β -桉木醇可通过降低念珠菌胞内的铁含量,抑制念珠菌线粒体的呼吸作用,最终导致胞内 ATP 的下降和 ROS 的积累^[34]。铁对细菌的生长和繁殖都至关重要,其参与了电子传递、DNA 合成和三羧酸循环等诸多重要的生物学过程^[35]。因此,基于扰乱细菌铁稳态的理念开发新型抗菌药物具有良好的前景。此外,本研究发现 β -桉木醇能增大细菌细胞膜的通透性,这可能与该天然化合物和细菌细胞膜成分相互作用有关,但具体机制仍需进一步探究。

目前,替加环素和其他抗生素联用已广泛应用于细菌感染的治疗,但多重耐药菌的出现和蔓延严重影响该联用组合的疗效^[36]。与传统的抗生素联用策略不同,抗生素佐剂不仅能够增强抗生素的抗菌效果,还能延缓细菌耐药性的发展^[30]。已有研究表明一些替加环素佐剂可通过改变细菌细胞膜通透性、抑制 *Tet(X)*酶活性等机制实现对替加环素的增效作用。例如,WRK-12^[37]、WW307^[38]等抗菌肽通过改变细胞膜的通透性,扰乱细菌质子动势,引起胞内 ROS 的积累,最终导致细菌死亡。齐多夫定^[13]、兰雪醌^[14]、 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ^[39]等通过与 *Tet(X)*的催化口袋结合,抑制 *Tet(X)*酶活性,从而恢复耐药菌对替加环素的敏感性。而本研究发现, β -桉木醇不仅能增大大肠杆菌细胞膜的通透性,进而促进细菌胞内替加环素的蓄积;同时, β -桉木醇还能联合替加环素进一步降低细菌胞内的铁含量,干扰细菌铁稳态,从而增强替加环素对 *tet(X4)*阳性大肠杆菌的抗菌效果。此外, β -桉木醇通过扰乱细菌铁稳态对替加环素的增效机制可为后续替加环素佐

剂的开发提供新思路。

综上所述, β -桉木醇通过增大细菌细胞膜通透性, 干扰铁稳态, 导致胞内 ROS 的积累, 从而发挥抗菌作用。同时, β -桉木醇联合替加环素不仅能共同干扰细菌铁稳态, 还能增加细菌胞内替加环素的累积量, 从而增强替加环素对 *tet(X4)* 基因阳性大肠杆菌的抗菌效果。此外, β -桉木醇表现较低的溶血性和细胞毒性, 且不易产生耐药性。因此, β -桉木醇协同替加环素对治疗替加环素耐药菌感染具备良好的开发和应用前景。

REFERENCES

- [1] FERRI M, RANUCCI E, ROMAGNOLI P, GIACCONE V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(13): 2857-2876.
- [2] SHEU CC, CHANG YT, LIN SY, CHEN YH, HSUEH PR. Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an update on therapeutic options[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 80.
- [3] ZHANEL GG, HOMENUIK K, NICHOL K, NOREDDIN A, VERCAIGNE L, EMBIL J, GIN A, KARLOWSKY JA, HOBAN DJ. The glycolcyclines: a comparative review with the tetracyclines[J]. *Drugs*, 2004, 64(1): 63-88.
- [4] 马剑钢. 动物源携带 *tet(X3)/tet(X4)* 基因的细菌耐药性及传播特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2021.
MA JG. Study on antimicrobial resistance and transmission characteristics of the bacteria carrying *tet(X3)/tet(X4)* gene from animal sources[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [5] 朱瑞奇. 猪源大肠埃希菌替加环素耐药机制研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2021.
ZHU RQ. Study on the mechanism of tigecycline resistance of porcine *Escherichia coli*[D]. Chongqing: Maater's Thesis of Southwest University, 2021 (in Chinese).
- [6] HE T, WANG R, LIU DJ, WALSH TR, ZHANG R, LV Y, KE YB, JI QJ, WEI RC, LIU ZH, SHEN YB, WANG G, SUN LC, LEI L, LV ZQ, LI Y, PANG MD, WANG LY, SUN QL, FU YL, et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(9): 1450-1456.
- [7] SUN J, CHEN C, CUI CY, ZHANG Y, LIU X, CUI ZH, MA XY, FENG YJ, FANG LX, LIAN XL, ZHANG RM, TANG YZ, ZHANG KX, LIU HM, ZHUANG ZH, ZHOU SD, LV JN, DU H, HUANG B, YU FY, MATHEMA B, KREISWIRTH BN, LIAO XP, CHEN L, LIU YH. Plasmid-encoded *tet(X)* genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(9): 1457-1464.
- [8] DONG N, ZENG Y, CAI C, SUN CT, LU JY, LIU CC, ZHOU HW, SUN QL, WANG HY, WANG Y, WANG SL, WU CM, CHAN EW, CHEN GX, SHEN ZQ, CHEN S, ZHANG R. Prevalence, transmission, and molecular epidemiology of *tet(X)*-positive bacteria among humans, animals, and environmental niches in China: an epidemiological, and genomic-based study[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 818: 151767.
- [9] YU Y, CUI CY, KUANG X, CHEN C, WANG MG, LIAO XP, SUN J, LIU YH. Prevalence of *tet(X4)* in *Escherichia coli* from duck farms in southeast China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 716393.
- [10] CUI CY, LI XJ, CHEN C, WU TX, HE Q, JIA QL, ZHANG XJ, LIN ZY, LI C, FANG LX, LIAO XP, LIU YH, HU B, SUN J. Comprehensive analysis of plasmid-mediated *tet(X4)*-positive *Escherichia coli* isolates from clinical settings revealed a high correlation with animals and environments-derived strains[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 806: 150687.
- [11] COX G, SIERON A, KING AM, PASCALE GD, PAWLOWSKI AC, KOTEVA K, WRIGHT GD. A common platform for antibiotic dereplication and adjuvant discovery[J]. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(1): 98-109.
- [12] LIU Y, LI RC, XIAO X, WANG ZQ. Antibiotic adjuvants: an alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2019, 45(3): 301-314.
- [13] LIU Y, JIA YQ, YANG KN, LI RC, XIAO X, WANG ZQ. Anti-HIV agent azidothymidine decreases *tet(X)*-mediated bacterial resistance to tigecycline in *Escherichia coli*[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 162.
- [14] XU L, ZHOU YL, NIU S, LIU ZY, ZOU YN, YANG YN, FENG HH, LIU DJ, NIU XD, DENG XM, WANG Y, WANG JF. A novel inhibitor of monooxygenase reversed the activity of tetracyclines against *tet(X3)/tet(X4)*-positive bacteria[J]. *EBioMedicine*, 2022, 78: 103943.
- [15] WRIGHT GD. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2017, 34(7): 694-701.
- [16] ARIMA Y, NAKAI Y, HAYAKAWA R, NISHINO T. Antibacterial effect of β -thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis: relationship between changes in the number of viable bacterial cells and clinical improvement in an eczematous lesion of atopic dermatitis[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51(1): 113-122.
- [17] TRUST TJ, COOMBS RW. Antibacterial activity of beta-thujaplicin[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1973, 19(11): 1341-1346.

- [18] SONG MR, LIU Y, LI TT, LIU XJ, HAO ZH, DING SY, PANICHAYUPAKARANANT P, ZHU K, SHEN JZ. Plant natural flavonoids against multidrug resistant pathogens[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(15): 2100749.
- [19] MA Y, GUO ZY, XIA BB, ZHANG YW, LIU XL, YU Y, TANG N, TONG XM, WANG M, YE X, FENG J, CHEN YH, WANG J. Identification of antimicrobial peptides from the human gut microbiome using deep learning[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(6): 921-931.
- [20] HAN FF, GAO YH, LUAN C, XIE YG, LIU YF, WANG YZ. Comparing bacterial membrane interactions and antimicrobial activity of porcine lactoferricin-derived peptides[J]. *Journal of Dairy Science*. 2013, 96(6): 3471-87.
- [21] SONG MR, LIU Y, HUANG XY, DING SY, WANG Y, SHEN JZ, ZHU K. A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(8): 1040-1050.
- [22] SONG RH, YU B, FRIEDRICH D, LI JF, SHEN H, KRAUTSCHEID H, HUANG SD, KIM MH. Naphthoquinone-derivative as a synthetic compound to overcome the antibiotic resistance of methicillin-resistant *S. aureus*[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 529.
- [23] TONG ZW, XU TQ, DENG T, SHI JR, WANG ZQ, LIU Y. Benzylamine reverses TMexCD-TOprJ-mediated high-level tigecycline resistance in Gram-negative bacteria[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(9): 907.
- [24] BRAUN V, HANTKE K. Recent insights into iron import by bacteria[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(2): 328-334.
- [25] WANG J, PANTOPOULOS K. Regulation of cellular iron metabolism[J]. *The Biochemical Journal*, 2011, 434(3): 365-381.
- [26] GRILLO AS, SANTAMARIA AM, KAFINA MD, CIOFFI AG, HUSTON NC, HAN MR, SEO YA, YIEN YY, NARDONE C, MENON AV, FAN J, SVOBODA DC, ANDERSON JB, HONG JD, NICOLAU BG, SUBEDI K, GEWIRTH AA, WESSLING-RESNICK M, KIM J, PAW BH, BURKE MD. Restored iron transport by a small molecule promotes absorption and hemoglobinization in animals[J]. *Science*, 2017, 356(6338): 608-616.
- [27] ZHANG JY, LI XH, OLMEDO M, HOLDORF AD, SHANG Y, ARTAL-SANZ M, YILMAZ LS, WALHOUT AJM. A delicate balance between bacterial iron and reactive oxygen species supports optimal *C. elegans* development[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 26(3): 400-411.e3.
- [28] RICHTER MF, DROWN BS, RILEY AP, GARCIA A, SHIRAI T, SVEC RL, HERGENROTHER PJ. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic[J]. *Nature*, 2017, 545(7654): 299-304.
- [29] GRENIER D, HUOT MP, MAYRAND D. Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to these antibiotics[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(3): 763-766.
- [30] BAND VI, HUFNAGEL DA, JAGGARAPU S, SHERMAN EX, WOZNIAK JE, SATOLA SW, FARLEY MM, JACOB JT, BURD EM, WEISS DS. Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(10): 1627-1635.
- [31] LI JWH, VEDERAS JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?[J]. *Science*, 2009, 325(5937): 161-165.
- [32] 程鹏, 熊静, 李会, 王士源, 张阳, 梅翠, 伍雪晴, 何玉张, 陈红伟. 植物提取物及其活性成分抑制细菌生物被膜的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(5): 1753-1767.
- [33] CHENG P, XIONG J, LI H, WANG SY, ZHANG Y, MEI C, WU XQ, HE YZ, CHEN HW. Using plant extracts and their active ingredients to inhibit bacterial biofilms[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(5): 1753-1767 (in Chinese).
- [34] YASUMOTO E, NAKANO K, NAKAYACHI T, MORSHED SRM, HASHIMOTO K, KIKUCHI H, NISHIKAWA H, KAWASE M, SAKAGAMI H. Cytotoxic activity of deferiprone, maltol and related hydroxyketones against human tumor cell lines[J]. *Anticancer Research*, 2004, 24(2B): 755-762.
- [35] JIN XY, ZHANG M, LU JH, DUAN XM, CHEN JY, LIU Y, CHANG WQ, LOU HX. Hinokitiol chelates intracellular iron to retard fungal growth by disturbing mitochondrial respiration[J]. *Journal of Advanced Research*, 2021, 34: 65-77.
- [36] 王志鹏, 于海英, 马旅雁. 铜绿假单胞菌铁摄取调节子 Fur 诱导表达突变株构建及表型分析[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3253-3267.
- [37] WANG ZP, YU HY, MA LY. Construction and phenotypic study of *Pseudomonas aeruginosa* inducibly expressing a ferric uptake regulator[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(9): 3253-3267 (in Chinese).
- [38] SUN LL, SUN L, LI X, HU XX, WANG XK, NIE TY, ZHANG YW, YOU XF. A novel tigecycline adjuvant ML-7 reverses the susceptibility of tigecycline-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 11: 809542.
- [39] LIU Y, SHI JR, TONG ZW, JIA YQ, YANG KN, WANG ZQ. Potent broad-spectrum antibacterial activity of amphiphilic peptides against multidrug-resistant bacteria[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(9): 1398.
- [40] SHI JR, CHEN C, WANG DJ, TONG ZW, WANG ZQ, LIU Y. Amphiphilic peptide antibiotics with potent activity against multidrug-resistant pathogens[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(4): 438.
- [41] DENG T, JIA YQ, TONG ZW, SHI JR, WANG ZQ, LIU Y. Bismuth drugs reverse *tet(X)*-conferred tigecycline resistance in Gram-negative bacteria[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e01578-21.

(本文责编 郝丽芳)