

研究报告

多黏菌素 A1 介导耐药铜绿假单胞菌羟自由基致死的机理

吴雅萍^{1,2}, 杨曦澜², 刘冬梅^{*2}

1 漳州职业技术学院 食品工程学院, 福建 漳州 363000

2 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510640

吴雅萍, 杨曦澜, 刘冬梅. 多黏菌素 A1 介导耐药铜绿假单胞菌羟自由基致死的机理[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2803-2815.

WU Yaping, YANG Xilan, LIU Dongmei. Mechanism of polymyxin A1-mediated hydroxyl radical lethality in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2803-2815.

摘要: 【背景】多黏菌素被誉为对抗多重耐药菌感染的最后一道防线, 而多黏菌素 A1 是该家族中很少被探究的同系物, 其对耐药性铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 具有良好的杀菌效果。【目的】探究对 *P. aeruginosa* PAO1 的杀菌机理。【方法】首先通过荧光探针测定了多黏菌素 A1 处理后细胞内羟自由基变化; 然后通过添加硫脲和联吡啶探究对多黏菌素 A1 介导的杀菌效果和羟自由基产生的影响; 接着通过表型分析细胞内氧自由基(reactive oxygen species, ROS)、脂质过氧化物、DNA 损伤、总铁离子和亚铁离子变化来表征羟自由基引起的死亡; 最后利用实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 分析通路基因表达来进一步验证羟自由基致死机理。【结果】多黏菌素 A1 处理引起 *P. aeruginosa* PAO1 羟自由基产生, 硫脲和联吡啶可以有效缓解多黏菌素 A1 对细胞的致死效果并降低羟自由基含量; 多黏菌素 A1 处理后细胞内 ROS 和脂质氧化水平提高, 同时引起 DNA 损伤和亚铁离子的紊乱; 此外, 细胞 ROS 清除酶基因、铁摄取和铁硫簇修复相关基因, 以及 DNA 损伤修复基因表达水平均显著提高。【结论】多黏菌素 A1 对耐药性铜绿假单胞菌的一种致死机理可能是介导细胞通过芬顿反应产生羟自由基, 羟自由基损伤 DNA、脂质从而导致细胞死亡。

关键词: 多黏菌素 A1; 铜绿假单胞菌 PAO1; 羟自由基; 基因表达

资助项目: 漳州职业技术学院博士启动基金(ZZYB2408); 广州市科技计划(2024B03J1313)

This work was supported by the Doctoral Initiation Fund of Zhangzhou Institute of Technology (ZZYB2408) and the Guangzhou Science and Technology Program (2024B03J1313).

*Corresponding author. E-mail: liudm@scut.edu.cn

Received: 2024-10-02; Accepted: 2024-12-23; Published online: 2025-01-26

Mechanism of polymyxin A1-mediated hydroxyl radical lethality in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

WU Yaping^{1,2}, YANG Xilan², LIU Dongmei^{*2}

1 College of Food Engineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, Fujian, China

2 School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: [Background] Polymyxins are considered as the last line of defense against multidrug-resistant (MDR) infections, and polymyxin A1 with a bactericidal effect against MDR *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is a rarely studied homolog in this family. [Objective] To explore the effect of polymyxin A1 on *P. aeruginosa* PAO1. [Methods] A fluorescent probe was used to measure the hydroxyl radical level in the cells treated with polymyxin A1. Then, thiourea and bipyridine were added, and their effects on the bactericidal effect of polymyxin A1 and the production of intracellular hydroxyl radicals were investigated. Subsequently, hydroxyl radical-induced death was characterized in terms of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxides, DNA damage, and changes in total iron and ferrous iron ions. Finally, RT-qPCR was employed to determine the expression of genes involved in hydroxyl radical lethality. [Results] The level of hydroxyl radicals in *P. aeruginosa* PAO1 was increased by the treatment with polymyxin A1, and the addition of thiourea and bipyridine lowered the level of hydroxyl radicals and attenuated the lethality. Polymyxin A1 elevated the levels of lipid oxidation and ROS, damaged bacterial DNA, and caused a disorder of ferrous iron ion. In addition, the expression levels of genes encoding ROS scavenging enzymes, iron uptake and iron-sulfur cluster repair, and DNA repair were up-regulated in the cells treated with polymyxin A1. [Conclusion] Polymyxin A1 may kill MDR *P. aeruginosa* PAO1 by regulating the production of hydroxyl radicals through the Fenton reaction, which damaged DNA and lipids and led to cell death.

Keywords: polymyxin A1; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; hydroxyl radicals; gene expression

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种机会致病菌,对外界抵抗力较其他细菌强,容易引起感染患者并发败血症、肺部感染、脑膜炎等疾病^[1],并且具有多重耐药性。抗生素滥用导致的耐药菌泛滥,特别是多重耐药(multidrug resistance, MDR)菌株的重症感染率不断增多,常用抗生素如 β -内酰胺类、氨基糖苷类和喹诺酮类抗生素对这些耐药菌收效甚微^[2-3]。多黏菌素是一种环状阳离子脂肽,其基本结构由一个环状七肽和N端被脂肪酸酰化的三肽侧链组成^[4-5]。随着其他抗生素对MDR菌株无效,

多黏菌素被誉为对抗多重耐药菌的“最后一道防线”^[6-7]。目前,多黏菌素家族的杀菌机制主要有与脂多糖结合机制、囊泡-囊泡接触的替代机制及羟自由基致死机制这3种。人们普遍认为多黏菌素的抑菌机制主要是通过与细胞壁(外膜)的脂多糖结合,多黏菌素分子将其疏水性N-端脂肪乙酰链和第6、7位的疏水氨基酸插入细胞外膜,从而破坏细胞内膜和外膜的磷脂双分子层结构导致细胞裂解死亡^[8-9]。另外,也有人提出了囊泡-囊泡接触的替代机制,认为多黏菌素可以介导细胞外膜和内膜周质小叶之间的

接触并促进囊泡间磷脂的交换,在静电相互作用及疏水作用下多黏菌素分子可以进入和穿过细胞外膜并诱导内外膜之间的脂质交换,引发磷脂成分特异性的丧失从而导致渗透失衡和细胞裂解^[10-11]。此外,最新研究表明多黏菌素也可通过氧化应激形成并积累羟自由基从而诱发细胞快速死亡,当多黏菌素进入细胞后,细胞内形成过氧化物自由基(O_2^-)并在超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)作用下转化为 H_2O_2 ,而 O_2^- 和 H_2O_2 会损伤 Fe-S 簇,使其释放 Fe^{2+} ,然后 H_2O_2 和 Fe^{2+} 相互作用使得 Fe^{2+} 变成 Fe^{3+} 并生成羟自由基($\cdot OH$),这个反应也被称为芬顿(Fenton)反应, $\cdot OH$ 会导致 DNA、脂质和蛋白质的氧化损伤,并最终导致细胞死亡^[12]。例如 Sampson 等^[13]研究表明多黏菌素 E 通过介导羟自由基产生而引起鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)死亡;Dubey 等^[14]发现利福平和多黏菌素 B 联用可以有效杀灭耐药性鲍曼不动杆菌,进一步研究发现是因为利福平能够靶向耐药菌株超氧化物歧化酶表达水平下调进而增强多黏菌素 B 引起的羟自由基致死;然而,对于多黏菌素引起的羟自由基致死机制的研究也存在一些异议,如 Brochmann 等^[2]发现多黏菌素 E 对浮游铜绿假单胞菌的杀菌作用与羟基自由基的形成无关。

目前,对于多黏菌素抑菌机制的研究主要集中于商业上应用的多黏菌素 B 和多黏菌素 E,对于多黏菌素的其他同系物的研究罕有报道。Wu 等^[15]从腌制酸笋中分离出一株具有抑菌活性的解硫胺芽孢杆菌(*Paenibacillus thiamolyticus*) SY20 并从中纯化出一种罕见的多黏菌素 A1,它对革兰氏阴性菌如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、阪崎氏肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等具有良好的杀菌效果,尤其对卡那霉素和氨苄西林耐药的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* PAO1)的最小抑菌浓度为 0.25 $\mu g/mL$ 。因此,本

研究主要以耐药性 *P. aeruginosa* PAO1 为研究对象,探究多黏菌素 A1 处理过程中是否介导细胞产生羟自由基从而导致细胞死亡。

1 材料与方法

1.1 样品

铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PAO1 具有卡那霉素和氨苄西林抗性,由北京大学惠赠。多黏菌素 A1 为前期课题组从 *P. thiamolyticus* SY20 菌株中分离纯化获得,纯度为 95%左右。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

Mueller-Hinton (MH)培养基,广东环凯生物科技有限公司。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、硫脲、2,2-联吡啶和诺氟沙星,阿拉丁试剂(上海)有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS),生工生物工程(上海)股份有限公司;2,7-二氯荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCFDA)、荧光探针和羟苯基荧光素(hydroxyphenyl fluorescein, HPF),ApexBio 公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;总铁离子和亚铁离子比色法测试盒,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;SYBR[®] Select Master Mix (2 $\times$) RT-PCR 试剂盒,ABI 公司;HiScript Q RT SuperMix 反转录试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;TRIzol RNA 提取试剂盒,赛默飞世尔科技公司。

荧光定量 PCR 仪,ABI 公司;超净工作台,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;恒温振荡培养箱,广州市泉宏科学仪器有限公司;微量离心机和分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;全自动酶标仪, Bio-Rad 公司。

1.3 细胞内羟自由基的检测

细胞羟自由基采用 HPF 进行检测^[13]。将 *P. aeruginosa* PAO1 接种于 MH 培养基中,于 28 $^{\circ}C$ 活化过夜,活化后以 2%接种量转接至 MH 培养基中,28 $^{\circ}C$ 、180 r/min 培养至对数中期

(OD_{600} 约为 0.5)。先将培养至对数中期的铜绿假单胞菌悬液于 $3\ 000\times g$ 离心 5 min, 用生理盐水洗涤 2 次, 再将菌浓度稀释为 10^6 CFU/mL; 避光加入 HPF 使得其终浓度为 $5\ \mu\text{mol/L}$ 并于 $30\ ^\circ\text{C}$ 孵育 30 min; 然后将菌悬液加入黑色 96 孔板中, 并加入多黏菌素 A1 和诺氟沙星使药品浓度分别为 $2\ \mu\text{g/mL}$ 和 $1\ \mu\text{g/mL}$; 最后, 用酶标仪检测孔中荧光强度(设置激发波长为 $490\ \text{nm}$, 发射波长为 $515\ \text{nm}$), 未添加药品组为阴性对照, 添加诺氟沙星组为阳性对照。

1.4 铜绿假单胞菌时间-杀菌曲线

按照 1.3 所述方法获得铜绿假单胞菌菌体, 重悬菌体使菌悬液浓度为 10^6 CFU/mL; 然后, 分别往试管中加入多黏菌素 A1 和诺氟沙星使其浓度分别为 $2\ \mu\text{g/mL}$ 和 $1\ \mu\text{g/mL}$, 并于 $28\ ^\circ\text{C}$ 孵育 3 h, 其间对各组样品间隔 0.5 h 取样; 最后, 将所取的样品进行梯度稀释后, 用 MH 培养基进行活菌计数。

1.5 硫脲和联吡啶对多黏菌素 A1 介导的铜绿假单胞菌羟自由基产生和细胞存活的影响

硫脲和联吡啶添加对羟自由基产生影响的检测方法如 1.3。其中, 将多黏菌素 A1 与硫脲或联吡啶一起加入 96 孔板中, 使硫脲和联吡啶在孔中的浓度分别为 $150\ \text{mmol/L}$ 和 $500\ \mu\text{mol/L}$ 。细菌存活按照 1.4 所述进行检测。

1.6 细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生的测定

细胞活性氧的测定采用 DCFDA 荧光探针^[16-17]。首先将培养至对数中期的铜绿假单胞菌按照 1.3 所述方法进行离心和洗涤; 然后, 用 DMSO 将 DCFDA 配成终浓度为 $10\ \text{mmol/L}$ 的母液, 并用 PBS 缓冲液将母液稀释成 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 DCFDA 工作液; 将洗涤后的菌体用 DCFDA 工作液重悬并置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 以便使荧光探针充分被菌体吸收; 随后, 离心并用 PBS 缓冲液洗涤和重悬菌体, 再将 $90\ \mu\text{L}$ 菌悬液加入黑色 96 孔板中随即往每孔中加入浓度分别为

0.5 、 1.0 、 2.0 和 $4.0\ \mu\text{g/mL}$ 的多黏菌素 A1 孵育 15 min; 最后, 以无菌水组作为对照, 利用酶标仪读取每孔的荧光强度, 设置激发波长 $492\ \text{nm}$, 发射波长 $515\ \text{nm}$ 。

1.7 细胞中氧化脂质含量的测定

羟自由基能够促进脂质的过氧化, 并产生 MDA 等物质^[18]。使用 MDA 含量检测试剂盒进行细胞中氧化脂质含量的检测。首先, 将培养至对数中期的铜绿假单胞菌稀释至 10^8 CFU/mL; 然后, 向稀释后的菌液加入浓度分别为 0 、 0.5 、 1.0 、 5.0 和 $10.0\ \mu\text{g/mL}$ 的多黏菌素 A1 并于 $30\ ^\circ\text{C}$ 孵育 3 h 后离心收集菌体; 最后使用试剂盒对不同处理组 MDA 含量进行定量, 以 $30.0\ \text{mmol/L}$ H_2O_2 溶液处理后的铜绿假单胞菌为阳性对照, 用酶标仪检测各组在 $532\ \text{nm}$ 和 $600\ \text{nm}$ 的吸光度, 按照公式(1)计算 MDA 含量:

$$\text{MDA (nmol)} = \frac{\frac{\Delta A \times V_{\text{all}}}{\epsilon d} \times 10^9 \times V_{\text{extract}}}{500 \times V_{\text{sample}}} \times F \times 10^4 \quad (1)$$

式中: V_{all} 为反应体系总体积, ϵ 为 MDA 摩尔吸光度 [$1.55 \times 10^5\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$], V_{sample} 为加入样品体积, d 为比色皿光径, V_{extract} 为加入提取液体积, F 为稀释倍数。

1.8 DNA 损伤的测定

使用 DNA 凝胶电泳法检测多黏菌素 A1 处理后铜绿假单胞菌的 DNA 损伤情况, 将铜绿假单胞菌培养至对数中期, 用生理盐水重悬菌体后加入多黏菌素 A1 使药品浓度为 5 、 20 、 50 和 $100\ \mu\text{g/mL}$, 孵育一定时间后使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取铜绿假单胞菌的 DNA; 最后, 对已提取的 DNA 进行凝胶电泳检测被破坏情况。

1.9 细胞内总铁离子和亚铁离子含量的测定

多黏菌素 A1 处理后的铜绿假单胞菌中铁含量检测使用总铁离子和亚铁离子比色法测试盒^[16]。首先, 将铜绿假单胞菌培养至对数中期后用生理盐水重悬菌体; 然后加入多黏菌素 A1 使药品浓

度分别为 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$, 并于 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h; 最后, 使用总铁离子和亚铁离子比色法试剂盒对不同浓度多黏菌素 A1 处理后的铜绿假单胞菌中总铁离子和亚铁离子含量进行定量, 以未处理组作为阴性对照。

1.10 羟自由基致死通路基因表达

1.10.1 RNA 提取及 cDNA 合成

在重悬后的 *P. aeruginosa* PAO1 中加入一定浓度的多黏菌素 A1, 使药品终浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$, 未加药品的组为空白对照; 然后室温孵育 2 h 后 3 000 $\times g$ 离心 6 min, 弃去上清液后迅速用液氮终止反应, 并存储在 -80°C 。样品中的总 RNA 提取利用 TRIzol RNA 提取试剂盒, cDNA 合成采用 HiScript Q RT SuperMix 反转录试剂盒^[19]。

1.10.2 通路相关基因检索与引物设计

从 NCBI 数据库中查找 *P. aeruginosa* PAO1 基因组信息, 并检索 *gidB*、*fur*、*lexA*、*recA*、*sodM*、*sodB*、*iscA* 和 *iscR* 基因序列信息, 使用 Primer 5 软件设计引物, 由武汉天一华煜基因科技有限公司进行相关引物的合成, 内参基因

及引物序列如表 1 所示。

1.10.3 实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)

使用 ABI 公司的 SYBR[®] Select Master Mix (2 $\times$) RT-PCR 试剂盒在荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR 实验, 反应体系和条件参考文献[19]。

1.10.4 基因表达分析和数据处理

每个样品测 3 次平行, 每组平行 $C_t < 35$ 且差异不超过 0.5 视为符合质控标准。基因相对表达量分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行计算(以 *gidB* 作为内参基因)。所有数据的表示方法均使用平均值 $\pm$ 标准误差, 每个实验做 3 个平行, 利用 GraphPad Prism8 作图和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 多黏菌素 A1 介导铜绿假单胞菌羟自由基的产生

HPF 是一种细胞可渗透、光稳定的荧光素, 可作为高活性氧的高度灵敏荧光探针, 它本身无荧光, 当与高活性氧(如 $\cdot\text{OH}$)反应被氧化后会转化为强荧光分子^[20], 所以检测荧光强度即可

表 1 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 中待检测基因引物序列设计

Table 1 Primer sequences of polymyxin synthesis and regulation genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

基因名称	基因功能	引物序列	产物大小
Gene name	Gene function	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
内参基因 <i>gidB</i>	16S rRNA 甲基转移酶	CCGAGGCTGGGGATAACT	117
Reference gene <i>gidB</i>	16S ribosomal RNA methyltransferase	TCTTCTTGCCGTTGCTGT	
<i>fur</i>	铁摄取转录调节蛋白	ACCGTCTATCGGGTGCTG	181
	Iron uptake of transcriptional regulatory protein	TTTCCTTCTGGCGCTTCT	
<i>lexA</i>	转录阻遏蛋白	ATCCTGCCGTATCAATCCC	183
	Transcriptional repressor protein	CGTTTCACCGTGACCTCC	
<i>recA</i>	重组酶 A	AAGTTCTACGCCTCGGTCC	111
	Recombinase A	GGAAACCTTGTTCTTCACCA	
<i>sodM</i>	超氧化物歧化酶(Mn-SOD)	CTTGCCTTACGCCTACGA	244
	Superoxide dismutase (Mn-SOD)	CATCACGGTCCAGAACAGC	
<i>sodB</i>	超氧化物歧化酶(Fe-SOD)	CCACGACAAGCACCACAA	167
	Superoxide dismutase (Fe-SOD)	GGCTCAGGCAGTTCCAGTA	
<i>iscA</i>	铁结合蛋白	CGAGGGTATCCGTCTTGG	197
	Iron-binding protein	TGAAGCCTTCGTTGAGCC	
<i>iscR</i>	HTH 型转录调控因子	GGCGATACCTGTCTGACCC	73
	HTH-type transcriptional regulator	TGATGCCGCTGAGGAACT	

反映细胞内羟自由基的产生情况。诺氟沙星作为一种喹诺酮类抗生素,已经被证明会介导大肠杆菌细胞产生羟自由基从而导致细胞死亡^[21],如图 1A 所示,相较于对照组,诺氟沙星和多黏菌素 A1 处理 *P. aeruginosa* PAO1 均会引起荧光强度增加,说明多黏菌素 A1 处理也能诱导细胞产生羟自由基。此外,检测 2 种抗生素作用下的杀菌曲线如图 1B 所示,多黏菌素 A1 处理引起 *P. aeruginosa* PAO1 活菌数明显下降,羟自由基含量也显著高于对照组,说明多黏菌素 A1 介导的铜绿假单胞菌致死可能与羟自由基产生有关。

2.2 硫脲对铜绿假单胞菌的拯救作用

硫脲是一种过氧化物清除剂,其添加对多黏菌素 A1 处理的 *P. aeruginosa* PAO1 具有一定的拯救作用(图 2)。从时间-杀菌曲线上看,单独添加 150 mmol/L 硫脲处理对 *P. aeruginosa* PAO1 的存活率基本无影响,说明该浓度硫脲对菌体本身无毒害作用也无促进作用(图 2A);相较于多黏菌素 A1 单独处理组,多黏菌素 A1 和

硫脲共同处理组 *P. aeruginosa* PAO1 的存活率明显提高(图 2B),而检测到的羟自由基产生量较单纯药物作用组反而有所降低(图 2C)。这可能是因为添加硫脲可以阻断多黏菌素 A1 介导的过氧化物的产生,进而减少 Fenton 反应产生的羟基自由基,从而减少细菌的死亡。

2.3 联吡啶对铜绿假单胞菌的拯救作用

Fenton 反应的前提是细胞内产生 H_2O_2 与 Fe^{2+} 相互作用,使得 Fe^{2+} 变成三价铁离子(Fe^{3+})并生成羟自由基^[22-24]。联吡啶是一种铁螯合剂,它能螯合 Fe^{2+} 从而有效阻断 Fenton 反应并降低羟自由基产生^[24]。相较于对照组,500 μ mol/L 联吡啶添加对 *P. aeruginosa* PAO1 的存活率基本无影响(图 3A);相较于多黏菌素 A1 单独处理组,同时添加多黏菌素 A1 和联吡啶可有效缓解多黏菌素 A1 对 *P. aeruginosa* PAO1 的杀伤力(图 3B)。此外,添加联吡啶可以显著降低 *P. aeruginosa* PAO1 羟自由基产生(图 3C),这可能

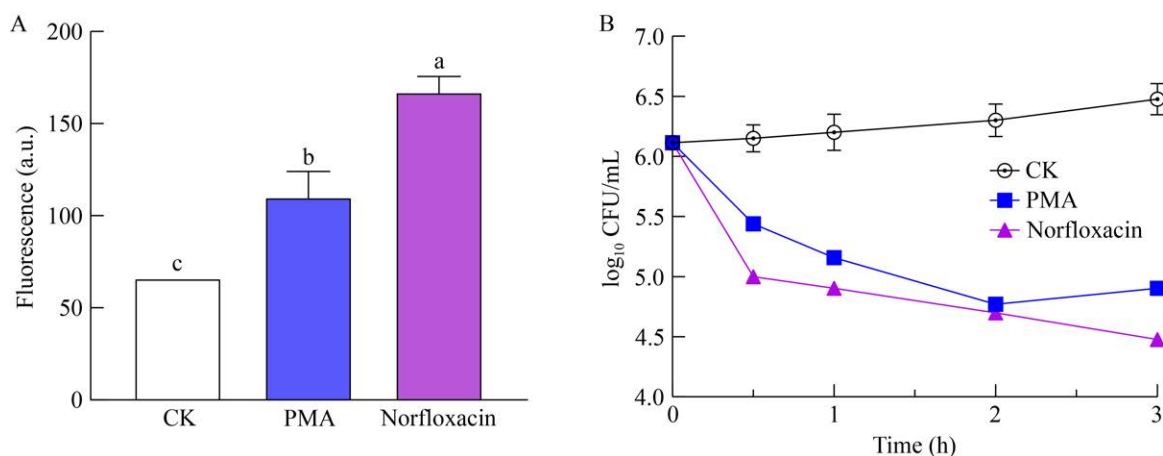


图 1 多黏菌素 A1 和诺氟沙星介导铜绿假单胞菌羟自由基产生 A: 多黏菌素 A1 和诺氟沙星诱导 *P. aeruginosa* PAO1 细胞羟自由基的产生; B: 多黏菌素 A1 和诺氟沙星对 *P. aeruginosa* PAO1 的杀菌-时间曲线。CK: 不添加多黏菌素 A1 的空白对照; PMA: 多黏菌素 A1 处理。不同小写字母表示不同组间差异显著($P<0.05$)。

Figure 1 The hydroxyl radical production was mediated by polymyxin A1 and norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A: The production of hydroxyl radicals in *P. aeruginosa* PAO1 was induced by polymyxin A1 and norfloxacin; B: Time-kill kinetics of polymyxin A1 and norfloxacin against *P. aeruginosa* PAO1. CK: Black control; PMA: Polymyxin A1 treatment. Different lowercase letters were significantly different ($P<0.05$).

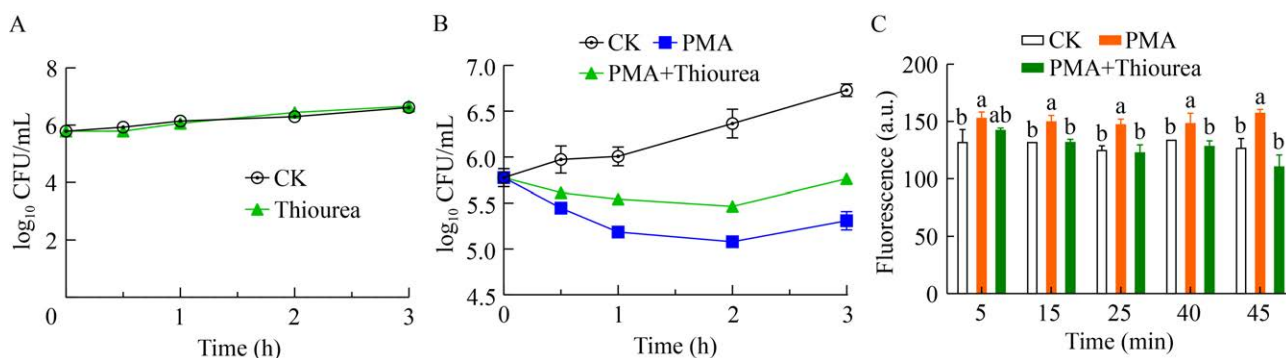


图 2 硫脲对多黏菌素 A1 介导的铜绿假单胞菌致死率以及羟自由基产量的影响 A: 硫脲添加对 *P. aeruginosa* PAO1 存活的影响; B: 硫脲添加减小多黏菌素 A1 对 *P. aeruginosa* PAO1 的杀伤力; C: 硫脲添加阻断多黏菌素 A1 介导的 *P. aeruginosa* PAO1 羟自由基产生。CK: 不添加多黏菌素 A1 的空白对照; PMA: 多黏菌素 A1 处理组。不同小写字母表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Figure 2 The effect of thiourea on polymyxin A1-mediated lethality and hydroxyl radical production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A: The survival effect of *P. aeruginosa* PAO1 by adding thiourea; B: Thiourea decreased the effect of polymyxin A1 on the lethality of *P. aeruginosa* PAO1; C: Thiourea lowered the level of hydroxyl radical mediated by polymyxin A1 in *P. aeruginosa* PAO1. CK: Black control without polymyxin A; PMA: Polymyxin A1 treatment. Different lowercase letters were significantly different ($P < 0.05$).

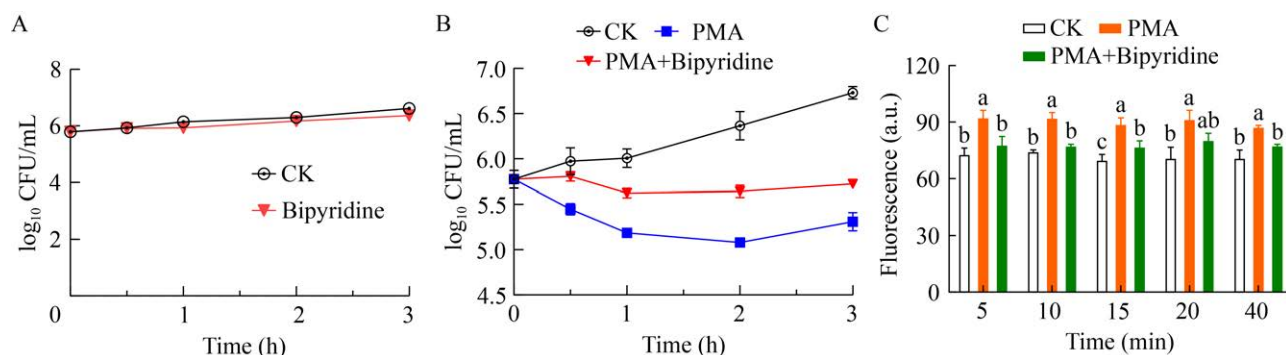


图 3 联吡啶对多黏菌素 A1 介导的铜绿假单胞菌致死率以及羟自由基产量的影响 A: 联吡啶添加对 *P. aeruginosa* PAO1 存活的影响; B: 联吡啶添加减小多黏菌素 A1 对 *P. aeruginosa* PAO1 的杀伤力; C: 联吡啶添加阻断多黏菌素 A1 介导的 *P. aeruginosa* PAO1 羟自由基产生。CK: 不添加多黏菌素 A1 的空白对照; PMA: 多黏菌素 A1 处理组。不同小写字母表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Figure 3 The effect of bipyridine on polymyxin A1-mediated lethality and hydroxyl radical production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A: The survival effect of *P. aeruginosa* PAO1 by adding bipyridine; B: Bipyridine decreased the effect of polymyxin A1 on the lethality of *P. aeruginosa* PAO1; C: Bipyridine lowered the level of hydroxyl radical mediated by polymyxin A1 in *P. aeruginosa* PAO1. CK: Black control without polymyxin A1; PMA: Polymyxin A1 treatment. Different lowercase letters were significantly different ($P < 0.05$).

是因为添加联吡啶阻断了 Fenton 反应, 从而减少细胞内羟自由基的产生, 进而减轻了对铜绿假单胞菌的毒害作用。

2.4 多黏菌素 A1 引起铜绿假单胞菌细胞 ROS 升高、脂质氧化

荧光探针 DCFDA 本身无荧光且可以自由穿

过细胞膜, 当其进入细胞内后可以被细胞内酯酶水解变成无荧光的二氯荧光素(dichlorofluorescein, DCFH)且不能通过细胞膜^[25]。当细胞内存在 ROS 时, ROS 可将无荧光的 DCFH 氧化生成具有强绿色荧光的 2,7-二氯荧光素(2,7-dichlorofluorescein, DCF), 检测 DCF 的荧光值就可以反映细胞内 ROS 的水平^[26]。不同浓度多黏菌素 A1 处理对 *P. aeruginosa* PAO1 细胞内活性氧产生情况如图 4A 所示, 随着多黏菌素 A1 作用浓度的提高, 细胞内 ROS 含量显著升高。此外, 羟自由基能够氧化细胞内的脂质从而产生 MDA, MDA 与硫代巴比妥酸在高温酸性条件下反应产生 3,5,5-三甲基恶唑-2,4-二酮, 该物质呈现棕红色, 并在 532 nm 有最大吸收波长^[18], 因此通过检测 MDA 浓度可反映细胞内的脂质氧化情况。如图 4B 所示, 随着多黏菌素 A1 作用浓度提高, 细胞内 MDA 含量显著提高, 说明多黏菌素 A1 诱导 *P. aeruginosa* PAO1 产生的羟自由基会造成细胞内脂质氧化。

2.5 多黏菌素 A1 引起铜绿假单胞菌细胞铁离子紊乱以及 DNA 破坏

多黏菌素 E 破坏细胞内 Fe-S 簇, 进而使细胞产生大量 Fe^{2+} , 造成细胞的铁死亡^[16]。检测

多黏菌素 A1 处理后细菌总铁离子和亚铁离子含量变化, 结果如图 5A 所示, 阳性对照 H_2O_2 处理引起细胞内 Fe^{2+} 含量的升高, 同样地, 20 $\mu\text{g/mL}$ 多黏菌素 A1 处理也引起 *P. aeruginosa* PAO1 细胞 Fe^{2+} 含量上升, 这可能是因为药品处理可能会破坏 Fe-S 簇, 使之释放出 Fe^{2+} 。采用凝胶电泳法检测不同浓度处理下的铜绿假单胞菌 DNA 的完整性如图 5B 所示, 随着多黏菌素 A1 处理浓度增加, 铜绿假单胞菌 DNA 条带逐渐变细且拖尾逐渐明显, 说明多黏菌素 A1 处理会降解和破坏细菌细胞中的 DNA。

2.6 ROS 清除酶相关基因表达

铜绿假单胞菌细胞中具有 Fe-SOD 和 Mn-SOD 这 2 种细胞质 SOD^[27]。作为 2 种同工酶, Mn-SOD 合成受 *sodM* 基因调控, 而 Fe-SOD 受 *sodB* 基因调控, 它们共同负责控制细胞内的 O_2^- 含量^[28]。多黏菌素 A1 处理提高了 *P. aeruginosa* PAO1 细胞中 ROS 清除酶基因表达水平(图 6)。当多黏菌素 A1 作用的浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, *sodM* 基因表达水平分别为对照组的 2.33 倍和 4.92 倍, 同样地, *sodB* 基因表达水平分别为对照组的 4.47 倍和 13.27 倍。

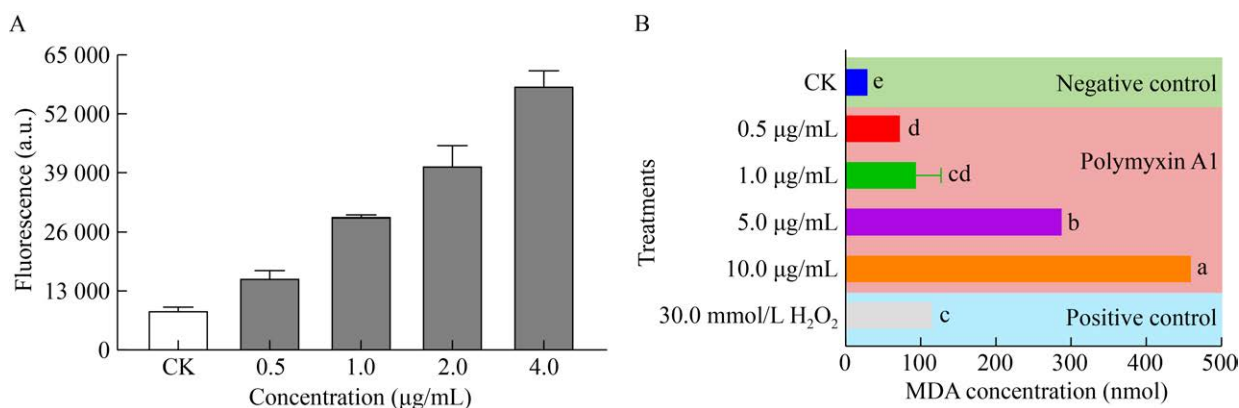


图 4 多黏菌素 A1 作用对铜绿假单胞菌 PAO1 细胞内活性氧产生(A)和脂质氧化(B)的影响 CK: 不添加多黏菌素 A1 处理的空白对照。不同小写字母表示不同组间差异显著($P<0.05$)。

Figure 4 Effect of polymyxin A1 action on bacterial ROS production (A) and lipid oxidation (B) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. CK: Black control without polymyxin A1. Different lowercase letters were significantly different ($P<0.05$).

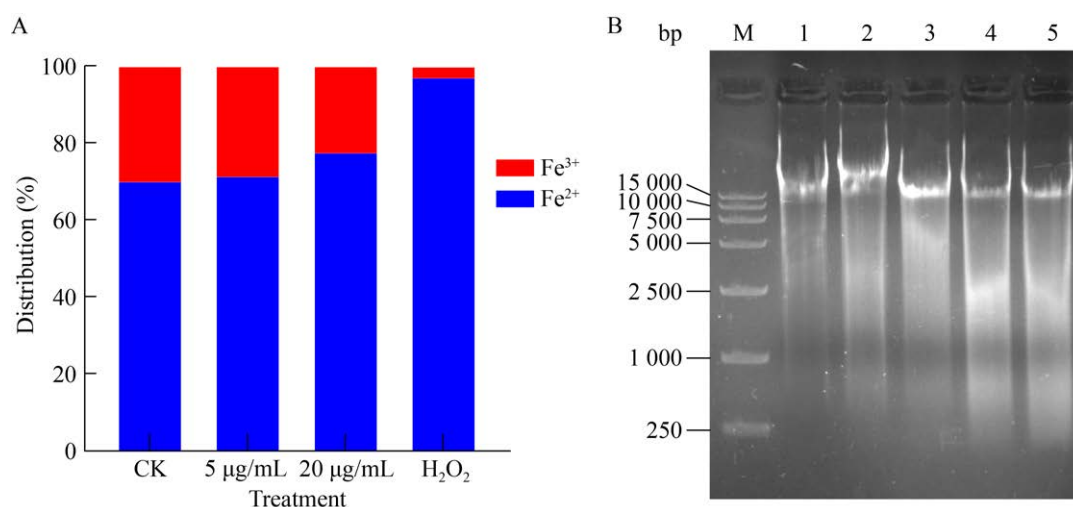


图 5 多黏菌素 A1 处理对铜绿假单胞菌细胞内铁离子水平和 DNA 的影响 A: 多黏菌素 A1 引起细胞内铁离子和亚铁离子的紊乱。CK: 不添加多黏菌素 A1 的空白对照; H_2O_2 : 阳性对照。B: 多黏菌素 A1 处理破坏 DNA。M: DNA 分子量标准物; 1: 不添加多黏菌素 A1 的空白对照; 2-5 分别表示添加 5、20、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 多黏菌素 A1 处理后提取的菌体 DNA。

Figure 5 Effect of polymyxin A1 treatment on intracellular iron ion levels and DNA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A: Polymyxin A1 caused a disorder of iron and ferrous iron ion. CK: Blank control without polymyxin A1; H_2O_2 : H_2O_2 treatment positive control. B: Polymyxin A1 damaged bacterial DNA. M: DNA molecular weight marker; 1: Blank control without polymyxin A1; 2-5 respectively indicate the bacterial DNA extracted after adding 5, 20, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ polymyxin A1 treatment respectively.

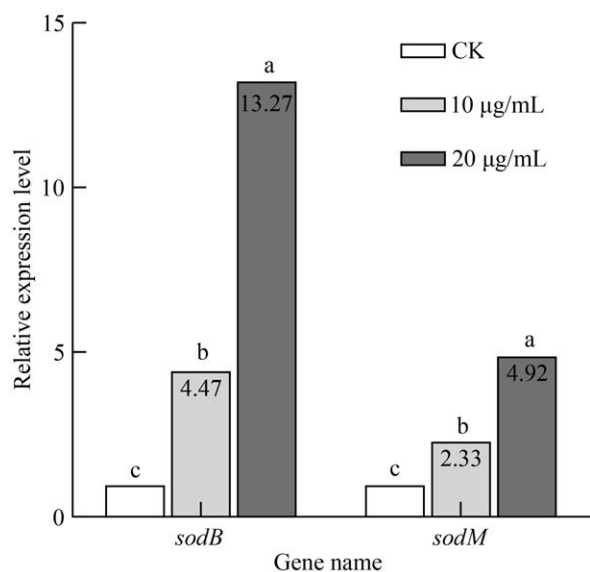


图 6 不同浓度多黏菌素 A1 作用对 *sodM* 和 *sodB* 基因相对表达水平的影响

Figure 6 The effects of different concentrations of polymyxin A1 on the relative expression levels of *sodM* and *sodB* genes.

2.7 铁摄取和铁硫簇修复相关基因表达

fur 基因编码三价铁离子引进调节蛋白 Fur, 可以调控细胞铁摄取、利用和铁稳态基因的表达^[29-30]。当细胞受到抗生素引起的氧化应激后, Fe^{2+} 参与 Fenton 反应导致细胞内的 Fe-S 簇被破坏, Fur 蛋白调节外界铁离子的引进, 同时可以激活 YggX 蛋白和 YtfE 蛋白, 修复失活的 Fe-S 簇^[12]。iscR 基因编码 IscR 蛋白, 在细胞 Fe-S 簇平衡中发挥重要作用, 当 Fe-S 簇损伤时 *iscR* 操纵子的表达可以维持 Fe-S 簇的稳定^[31]。此外, IscR 可以激活 *iscA* 基因的表达, IscA 作为铁结合蛋白可以为铁硫簇修复提供铁^[32-33]。不同浓度多黏菌素 A1 作用下, *P. aeruginosa* PAO1 中 *fur*、*iscR* 和 *iscA* 基因表达水平如图 7 所示, 3 个基因的表达呈现同步趋势, 均随着多黏菌素 A1 作用浓度的增加表达水平显著提高, 其中当多黏菌素 A1 浓度达到 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 3 个基因的表达水平分别提高为对照组的 5.12、7.46

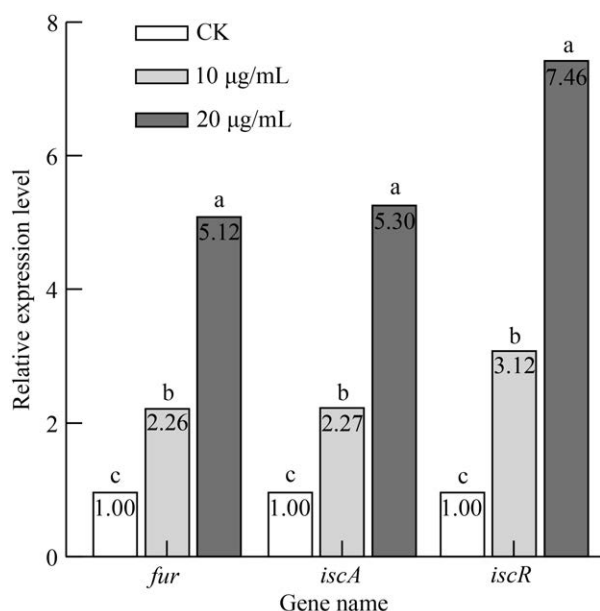


图7 不同浓度多黏菌素 A1 作用对 *fur*、*iscR* 和 *iscA* 基因相对表达水平的影响

Figure 7 The effects of different concentrations of polymyxin A1 on the relative expression levels of *fur*, *iscR* and *iscA* genes.

和 5.30 倍。这说明多黏菌素 A1 处理产生的活性氧可能破坏了 *P. aeruginosa* PAO1 细胞中的 Fe-S 簇, 细胞做出应答, 上调负责修复铁硫簇相关基因表达水平。

2.8 DNA 损伤修复相关基因表达

当 DNA 发生严重的氧化损伤时, *recA* 基因编码的重组酶 A (RecA) 调控 DNA 损伤诱导反应(SOS)系统的表达, 激发 SOS 修复, 使得 DNA 可以越过损伤部位继续复制^[34]。同时, RecA 也调控编码细胞分裂延迟蛋白的 *sfiA* 基因表达, 使细胞能继续分裂^[35]。不同浓度的多黏菌素 A1 处理后, *P. aeruginosa* PAO1 细胞中 *recA* 基因表达如图 8 所示, 在一定范围内, 随着作用浓度的提高, *recA* 基因表达水平不断提高, 即细胞中负责 DNA 修复的基因上调, 这可能是因为多黏菌素 A1 处理形成的·OH 破坏了 *P. aeruginosa* PAO1 细胞的 DNA, 因此细胞做出反馈, 通过上调介导细菌 SOS 系统表达的 *recA* 基因来修复受损的 DNA。

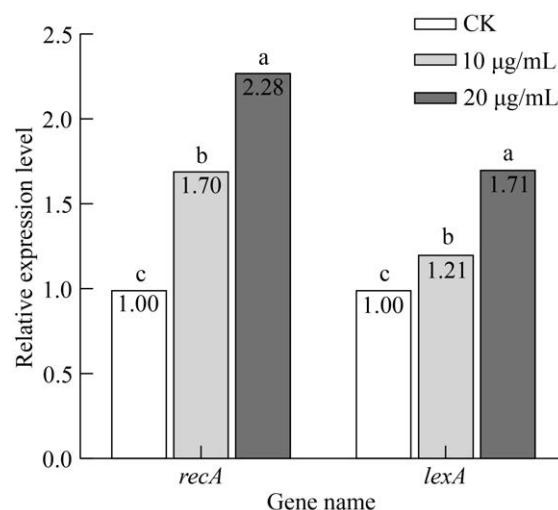


图8 不同浓度多黏菌素 A1 作用对 *recA* 和 *lexA* 基因相对表达水平的影响

Figure 8 The effects of different concentrations of polymyxin A1 on the relative expression levels of *recA* and *lexA* genes.

lexA 基因表达水平变化如图 8 所示, 当多黏菌素 A1 作用浓度提高, 其表达水平显著提高。这可能因为 *lexA* 基因作为铜绿假单胞菌中调节 SOS 反应的重要因子之一, 具有编码转录阻遏蛋白 LexA 的功能^[36]。当 DNA 损伤时, RecA 蛋白通过促进切割稳定 LexA 蛋白可切割构象中的肽键, 并促进 SOS 相关基因以一定的顺序开始表达, 从而达到 DNA 损伤修复的功能, 因此 DNA 损伤后除了 *recA* 基因被激活外, 也会促进 LexA 抑制蛋白的自裂^[36-37]。

3 讨论

日益增长的 MDR 革兰氏阴性菌如肺炎克雷伯氏菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等引起的感染对人类和动物的健康构成了严重的挑战^[3,38]。目前抗菌药物大致分为杀菌抗生素和抑菌抗生素, 杀菌抗生素杀死细菌效率>99.9%, 而抑菌抗生素仅抑制细菌生长^[39-40]。杀菌类抗生素涵盖了广泛的靶点, 主要是通过类特异性药物-靶点相互作用进行杀菌, 例如氨基糖苷类抗生素(如卡那霉素)主要靶向 30S 核

糖体,引起蛋白质错误翻译从而导致细胞死亡;喹诺酮类抗生素(如诺氟沙星)通过结合 DNA 旋转酶来靶向 DNA 复制和修复从而驱动双链 DNA 断裂和细胞死亡; β -内酰胺类抗生素(如氨苄西林)主要是与青霉素结合蛋白相互作用而干扰正常的细胞壁合成并诱导裂解和细胞死亡^[21]。2007 年 *Cell* 一项研究表明这 3 种不同类型的杀菌抗生素无论药物-靶点相互作用如何,都会刺激革兰氏阴性和阳性细菌产生高度有害的羟基自由基而导致细胞死亡^[21]。这种机制主要依赖于三羧酸循环的电子传递链刺激 NADH 的氧化,电子传递链的过度活化刺激了超氧化物的形成,超氧化物破坏铁硫团簇,使亚铁可通过 Fenton 反应进行氧化,Fenton 反应导致形成羟基自由基,而羟基自由基损伤 DNA、蛋白质和脂质从而导致细胞死亡^[21]。

羟自由基致死的基础是诱导细胞内产生高浓度的 ROS,多黏菌素 A1 处理后引起耐药性 *P. aeruginosa* PAO1 细胞产生大量的 ROS 且呈浓度依赖性。同时,通过 RT-qPCR 发现调控过氧化物歧化酶的 2 种基因 *sodM* 和 *sodB* 表达水平也得到提高,这可能是因为多黏菌素 A1 处理诱导细胞产生 ROS,*sodM* 被认为是保护生物分子免受超氧化物诱导损伤的第一应答者,当细胞受到氧化刺激时,细胞内 O_2^- 浓度升高会刺激细胞中 *sodM* 和 *sodB* 表达水平相应提高从而产生 SOD 来降低氧化应激造成的细胞损伤^[41-42]。秦旺蓉^[26]利用多黏菌素 E 作用于多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*),发现处理后细胞内 ROS 含量增加了 3.94 倍,进一步探究发现细胞内与 ROS 清除相关的 Mn-SOD 和 Fe-SOD 基因转录水平均得到上调。ROS 主要包括 O_2^- 、 H_2O_2 和毒性较高的 $\cdot OH$ 这 3 种^[23]。在胞内 SOD 作用下, O_2^- 转化为 H_2O_2 ,而 O_2^- 或 H_2O_2 会损伤 Fe-S 簇,使其释放 Fe^{2+} 。多黏菌素 A1 处理引起耐药性 *P. aeruginosa* PAO1 细胞亚铁离子水平的提高,同时细胞内参与铁摄取和铁硫簇修复基因 *fur*、*iscR* 和 *iscA* 基因表达水平提高。然而,低

浓度多黏菌素 A1 (5 $\mu g/mL$) 作用与阴性对照差别不大,可能是因为低浓度下铜绿假单胞菌内失活的 Fe-S 簇通过 Fur 铁硫簇蛋白修复,从而恢复了细胞内 Fe^{2+} 的稳态^[29,41]。Zhong 等^[16]也报道天然酮类物质和多黏菌素 E 协同作用可破坏细菌的铁稳态从而可增强杀菌效果。Dwyer 等^[41]利用诺氟沙星处理大肠杆菌细胞后也发现 *fur*、*iscR*、*iscU*、*iscS* 和 *iscA* 基因的表达水平得到提高。 H_2O_2 和 Fe^{2+} 发生 Fenton 反应,使得 Fe^{2+} 变成三价铁离子(Fe^{3+})并生成毒性较强的 $\cdot OH$ 从而引起蛋白质、脂质及 DNA 氧化损伤最终导致细胞死亡。通过荧光探针检测到多黏菌素 A1 处理诱导 *P. aeruginosa* PAO1 细胞羟自由基产生,过氧化物清除剂硫脲和铁螯合剂联吡啶添加降低了 $\cdot OH$ 水平同时有效缓解了细胞的死亡,这是因为硫脲可以有效清除 H_2O_2 ,联吡啶可螯合 Fe^{2+} ,从而降低 $\cdot OH$ 的产生。Sampson 等^[13]报道了多黏菌素 B、多黏菌素 E 及卡那霉素处理鲍曼不动杆菌均会使细胞产生羟自由基,而硫脲和联吡啶添加可以提高鲍曼不动杆菌的存活率并降低羟自由基产量。Kim 等^[43]研究发现过氧化氢和羟自由基过量产生会对生物膜产生负面影响,导致细胞膜多不饱和脂肪酸的脂质过氧化,进而导致细胞 MDA 浓度提高。Lee 等^[44]还发现番茄红素处理大肠杆菌提高了细胞 ROS 水平特别是羟自由基水平并诱导细菌 DNA 损伤,细胞中调控 DNA 诱导损伤的 RecA 蛋白表达水平也提高。

4 结论

多黏菌素 A1 引起耐药性 *P. aeruginosa* PAO1 细胞羟自由基的产生,添加硫脲和联吡啶可有效降低细胞羟自由基产生水平并有效缓解细胞死亡;多黏菌素 A1 引起羟自由基致死相关指标如细胞内 ROS 和脂质氧化水平提高、DNA 损伤及细胞内亚铁离子的紊乱;此外,与之相关的 ROS 清除酶基因(*sodM* 和 *sodB*)、铁摄取和铁硫簇修复基因(*fur*、*iscR* 和 *iscA*)以及 DNA

损伤修复基因(*recA* 和 *lexA*)等通路基因的表达水平显著提高。本研究从表型和基因 2 个层面证明了多黏菌素 A1 介导耐药性 *P. aeruginosa* PAO1 羟自由基致死的机理。

作者贡献声明

吴雅萍：方案设计、试验开展、手稿撰写和提供项目经费；杨曦澜：试验开展、手稿撰写；刘冬梅：提供项目经费、修改稿件。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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] 王川平, 殷立新, 樊德厚. 绿脓杆菌感染的抗菌药物治疗[J]. 临床荟萃, 2005, 20(21): 1253-1257.
WANG CP, YIN LX, FAN DH. Antibacterial treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. Clinical Focus, 2005, 20(21): 1253-1257 (in Chinese).
- [2] BROCHMANN RP, TOFT A, CIOFU O, BRIALES A, KOLPEN M, HEMPEL C, BJARNSHOLT T, HØIBY N, JENSEN PØ. Bactericidal effect of colistin on planktonic *Pseudomonas aeruginosa* is independent of hydroxyl radical formation[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2014, 43(2): 140-147.
- [3] HAN ML, ZHU Y, CREEK DJ, LIN YW, GUTU AD, HERTZOG P, PURCELL T, SHEN HH, MOSKOWITZ SM, VELKOV T, LI J. Comparative metabolomics and transcriptomics reveal multiple pathways associated with polymyxin killing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. mSystems, 2019, 4(1): e00149-18.
- [4] WANG JL, SHAH BK, ZHAO J, XIONG J, WANG CH, XIE SS. Comparative study of polymyxin B and colistin sulfate in the treatment of severe comorbid patients infected with CR-GNB[J]. BMC Infectious Diseases, 2023, 23(1): 351.
- [5] FALAGAS ME, KYRIAKIDOU M, VOULGARIS GL, VOKOS F, POLITI S, KECHAGIAS KS. Clinical use of intravenous polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: an evaluation of the current evidence[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2021, 24: 342-359.
- [6] EZADI F, ARDEBILI A, MIRNEJAD R. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2019, 57(4): e01390-18.
- [7] VELKOV T, THOMPSON PE, AZAD MAK, ROBERTS KD, BERGEN PJ. History, chemistry and antibacterial spectrum[M]//Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside. Cham: Springer International Publishing, 2019: 15-36.
- [8] VELKOV T, THOMPSON PE, NATION RL, LI J. Structure: activity relationships of polymyxin antibiotics[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(5): 1898-1916.
- [9] VELKOV T, ROBERTS KD, NATION RL, THOMPSON PE, LI J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics[J]. Future Microbiology, 2013, 8(6): 711-724.
- [10] CLAUSELL A, GARCIA-SUBIRATS M, PUJOL M, BUSQUETS MA, RABANAL F, CAJAL Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2007, 111(3): 551-563.
- [11] CAJAL Y, ROGERS J, BERG OG, JAIN MK. Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids[J]. Biochemistry, 1996, 35(1): 299-308.
- [12] YU ZL, QIN WR, LIN JX, FANG SS, QIU JP. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance[J]. BioMed Research International, 2015, 2015(1): 679109.
- [13] SAMPSON TR, LIU X, SCHROEDER MR, KRAFT CS, BURD EM, WEISS DS. Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(11): 5642-5649.
- [14] DUBEY V, GUPTA R, PATHANIA R. Targeting Superoxide dismutase confers enhanced Reactive Oxygen Species mediated eradication of polymyxin B induced *Acinetobacter baumannii* persisters[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2023, 95(5): e02180-20.
- [15] WU YP, LIU DM, LIANG MH, HUANG YY, LIN J, XIAO LF. Genome-guided purification and characterization of polymyxin A1 from *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20: a rarely explored member of polymyxins[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 962507.
- [16] ZHONG ZX, ZHOU S, LIANG YJ, WEI YY, LI Y, LONG TF, HE Q, LI MY, ZHOU YF, YU Y, FANG LX, LIAO XP, KREISWIRTH BN, CHEN L, REN H, LIU YH, SUN J. Natural flavonoids disrupt bacterial iron homeostasis to potentiate colistin efficacy[J]. Science Advances, 2023, 9(23): eadg4205.
- [17] WANG B, ZHANG FW, WANG WX, ZHAO YY, SUN SY, YU JH, VITEK MP, LI GF, MA R, WANG SW, HU ZL, CHEN W. Apolipoprotein E mimetic peptide COG1410 combats pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 934765.
- [18] GARCIA YJ, RODRÍGUEZ-MALAVER AJ, PEÑALOZA N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices[J]. Journal of Neuroscience Methods, 2005, 144(1): 127-135.
- [19] 吴雅萍, 杨技欣, 刘冬梅. 解硫酸类芽孢杆菌 SY20 实时荧光定量 PCR 内参基因筛选[J]. 食品科技, 2024, 49(2): 1-7.
WU YP, YANG JX, LIU DM. Screening of reference genes in *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20 by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(2): 1-7 (in Chinese).
- [20] KOBAYASHI H, OGAWA M, ALFORD R, CHOYKE PL, URANO Y. New strategies for fluorescent probe

- design in medical diagnostic imaging[J]. Chemical Reviews, 2010, 110(5): 2620-2640.
- [21] KOHANSKI MA, DWYER DJ, HAYETE B, LAWRENCE CA, COLLINS JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics[J]. Cell, 2007, 130(5): 797-810.
- [22] VAISHAMPAYAN A, GROHMANN E. Antimicrobials functioning through ROS-mediated mechanisms: current insights[J]. Microorganisms, 2022, 10(1): 61.
- [23] IMLAY JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(7): 443-454.
- [24] YEOM J, IMLAY JA, PARK W. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(29): 22689-22695.
- [25] ERUSLANOV E, KUSMARTSEV S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry[J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 594: 57-72.
- [26] 秦旺蓉. 多黏菌素 E 诱导多粘类芽孢杆菌氧胁迫致死机理的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2015.
- QIN WR. The mechanism of polymyxin E oxidative stress to *Paenibacillus polymyxa*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [27] BEN GHORBAL SK, MAALEJ L, CHOURABI K, KHEFACHA S, OUZARI HI, CHATTI A. Antioxidant defense mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: role of iron-cofactored superoxide dismutase in response to UV-C radiations[J]. Current Microbiology, 2016, 73(2): 159-164.
- [28] BENOVT LT, FRIDOVICH I. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(41): 25310-25314.
- [29] ESCOLAR L, PÉREZ-MARTÍN J, de LORENZO V. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(20): 6223-6229.
- [30] ANDREWS SC, ROBINSON AK, RODRÍGUEZ-QUINONES F. Bacterial iron homeostasis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2/3): 215-237.
- [31] ROMSANG A, DUANG-NKERN J, WIRATHORN W, VATTANAVIBOON P, MONGKOLSUK S. *Pseudomonas aeruginosa* IscR-regulated ferredoxin NADP(+) reductase gene (*fprB*) functions in iron-sulfur cluster biogenesis and multiple stress response[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0134374.
- [32] SANINJUK K, ROMSANG A, DUANG-NKERN J, WONGSAROJ L, LEESUKON P, DUBBS JM, VATTANAVIBOON P, MONGKOLSUK S. Monothiol glutaredoxin is essential for oxidative stress protection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(1): e0171422.
- [33] DING HG, CLARK RJ, DING BJ. *IscA* mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(36): 37499-37504.
- [34] NAPOLITANO R, JANEL-BINTZ R, WAGNER J, FUCHS RP. All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(22): 6259-6265.
- [35] 张翎. 过氧化氢酶和多黏菌素 E 协同作用多粘类芽孢杆菌致死机理的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2016.
- ZHANG L. Mechanism of synergistic effect on cell death induced by colistin and catalase in *Paenibacillus polymyxa*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [36] COURCELLE J, HANAWALT PC. RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks[J]. Annual Review of Genetics, 2003, 37: 611-646.
- [37] LITTLE JW. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease[J]. Biochimie, 1991, 73(4): 411-421.
- [38] YIN JH, MENG Q, CHENG D, FU JN, LUO QX, LIU YQ, YU ZL. Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(9): 3771-3780.
- [39] WALSH C. Where will new antibiotics come from?[J]. Nature Reviews Microbiology, 2003, 1(1): 65-70.
- [40] RHEE KY, GARDINER DF. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal activity in the treatment of Gram-positive bacterial infections[J]. Clinical Infectious Diseases, 2004, 39(5): 755-756.
- [41] DWYER DJ, KOHANSKI MA, HAYETE B, COLLINS JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*[J]. Molecular Systems Biology, 2007, 3: 91.
- [42] HOPKIN KA, PAPAIZIAN MA, STEINMAN HM. Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(34): 24253-24258.
- [43] KIM H, LEE DG. Contribution of SOS genes to H₂O₂-induced apoptosis-like death in *Escherichia coli*[J]. Current Genetics, 2021, 67(6): 969-980.
- [44] LEE W, LEE DG. Lycopene-induced hydroxyl radical causes oxidative DNA damage in *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(9): 1232-1237.