



胱氨酸/半胱氨酸调控活性氧代谢影响大肠杆菌耐药性

李欣^{1,2,3} 钟永亮^{1,2} 刘云宏^{1,2} 张敏^{1,2} 景浩楠¹ 马菅超¹ 熊先焱¹ 庞新跃^{*4}

1 河南科技大学食品与生物工程学院 河南 洛阳 471023

2 河南科技大学微生物资源开发与利用重点实验室 河南 洛阳 471023

3 中国科学院沙漠与沙漠化重点实验室 甘肃 兰州 730000

4 河南科技大学医学技术与工程学院 河南 洛阳 471023

摘要:【背景】随着越来越多超级细菌出现和抗生素资源的渐渐枯竭,细菌耐药机制研究愈加重要。

【目的】探讨大肠杆菌内源半胱氨酸推动 Fenton 反应,调控胞内的活性氧水平,从而影响细菌耐药性这一代谢途径。【方法】在贫硫的培养条件下,通过控制外源胱氨酸和抗生素浓度,研究了胱氨酸/半胱氨酸对大肠杆菌耐药性的影响。【结果】较低水平的半胱氨酸使大肠杆菌对抗生素的耐药性增强, RNA-Seq 的结果证明了胱氨酸内流对 Fur、CysB 和 SOS 的调控作用。LC-MS 对外流硫醇的分析显示,细胞会快速将过量内流的半胱氨酸泵出胞外。在抗生素一定浓度范围内,半胱氨酸外排泵 AlaE 表现出良好的细胞保护作用。【结论】大肠杆菌对不同作用机理抗生素硫酸庆大霉素、氨基青霉素和诺氟沙星的耐药性均受内源半胱氨酸水平的影响。本文通过研究半胱氨酸调控活性氧代谢对大肠杆菌耐药性的影响,为探讨细菌耐药性机制提供新的理论依据。

关键词: 大肠杆菌, 半胱氨酸, 抗生素, 耐药性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31000017, U1404334); Natural Science Foundation of Henan Province (182300410083); Science and Technique Foundation of Henan Province (182102310644); Key Project of Higher Education of Henan Province (18A310013); State Key Laboratory of Cotton Biology Open Fund (CB2018A22); Opening Fund of Key Laboratory of Desert and Desertification of Chinese Academy of Sciences (KLDD-2018-006); Students Research Training Program of Henan University of Science and Technology (SRTP) (2018168)

*Corresponding author: Tel: 86-379-64819930; E-mail: pangxy@hotmail.com

Received: 09-11-2018; Accepted: 15-03-2019; Published online: 24-04-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31000017, U1404334); 河南省自然科学基金(182300410083); 河南省重点研发与推广专项(182102310644); 河南省高等学校重点科研项目(18A310013); 棉花生物学国家重点实验室开放基金(CB2018A22); 中国科学院沙漠与沙漠化重点实验室开放基金(KLDD-2018-006); 河南科技大学大学生研究训练计划(SRTP) (2018168)

*通信作者: Tel: 0379-64819930; E-mail: pangxy@hotmail.com

收稿日期: 2018-11-09; 接受日期: 2019-03-15; 网络首发日期: 2019-04-24

Impact of cystine/cysteine on drug resistance of *Escherichia coli* by regulating ROS metabolisms

LI Xin^{1,2,3} ZHONG Yong-Liang^{1,2} LIU Yun-Hong^{1,2} ZHANG Min^{1,2} JING Hao-Nan¹
MA Ying-Chao¹ XIONG Xian-Lang¹ PANG Xin-Yue^{*4}

1 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China

2 Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Utilization, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China

3 Key Laboratory of Desert and Desertification, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China

4 College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China

Abstract: [Background] With increasing numbers of drug resistant microorganisms and drained antibiotics sources, research on bacterial drug resistance mechanisms has risen to be a most urgent scientific topic. [Objective] To understand how endogenous cysteine affects ROS levels in *Escherichia coli* by promoting the Fenton reaction. [Methods] The effect of cysteine on the antibiotic resistance of *E. coli* was investigated by controlling the concentration of exogenous cystine and the concentration of antibiotics (gentamicin, ampicillin, norfloxacin) under poor sulfur conditions. [Results] Low concentrations of cysteine increased drug resistance of *E. coli* to all of the antibiotics used in this study. The regulation on Fur, CysB or SOS by influx of cystine was also confirmed using RNA-Seq. An analysis of sulfur efflux by LC-MS showed that excess cysteine was excluded immediately. At certain concentrations of antibiotics, the efflux pump AlaE exhibited favorable protection on cells. [Conclusion] Drug resistance of *E. coli* to gentamicin, ampicillin, norfloxacin, antibiotics with different mechanisms of action, was affected by endogenous cysteine levels. Our current work provides new theoretical information on bacterial drug-resistance mechanisms.

Keywords: *Escherichia coli*, Cysteine, Antibiotics, Drug resistance

抗生素在临床的广泛应用大大降低了人类和动物的细菌感染性疾病发病率和死亡率,但由于抗生素的不规范使用和过度使用,抗生素耐药性出现的速度越来越快,感染的预防和控制越来越难^[1]。细菌耐药性的产生被称为 21 世纪危害人类健康的最主要问题之一^[2]。

在贫硫环境中生长细菌的培养液中加入富硫的硫源胱氨酸(CySS)时,细胞将快速摄入大量的 CySS,并将其还原为半胱氨酸(Cys),胞内的 Cys 库快速上升。Cys 存在时可与铁离子协同,游离的 Fe²⁺催化电子从 Cys 转移到 H₂O₂,循环发生氧化还原反应并连续催化·OH 的形成,从而造成细胞损伤^[3]。已有的研究显示,大肠杆菌在被暴露于毫摩尔级浓度 H₂O₂ 达 15 min 后仍有 70%可存活^[4]。但是,胞内 Cys 水平上升时,细胞变得对外部 H₂O₂ 杀伤非常敏感:1 min 内存活率下降至低于 0.1%^[3]。抗生素诱导细菌死亡途径中有可能存在由活性氧

介导的共通反应机制^[5-6]。Cys 对活性氧的调控,将使细胞持续产生大量·OH,直接杀伤细胞^[7-9];或是短暂产生少量·OH,使细菌通过造成自身的损伤完成遗传物质转移,潜在的可动遗传因子激活,或者自身 DNA 突变,从而逃避抗生素的抑杀,即形成耐药性^[8,10]。

由此可见,Cys 在细菌耐药机制中很可能起到至关重要的作用。本实验采用贫硫培养基给细胞创造一个硫受限的生长环境,并通过在培养基中加入 CySS 来提高胞内的 Cys 水平。在用抗生素或 H₂O₂ 对细胞造成损伤的过程中,不同浓度 CySS 处理引起胞内 Cys 库的变化体现在大肠杆菌对 H₂O₂ 耐药性的影响。本研究对细菌 Cys 转运系统及其调控耐药性机制的研究将有助于我们理解细菌如何通过最基本的营养元素、利用简单氧化还原反应来应对环境胁迫。硫源的控制也许能够为我们寻找新的抗生素有效作用方式提供新的策略。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

实验所用大肠杆菌野生型菌株 MG1655、突变型菌株 SSk226 (MG1655 *alaE::kan*)由美国伊利诺伊大学微生物系 James A. Imlay 教授馈赠。将冻存的大肠杆菌接种至 LB 液体培养基, 37 °C 恒温培养过夜。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 16.0;

MinA 培养基(100 mL): MinA salts (K_2HPO_4 10.5 g, KH_2PO_4 4.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, 柠檬酸钠 0.5 g), 10% $MgSO_4$ 0.2 mL, 20% 葡萄糖 1 mL, 50 mmol/L 吡啶乙醇 1 mL, 0.5 g/L 维生素 B₁ 1 mL, 1.6% 琼脂。

1.1.2 主要试剂和仪器

国产硫酸庆大霉素、诺氟沙星、氨苄青霉素、过氧化氢、CySS 等试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; 分光光度计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; RT-qPCR 仪, Bio-Rad 公司; LC-MS, Waters 公司。

1.2 方 法

1.2.1 抗 生 素 处 理

琼脂扩散法(抑菌圈法): 实验菌株在 MinA 液体培养基中 37 °C、150 r/min 预培养过夜至浑浊, 取 200 μ L 菌液涂布于 MinA 固体平板, 滤纸片上的加药量为 30 μ L。37 °C 恒温培养 16–18 h, 测量抑菌圈大小。

系列稀释法(液体法): 将预培养过夜的菌液稀释至 $OD_{600}=0.15$, 加入不同浓度的抗生素(硫酸庆大霉素: 0.5、1.0、2.0 μ g/mL; 诺氟沙星: 0.05、0.10、0.20、0.25 μ g/mL; 氨苄青霉素: 0.5、1.0、2.0 μ g/mL)或 CySS, 37 °C 恒温培养 16–18 h, 600 nm 检测菌液的吸光值。

1.2.2 过氧化氢处理

参照 1.2.1 中抗生素处理的方法, 将 H_2O_2 加

入滤纸片或液体培养的菌液中, 抑菌圈法中, 所用浓度为 1 mol/L, 液体法中所用浓度为 2.5 mmol/L。

1.2.3 胱氨酸处理

参照 1.2.1 中抗生素处理的方法, 在待测的滤纸片或液体培养的菌液中加入不同浓度的 CySS, 处理 5 min 后加入不同浓度的抗生素或 H_2O_2 , 37 °C 恒温培养 16–18 h, 测定抑菌圈直径或菌液 600 nm 的吸光值。抑菌圈法中 CySS 终浓度为: 5、10、20 mmol/L; 液体法中 CySS 终浓度为 0.5、1.0、2.0 mmol/L。

1.2.4 转录组测序及基因表达水平分析

贫硫环境中生长的菌细胞(对数期 OD_{600} 为 0.3–0.5), 外加 0.5 mmol/L CySS 处理 5 min。采用热苯酚抽提法分离 RNA, 使用 Qiagen 的 RNA 柱进行纯化。采用 Illumina HiSeq 测序平台的双端测序模式对 CySS 处理后及未处理对照样本进行高通量测序。在 RNA-Seq 分析中, 可以通过定位到基因组区域测序序列(Reads)的计数来估计基因的表达水平, 为了使不同基因、不同实验间估计的基因表达水平具有可比性, 引入了 RPKM (Reads per kilo bases per million reads)的概念, RPKM 同时考虑了测序深度和基因长度对 Reads 计数的影响, 是目前常用的基因表达水平估算方法^[11]:

$$RPKM = \frac{\text{Total exon reads}}{\text{Mapped reads (millions)} \times \text{Exon length (kb)}}$$

用 RT-qPCR 方法对目标基因的表达进行验证。取 1.5 μ g 总 RNA (与 RNA-Seq 建库时相同), 用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链做模板(稀释 10 \times), 以 2 \times SYBR-Green I 作为荧光标记物, 以 *tus* 作为内标基因进行 PCR 反应。PCR 反应体系 (20 μ L): 2 \times TransStart[®] Green qPCR SuperMix 10 μ L, 10 μ mol/L 引物 1、2 各 0.4 μ L; cDNA 0.5 μ L, ddH₂O 8.7 μ L。引物信息: AlaE-F: 5'-ATCAGATTATGGCGGCGGTTCAG-3'; AlaE-R: 5'-AAACAGTCGGCGGCAATA-3'。PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55–60 °C 20 s, 72 °C 20 s; 95 °C 15 s, 55–60 °C 1 min, 72 °C 15 s, 40 个循环。每个 PCR 反应 3 个

平行。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 公式计算基因的相对表达量^[12], 3次实验的平均标准差以误差棒表示。

1.2.5 外泌硫醇检测

在硫酸盐培养基中预培养过夜的菌液稀释至 OD_{600} 为 0.01, 然后在相同培养基中生长至 OD_{600} 为 0.2。菌液于 4 500 r/min 离心 10 min 后弃上清, 将菌体沉淀重悬于 37 °C 新鲜培养基中, 培养基含 0.2 mmol/L EDTA 以抑制外泌硫醇的自氧化。加入 0.5 mmol/L L-CySS 后, 在不同时间点取菌液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 0.5 mL 滤液立刻与 0.5 mL 含 0.3 mmol/L DTNB 溶液的培养基混匀。硫醇化合物与 DTNB 反应, 释放出的 2-氮-5-硫代苯甲酸在 412 nm 的消光系数为 13 L/(mmol·cm)^[13]。

1.2.6 LC-MS 分析

为鉴定给予 CySS 的细胞外泌有机硫醇化合物, 按 1.2.5 的方法培养并处理野生型菌株 MG1655, 用含 EDTA 的新鲜硫酸盐培养基重悬。加入 L-CySS 5 min 立刻收集样品, 未加 CySS 为

对照。过滤后在滤液中加入碘基水杨酸(终浓度 0.5%)以抑制硫醇氧化, 冻于干冰上, 采用 LC-MS 进行样品有机硫醇定量检测。Cys 标准品按相同方法准备^[14]。

1.3 统计学分析

用 SPSS17 (SPSS Inc., Chicago, IL) 进行统计学分析。CySS 及抗生素不同浓度组间由单因素方差分析(One-way ANOVA)及最小显著性差异法[Post hoc (LSD) tests] 进行差异显著性分析。 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 时具有显著和极显著的统计学意义。

2 结果与分析

2.1 胱氨酸对大肠杆菌抗生素及氧化损伤敏感性的影响

图 1 结果显示, 与空白对照相同, 5、10、20 mmol/L 的 CySS 都未表现出抑菌效果(图 1A 中 C2-C4); 当 CySS 与抗生素诺氟沙星(Nor)处理大肠杆菌细胞后, 菌细胞对 Nor 的敏感性变化具有

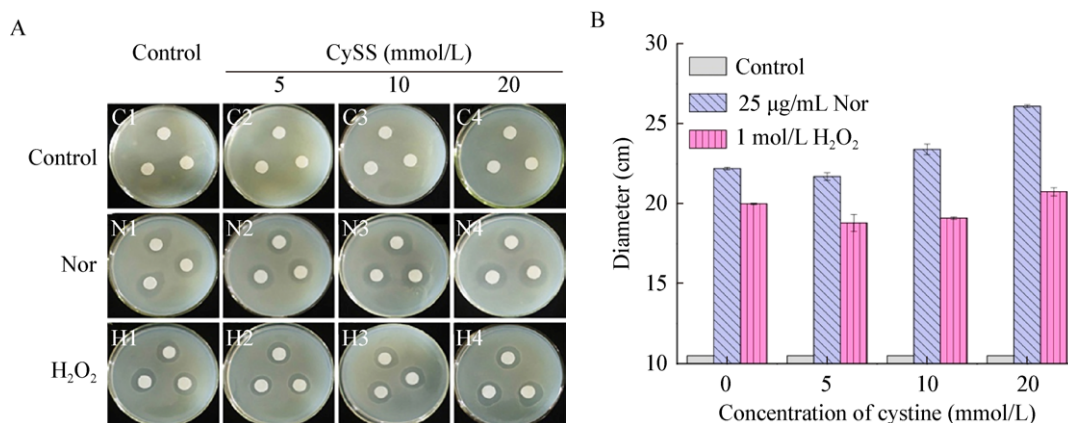


图 1 胱氨酸对大肠杆菌 MG1655 的诺氟沙星和 H₂O₂ 敏感性的影响

Figure 1 Effect of cystine on the sensitivity of Nor and H₂O₂ in *E. coli* strain MG1655

注: A: 抑菌圈照片; B: 抑菌圈直径柱状图。图 A 中部分抑菌圈形状不规则, 图 B 为作者采用多点测量, 取直径的平均值。C1: Control, 等体积缓冲液的空白对照; C2: 5 mmol/L 的 CySS 处理; C3: 10 mmol/L 的 CySS 处理; C4: 20 mmol/L 的 CySS 处理。N1: 25 µg/mL Nor; N2: 5 mmol/L CySS 加 25 µg/mL Nor 处理; N3: 10 mmol/L CySS 加 25 µg/mL Nor 处理; N4: 20 mmol/L CySS 加 25 µg/mL Nor 处理。H1: 1 mmol/L H₂O₂ 处理; H2: 5 mmol/L CySS 加 1 mmol/L H₂O₂ 处理; H3: 10 mmol/L CySS 加 1 mmol/L H₂O₂ 处理; H4: 20 mmol/L CySS 加 1 mmol/L H₂O₂ 处理。

Note: A: Pictures of inhibition zone; B: Column Chart of inhibition zone diameters. The data showed in B was averaged from multi-point measurement of irregularly-shaped inhibition zone. C1: Control, control of equal column buffer; C2: 5 mmol/L CySS; C3: 10 mmol/L CySS; C4: 20 mmol/L CySS. N1: 25 µg/mL Nor; N2: 5 mmol/L CySS plus 25 µg/mL Nor; N3: 10 mmol/L CySS plus 25 µg/mL Nor; N4: 20 mmol/L CySS plus 25 µg/mL Nor. H1: 1 mmol/L H₂O₂; H2: 5 mmol/L CySS plus 1 mmol/L H₂O₂; H3: 10 mmol/L CySS plus 1 mmol/L H₂O₂; H4: 20 mmol/L CySS plus 1 mmol/L H₂O₂.

统计学意义; 5 mmol/L 的 CySS 使大肠杆菌对 Nor 的敏感性显著降低, 抑菌圈的直径显著缩小 ($P < 0.05$, $P = 0.036$; 图 1A 中 N2); CySS 的浓度提高至 10 mmol/L 则使大肠杆菌对 Nor 的敏感性显著升高, 抑菌圈直径显著增大 ($P = 0.014 < 0.05$; 图 1A 中 N3, 图 1B); 20 mmol/L 的 CySS 使大肠杆菌对 Nor 的敏感性极显著的升高, 抑菌圈直径极显著增大 ($P < 0.01$; 图 1A 中 N4)。

类似地, 5 mmol/L 的 CySS 同样显著降低了大肠杆菌对外源 H_2O_2 氧化损伤的敏感性 ($P = 0.042 < 0.05$; 图 1A 中 C2, 图 1B), CySS 的浓度提高至 10 mmol/L 对 H_2O_2 氧化损伤的敏感性影响没有统计学意义 ($P > 0.05$; 图 1A 中 C3, 图 1B), 而 20 mmol/L 的 CySS 则同样升高了其敏感性 ($P = 0.016 < 0.05$; 图 1A 中 C4, 图 1B)。说明同样浓度的 CySS 处理后, 大肠杆菌对抗生素和 H_2O_2 的敏感性变化有所不同, 很有可能胞内 Cys 库的细微波动都会对细菌的耐药性产生影响。

2.2 胱氨酸对大肠杆菌耐药性的影响

未加抗生素的对照组中, 当培养基中 CySS 浓度不超过 1.0 mmol/L 时, 不影响大肠杆菌生长, CySS 浓度为 2.0 mmol/L 时, 大肠杆菌菌液浓度下降了 14.4% ($P < 0.01$; 图 2), 这说明浓度较低的 CySS (< 1.0 mmol/L) 自身并不影响大肠杆菌的生长。

硫酸庆大霉素(CN)的抑菌作用受 CySS 影响不大, 0.5 mmol/L CySS 处理能够显著提高 CN 2 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组的细菌耐药性 ($P = 0.033$ 63)。

诺氟沙星(Nor)的抑菌作用受 CySS 的影响具有极显著的统计学意义, 0.5 mmol/L CySS 处理后, 细菌对 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Nor 敏感性极显著增强 ($P = 0.006$ 299), 而 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 的 CySS 处理, 极显著地提高了细菌对 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Nor 的耐药性 ($P < 0.01$)。

氨苄青霉素(Amp)的抑菌作用受 CySS 的影响同样极具统计学意义, 但有效浓度与 Nor 有所区别。0.5 mmol/L CySS 处理后, 细菌对 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Amp 耐药性极显著增强 ($P = 0.002$ 905), 2.0 mmol/L

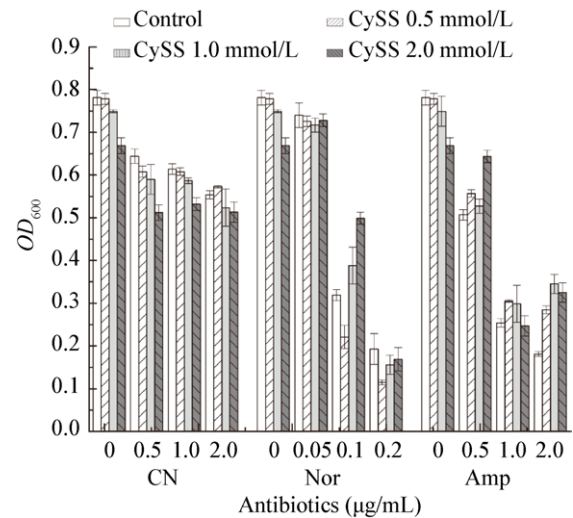


图 2 胱氨酸对大肠杆菌 MG1655 生长情况的影响

Figure 2 Effect of cystine on the growth of *E. coli* strain MG1655

注: 一直在硫酸盐(贫硫)培养基中生长的 MG1655 菌液, 分别加入 0.5、1.0、2.0 mmol/L CySS, 5 min 后分别加入不同浓度硫酸庆大霉素、诺氟沙星或氨苄青霉素。CN 为硫酸庆大霉素处理组, 浓度为 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$; Nor 为诺氟沙星处理组, 浓度为 0.05、0.10、0.20 $\mu\text{g/mL}$; Amp 为氨苄青霉素处理组, 浓度为 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

Note: Cyss (0.5, 1.0 or 2.0 mmol/L) was added in culture of MG1655 which grew in poor-sulfur (sulfate) media. After 5 min, gentamycin sulfate, norfloxacin or ampicillin with different concentration were added. CN: Gentamycin sulfate group (0.5, 1.0 or 2.0 $\mu\text{g/mL}$); Nor: Norfloxacin group (0.05, 0.10 or 0.20 $\mu\text{g/mL}$); Amp: Ampicillin group (0.5, 1.0 or 2.0 $\mu\text{g/mL}$).

CySS 处理更为显著地提高了细菌对 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的耐药性(增加了 26.9%, $P = 0.000$ 142 1)。Amp 浓度提高至 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 低浓度 CySS 也能够极显著地提高细菌对 Amp 的耐药性(与未处理的对照组相比, 0.5 mmol/L CySS 处理, $P = 0.000$ 167 7; 1.0 mmol/L CySS 处理, $P = 0.002$ 132; 2.0 mmol/L CySS 处理, $P = 0.002$ 838)。

2.3 半胱氨酸外排泵对大肠杆菌耐药性的影响

2.3.1 RNA-Seq 分析及 RT-qPCR 验证

采用 RNA-Seq 分析菌液中外加 CySS 的结果显示, Cys 突然积累时, *yhaOM* 被诱导了 50–100 倍(图 3A)。YhaO 应是 Cys 的内向转运蛋白, YhaM 是脱硫酶, 能够把 Cys 降解为丙酮酸、氨盐

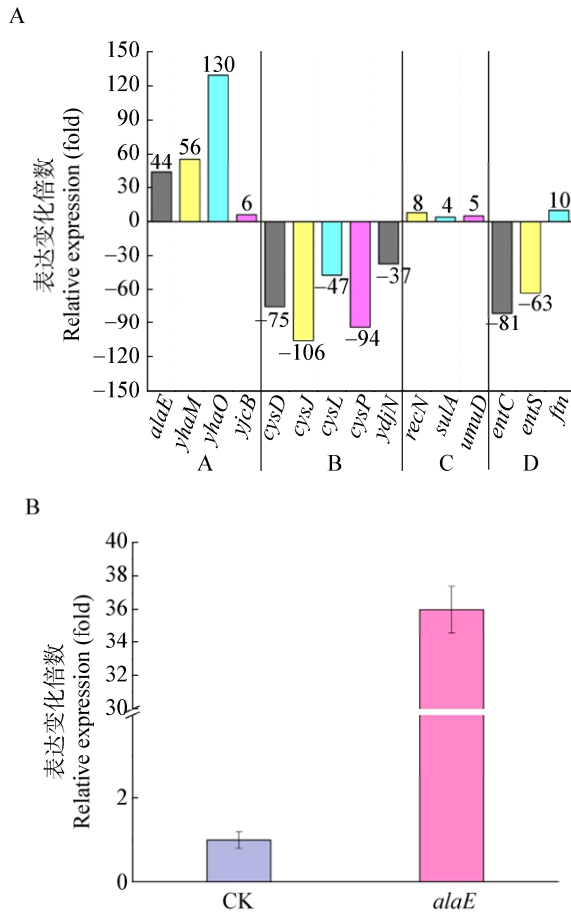


图3 胱氨酸内流的影响

Figure 3 Effect of cystine influx

注: A: CySS 加入硫酸盐培养的细胞前和加入后 5 min 的 RNA-Seq 比对分析; B: 目标基因 *alaE* 在 CySS 处理后的表达量 RT-qPCR 验证。

Note: A: RNA-Seq analysis of cells before and 5 min after cystine addition to sulfate-grown cells; B: Gene expression of the target genes *alaE* were performed by RT-qPCR.

和硫化物^[15-16]。YdjN 是大肠杆菌主要的 CySS 内向转运蛋白^[10], 处于过量 CySS 环境中, *ydjN* 被下调了 37 倍。

RNA-Seq 的结果显示, 未知基因 *alaE* 的表达被上调了 44 倍, 是 *yhaOM* 之外上调最为显著的基因(图 3A)。RT-qPCR 的结果证实, CySS 处理后, *alaE* 的表达极显著上调(图 3B)。本实验室敲除了 *alaE* 基因, 突变体具有胞内 Cys 库显著增大的两个表型: 细胞变得极端的 H₂O₂ 敏感, 并且表现出短暂的 Ile 营养缺陷(未发表结果)。因此, AlaE 应

是大肠杆菌主要的外向转运蛋白。另一个功能未知的外向转运蛋白 YjcB 也被诱导了 6 倍(图 3), 并且在 *alaE* 突变体中也被检测到具有较弱的 Cys 外排作用(未发表结果)。

DNA 损伤对调节子各成员诱导的程度不同, *recN* 是细菌 SOS 调节子最重要的成员, 在本实验室 CySS 处理后的大肠杆菌细胞中这类受 SOS 调控的修复酶(*recN*)被诱导上调了 8 倍(图 3)。因此, 微摩尔浓度水平的 H₂O₂ 可能是自然条件下最主要的 SOS 系统激活因素。*recN*、*sulA*、*umuCD* 等调控子成员(图 3), 分别被上调了 8、4 和 5 倍, 可温和地激活 SOS 系统调节子。此外, 相关的调控基因还包括编码蛋氨酸硫氧化物还原酶(*msrA*, *msrB*)、周质防御系统(*degP*, *cpxA*, *dsbB*, *ompF*, *skp*)、受 CysB 调控的 Cys 合成途径(*cysD*, *cysJ*, *cysL*, *cysP* 等)及受 Fur 调控的铁储存蛋白(*ftn*)、异分支酸合成酶(*entC*)和肠菌素的外向转运蛋白(*entS*)。RNA-Seq 的结果证明了 CySS 内流对 Fur、CysB 和 SOS 均具有显著的调控作用(图 3)。

2.3.2 AlaE 通过外向转运半胱氨酸实现对细胞的保护

图 4 结果显示, 单独的 CySS 处理就可以引起大肠杆菌细胞浓度的降低, 0.5 mmol/L 的 CySS 使其降至 94.3%, 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 的 CySS 使其分别降至 79.8% 和 74.0%。单独用 2.5 mmol/L 的 H₂O₂ 处理也有类似的效果, 大肠杆菌的生长速率会降至 75.1%。但贫硫环境中的大肠杆菌加入 0.5 mmol/L 的 CySS 为硫源, 再用 2.5 mmol/L 的 H₂O₂ 处理, 生长速率极显著地降低为 32.1%。1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 的 CySS 仅使 H₂O₂ 处理的效果略微提高, 大肠杆菌的浓度降至 27.1% 和 27.9%。如图 4 所示, 无论是不同浓度的 CySS 处理还是 H₂O₂ 处理, *alaE* 缺失突变株的菌细胞数均高于野生型菌株(绝大多数浓度范围内表现出显著或极显著的差异), 尤其是高浓度的 CySS 处理(1.0 或 2.0 mmol/L, *P*<0.01, 差异均为极显著), 强烈暗示 *alaE* 的突变应对细胞具有一定的保护作用。

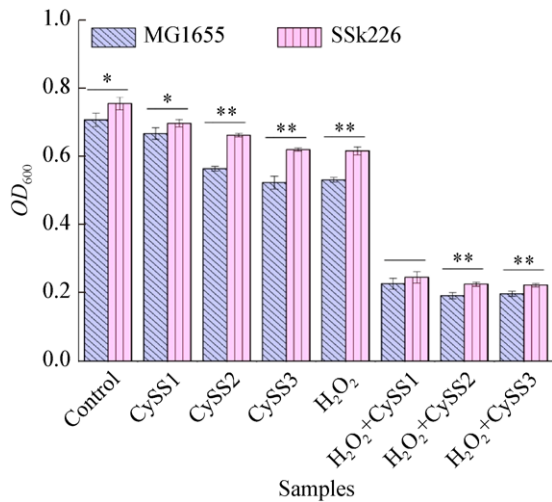


图4 AlaE 通过外向转运半胱氨酸实现对细胞的保护

Figure 4 AlaE protects cells by export of cysteine

Note: Control: Blank; CySS1: 0.5 mmol/L CySS; CySS2: 1.0 mmol/L CySS; CySS3: 2.0 mmol/L CySS; H₂O₂: 2.5 mmol/L H₂O₂; H₂O₂+CySS1: 2.5 mmol/L H₂O₂+0.5 mmol/L CySS; H₂O₂+CySS2: 2.5 mmol/L H₂O₂+1.0 mmol/L CySS; H₂O₂+CySS3: 2.5 mmol/L H₂O₂+2.0 mmol/L CySS. *: $P < 0.05$, significantly different; **: $P < 0.01$, highly significantly different.

硫醇外排的最大速率超过了所需 Cys 的 30 倍, 显示了 CySS 的过量内向转运。CySS 加入后, *ydjN* 转录被抑制(图 3), 随着细胞分裂, 现存的 YdjN 被稀释, 硫醇释放也相应逐步降低。

本研究发现, CySS 的快速过量内向转运会被细胞快速纠正: 被合成的 Cys 会被细胞直接泵出到胞外(图 5), 且速度非常惊人。Cys 进入并且离开胞质的速度是 70 mmol/(L·min)。这一“进入-还原-泵出”循环消耗的 ATP 大约是细胞总能耗的 10%, 并且在此过程中由于 CySS 的还原作用消耗的 NADPH 与所有其他生物合成所需相同。因此 Cys 的外流应是针对过量内流这一问题极端耗费能量的修复过程^[10]。

2.3.3 AlaE 缺失对大肠杆菌耐药性的影响

为分析 Cys 外排泵 AlaE 调控胞内 Cys 浓度对大肠杆菌耐药性的影响, 采用 RNA-Seq 分析得到的 Cys 外排泵 AlaE 的缺失突变菌株 SSK226, 分别采用单独抗生素 Amp 处理, 以及抗生素与 CySS 协同处理, 比较野生型菌株 MG1655 和 SSK226 的耐药性差异。

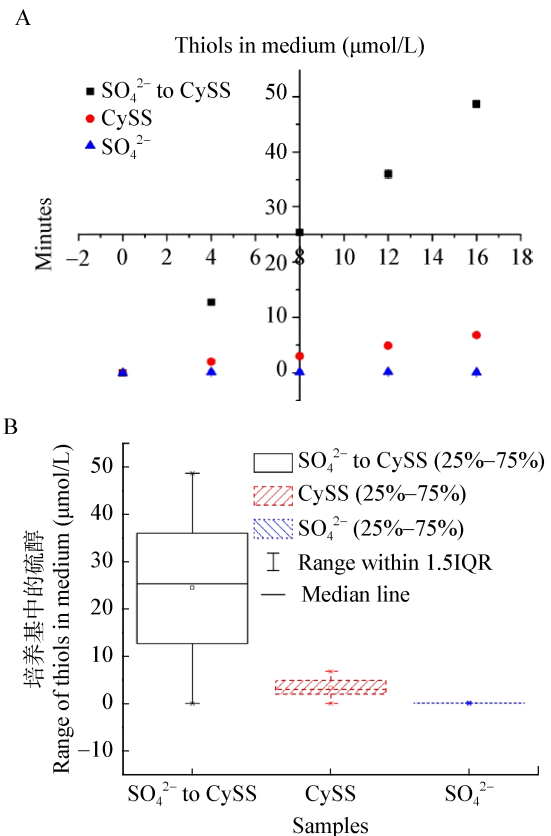


图5 过量半胱氨酸的外流

Figure 5 Excessive flow of excess cysteine

注: A: 中心散点图; B: 箱式图。SO₄²⁻ to CySS: 硫源由 SO₄²⁻ 变为 CySS, 硫酸盐中生长的细胞在加入 CySS 后会出大量的 Cys 外流; LC-MS 分析显示 95% 的硫醇信号来自 Cys, 余下为 H₂S。CySS: CySS 中的持续生长抑制了 CySS 内向转运蛋白 YdjN 的表达, 所以 Cys 外流显著降低。SO₄²⁻: 持续在硫酸盐中生长的菌株既无 Cys 也无 H₂S 释放。

Note: A: Central scatter plot; B: Box plot. SO₄²⁻ to CySS: Cells grown in sulfate released high amounts of cysteine after cysteine is added. LC-MS analysis showed that 95% of the thiol signal represents cysteine, the remainder is sulfide. CySS: Continuous growth in cystine repressed expression of the cystine importer YdjN, so cysteine excretion is much lower. SO₄²⁻: Neither cysteine nor sulfide was released during constant growth on sulfate.

与图 4 结果一致的是, Amp 处理后, *alaE* 突变株 SSK226 同样表现出对细胞损伤的保护作用, 但此保护作用有一定的有效浓度范围(图 6)。当 Amp 浓度在 1.0 μg/mL 和 2.5 μg/mL 时, SSK226 的细胞数均极显著高于野生型 MG1655 ($P = 0.006\ 729$ 和 $0.001\ 457$), Amp 达到 5.0 μg/mL 时, 两菌株生长相近。Amp 浓度更高时, *alaE* 突变株甚至表现

出受到更强的损伤(图 6A)。当 Amp 与 CySS 共同作用于大肠杆菌时,突变菌株与野生型的差异普遍增强,除 Amp 单独处理组和 Amp 与 0.25 mmol/L CySS 共同处理组为显著差异($P<0.05$),其他组均为极显著差异(图 6B, $P<0.01$)。在同一 Amp 浓度下(1.0 $\mu\text{g/mL}$),0.25–0.5 mmol/L 的 CySS 可增强 *alaE* 突变的细胞保护作用(图 6B)。

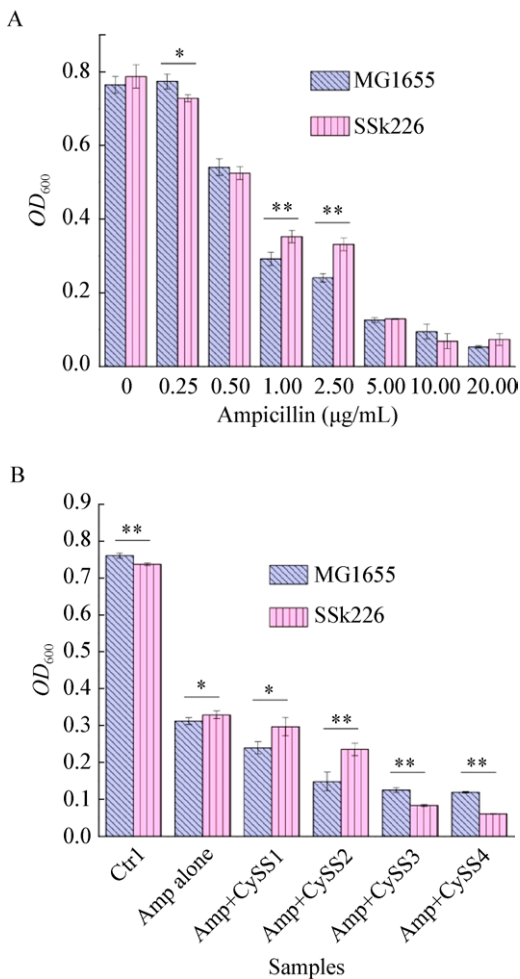


图 6 胱氨酸对野生型 MG1655 及 *alaE* 突变株 SSk226 耐药性的影响

Figure 6 Effect of cystine on the drug resistance of *E. coli* wildtype strain MG1655 and *alaE* mutant SSk226

Note: A: Treatments with different concentration Amp; B: Treatments with Amp plus CySS. Ctrl: Blank; Amp alone: Treated with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Amp alone; Amp+CySS1: 0.25 mmol/L CySS+1.0 $\mu\text{g/mL}$ Amp; Amp+CySS2: 0.5 mmol/L CySS+1.0 $\mu\text{g/mL}$ Amp; Amp+CySS3: 1.0 mmol/L CySS+1.0 $\mu\text{g/mL}$ Amp; Amp+CySS4: 2.0 mmol/L CySS+1.0 $\mu\text{g/mL}$ Amp.

3 讨论与结论

氧化胁迫应是自然界生物体面临的最为常见的共同威胁。由于氧化抗性机制的不同,生物体可被清晰地分为需氧、微需氧或厌氧生物。迄今为止,我们对氧化物损伤细胞机制的理解并不清楚,生物体保护自身的防御机制尚未阐明^[17]。

本实验的结果显示,在贫硫液体培养基中单独加入 CySS 对大肠杆菌的生长有轻微的抑制效果(较野生型相比生长速率降低至 94.3%),并且抑制效果和 CySS 浓度呈正相关。当生长于贫硫环境中的大肠杆菌细胞先接触到 0.5 mmol/L 的 CySS 时,立即将其快速摄入并还原为 Cys,若此时再用 2.5 mmol/L 的 H_2O_2 处理,生长速率极显著地降低为 32.1%。但 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 的 CySS 仅使 H_2O_2 处理的效果略微提高至 27.1% 和 27.9%。由此暗示,0.5 mmol/L 的 CySS 能够引起大肠杆菌胞内的 Cys 库最为显著的提高。同时,也是在此浓度下,可以最大限度地增强其耐药性。随着 CySS 浓度的提高,这种效果越来越弱,在 CySS 浓度达到 2.0 mmol/L 时,表现为增强大肠杆菌对抗生素或 H_2O_2 的敏感型增强。抑菌圈法与液体培养的结果相类似,较低浓度(0.5 mmol/L)的 CySS 处理能够显著提高抗生素及 H_2O_2 的杀菌效果,而随着 CySS 浓度的提高,其对耐药性的增强效果越来越明显。

多年以来,很多实验室都已构建了可以大量生产氨基酸的工业菌种。当意外发现额外的氨基酸会被分泌到培养基中时,这一发现启发研究者开始探讨相应的外向转运系统。截至目前至少有 6 个转运蛋白已被报道能够外向转运 Cys^[12]。然而这些结果都是基于外向转运蛋白的过表达。所有情况下,转运蛋白结构基因的敲除并不影响 Cys 的外向转运。我们敲除了文献[12]中所有的这 6 个蛋白,不管是单独敲除还是组合敲除,都对外向转运的速率或者是胞内的 Cys 水平没有影响。为了解释这一问题,我们分析了外加 CySS 后细胞的 RNA-Seq 数据(图 3),并通过实验证实,

外向转运蛋白 AlaE 能够在自然条件下将重要代谢物 Cys 运出胞外, 并且极显著地影响了细菌对抗生素的敏感性(图 5)。

少量的 CySS 只能引起 Cys 库短时间的上升, 造成有限的细胞损伤, 从而利于耐药性的产生。随着 CySS 浓度升高, 有更多的·OH 持续产生, 细胞损伤的程度超出了其自身的修复能力, 也就导致了细胞的死亡。

因此, 与之前本实验室的研究一致, H₂O₂ 的含量并不是细菌损伤的关键, 关键在于 H₂O₂ 的转化方向, 即是否会继续生成·OH^[18-19]。能够耐受高水平 H₂O₂ 的菌株, 是因为它们能够避免使 H₂O₂ 持续生成·OH。本实验室通过在贫硫环境下控制细胞内 Cys 库的水平来控制内源 H₂O₂ 的转化方向, 结果显示低浓度的 CySS 确实有助于提高细菌的耐药性, 该结果为细菌耐药性产生的机制提供了新的理论依据和研究方向。

REFERENCES

- [1] Pang B, Du PC, Zhou ZM, et al. The transmission and antibiotic resistance variation in a multiple drug resistance clade of *Vibrio cholerae* circulating in multiple countries in Asia[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149742
- [2] Zhu Z, Cao MZ, Zhang JL, et al. Research progress on bacterial resistance[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42(12): 3371-3376 (in Chinese)
朱阵, 曹明泽, 张吉丽, 等. 细菌耐药性研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(12): 3371-3376
- [3] Park S, Imlay JA. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(6): 1942-1950
- [4] Imlay JA, Linn S. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986, 166(2): 519-527
- [5] Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics[J]. *Cell*, 2007, 130(5): 797-810
- [6] Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(6): 423-435
- [7] Becerra MC, Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 297(4): 1003-1007
- [8] Ma LN, Mi HF, Xue YX, et al. The mechanism of ROS regulation of antibiotic resistance and antimicrobial lethality[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(10): 902-909 (in Chinese)
马丽娜, 米宏霏, 薛云新, 等. ROS 在细菌耐药及抗生素杀菌中的作用机制[J]. *遗传*, 2016, 38(10): 902-909
- [9] 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
- [10] Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(3): 175-186
- [11] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [13] Imlay KRC, Korshunov S, Imlay JA. Physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(23): 3629-3644
- [14] Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(11): 6957-6965
- [15] Méndez J, Reimundo P, Pérez-Pascual D, et al. A novel *cdsAB* operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in the pathogenesis of *Yersinia ruckeri*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(4): 944-951
- [16] Oguri T, Schneider B, Reitzer L. Cysteine catabolism and cysteine desulfhydrase (CdsH/STM0458) in *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4366-4376
- [17] Lobritz MA, Belenky P, Porter CBM, et al. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(27): 8173-8180
- [18] Li X, Zhong YL, Feng YJ. Transformation of endogenous reactive oxygen species participates into bacterial antibiotic resistance[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2018, 52(4): 446-450 (in Chinese)
李欣, 钟永亮, 冯友军. 细菌耐药机制: 内源活性氧分子的角色[J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(4): 446-450
- [19] Li X, Imlay JA. Improved measurements of scant hydrogen peroxide enable experiments that define its threshold of toxicity for *Escherichia coli*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 120: 217-227