

研究报告

亚抑菌浓度博落回生物碱对 ExPEC 主要外膜蛋白和 II 型 T-A 系统表达的影响

侯博^{*1}, 王晨燕¹, 栗绍文², 周伦江^{*1}, 车勇良¹, 陈秋勇¹

1 福建省农业科学院畜牧兽医研究所 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013

2 华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070

侯博, 王晨燕, 栗绍文, 周伦江, 车勇良, 陈秋勇. 亚抑菌浓度博落回生物碱对 ExPEC 主要外膜蛋白和 II 型 T-A 系统表达的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2183-2192

Hou Bo, Wang Chenyan, Li Shaowen, Zhou Lunjiang, Che Yongliang, Chen Qiuyong. Effects of sub-inhibitory concentrations of alkaloids from *Macleaya cordata* on the expression of outer membrane protein and type II toxin-antitoxin systems of ExPEC[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2183-2192

摘要:【背景】血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱等生物碱是我国二类新兽药博落回散和博普总碱散的主要成分, 具有广泛的药理作用。【目的】研究亚抑菌浓度血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱对肠外致病性大肠杆菌(extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)主要外膜蛋白及其调控基因和 II 型毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, T-A)系统基因表达的影响, 初步探讨博落回生物碱对 ExPEC 细菌生理活动影响的可能机制。【方法】比较不同 II 型 T-A 系统基因 *yafON*、*hicAB*、*prlF-yhaV* 缺失的 ExPEC 对血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱及抗生素的最小抑菌浓度; 在 1/2 MIC 亚抑菌浓度血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱条件下, 比较它们对 ExPEC 野生型(wild type, WT)菌株和外膜蛋白 *tolC* 缺失菌株($\Delta tolC$)的不同外膜蛋白基因 *ompC*、*ompX*、*tolC*、*ompF* 和调控基因 *acrR*、*rob*、*marR*、*rpoS*、*soxS* 表达的影响, 以及对 T-A 系统基因 *yafON*、*hicAB*、*prlF-yhaV* 表达的影响。【结果】T-A 系统 *hicAB* 和 *prlF-yhaV* 缺失菌株对氯霉素的敏感性提高 2–4 倍, 而且 *hicAB* 缺失菌株对血根碱的敏感性也提高 2 倍; 1/2 MIC 白屈菜红碱显著促进 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *ompX* 和 *tolC* 基因表达, 而血根碱抑制 WT 菌株 *tolC* 基因的表达; 在 $\Delta tolC$ 菌株中 1/2 MIC 血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱不同程度地促进 *ompX* 和 *ompC* 的基因表达, 而对 *ompF* 存在着不同程度的抑制; 1/2 MIC 血根碱和白屈菜红碱显著促进 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *marR* 基因表达, 并且血根碱还可以促进 *rpoS* 基因的表达。1/2 MIC 原阿片碱显著降低 WT 菌株的 *yafN* 基因表达, 而显著增

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31802190); 福建省自然科学基金(2018J05053); 福建省农业科学院基金项目(AGY2018-4)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31802190); Natural Science Foundation of Fujian Province (2018J05053); Fujian Academy of Agricultural Sciences Foundation (AGY2018-4)

*Corresponding authors: E-mail: HOU Bo: houbohouwei@126.com; ZHOU Lunjiang: lunjiang@163.com

Received: 2021-09-30; Accepted: 2021-12-08; Published online: 2022-01-07

加 $\Delta tolC$ 菌株的 *yafN* 基因表达水平; 1/2 MIC 血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱不同程度地抑制 WT 菌株 *hicA* 和 *hicB* 基因表达, 而促进 $\Delta tolC$ 菌株 *hicA* 和 *hicB* 的基因表达; 1/2 MIC 血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱不同程度地促进 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *prlF* 基因表达, 而血根碱显著抑制 *yhaV* 基因表达。【结论】II 型 T-A 系统和外膜蛋白参与 ExPEC 对不同生物碱的应激反应, 外膜蛋白 TolC 的完整性对于 T-A 系统参与细菌应激具有一定的影响, 并且其机制可能存在不同。

关键词: 肠外致病性大肠杆菌; 博落回生物碱; 亚抑菌浓度; 外膜蛋白; 毒素-抗毒素系统

Effects of sub-inhibitory concentrations of alkaloids from *Macleaya cordata* on the expression of outer membrane protein and type II toxin-antitoxin systems of ExPEC

HOU Bo^{*1}, WANG Chenyan¹, LI Shaowen², ZHOU Lunjiang^{*1}, CHE Yongliang¹, CHEN Qiuyong¹

1 Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian, China

2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: [Background] Protopine, sanguinarine, and chelerythrine are main components of the new veterinary drugs Boluohui powder and Bopuzongjian powder in China, which have multiple pharmacological effects. **[Objective]** To preliminarily reveal the influence and mechanisms of the alkaloids from *Macleaya cordata* on the physiological activities of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), we evaluated the effects of sub-inhibitory concentrations of sanguinarine, chelerythrine, and protopine on the expression of outer membrane protein (OMP), their regulatory genes, and type II toxin-antitoxin (T-A) systems of ExPEC. **[Methods]** We measured the minimum inhibitory concentrations (MICs) of protopine, sanguinarine, chelerythrine, and antibiotics on the ExPEC mutants with the deletion of *yafON*, *hicAB*, and *prlF-yhaV*. We then compared the expression of OMP genes (*ompC*, *ompX*, *tolC*, and *ompF*), their regulatory genes (*acrR*, *rob*, *marR*, *rpoS*, and *soxS*), and type II T-A systems (*yafON*, *hicAB*, and *prlF-yhaV*) between WT and the *tolC*-deleted strain ($\Delta tolC$) exposed to 1/2 MIC of protopine, sanguinarine, and chelerythrine. **[Results]** The sensitivity of *hicAB*- and *prlF-yhaV*-deleted strains to chloramphenicol increased by 2–4 times, and that of *hicAB*-deleted strain to sanguinarine also increased by 2 times. Chelerythrine at 1/2 MIC significantly up-regulated the expression of *ompX* and *tolC* in WT and $\Delta tolC$, while sanguinarine inhibited the expression of *tolC* in WT. Protopine, sanguinarine, and chelerythrine at 1/2 MIC up-regulated the expression of *ompX* and *ompC* while down-regulated that of *ompF* in $\Delta tolC$. Sanguinarine and chelerythrine at 1/2 MIC significantly promoted the *marR* expression in WT and $\Delta tolC$. Moreover, sanguinarine improved the expression of *rpoS*. Protopine at 1/2 MIC significantly lowered the expression of *yafON* in WT while significantly increased that in $\Delta tolC$. Protopine, sanguinarine, and chelerythrine at 1/2 MIC down-regulated the expression of *hicA* and *hicB* in WT while up-regulated that in $\Delta tolC$. They improved

the expression of *prlF* in WT and $\Delta tolC$, while sanguinarine significantly inhibited the expression of *yhaV*. **[Conclusion]** Type II T-A systems and OMPs participate in the responses of ExPEC to alkaloids. The integrity of OMPs (such as TolC) affects the role of T-A systems in bacterial responses to stress, the mechanisms of which remain unclear.

Keywords: extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC); alkaloids of *Macleaya cordata*; sub-inhibitory concentration; outer membrane protein (OMP); toxin-antitoxin (T-A) system

博落回是罂粟科博落回属的多年生草本植物,是一种富含生物碱的传统中药材,其主要活性成分均属异喹啉类生物碱,具有抗菌、杀虫、抗病毒、抗肿瘤、镇痛、消炎、改善肝功能及增强免疫力等多方面的药理作用^[1]。断奶仔猪使用博落回提取物(血根碱为主要有效成分)可以增加血清中溶菌酶的浓度,并且可以提高巨噬细胞吞噬指数^[2]。血根碱具有很强的抗菌活性,最初一直在牙膏和口腔冲洗液中使用,对口腔微生物具有很好的抗菌活性^[3-4]。血根碱对禽中临床分离的革兰氏阳性菌和阴性菌同样具有抗菌活性或显著的抑菌作用,与抗生素(例如链霉素、万古霉素、氨苄西林、苯唑西林、诺氟沙星、环丙沙星)联合使用对许多革兰氏阳性菌和阴性菌(包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)表现出协同抗菌作用,并且还可以降低各个药物的有效剂量^[5-8]。血根碱可以诱导耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株膜结合细胞壁自溶酶的释放,导致菌体的溶解,并且血根碱还可以改变细胞膜的形态结构^[8]。此外,血根碱还具有抗真菌活性^[9]。

肠外致病性大肠杆菌(extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC)是一种重要的病原菌,近年来对畜牧业(猪、禽、牛、羊)和人类健康的危害日益受到关注,多重耐药性和生物被膜的形成更增加了其防控的难度及对公共卫生的威胁。华中农业大学从我国不同地区猪场病猪的心、肺、肝、肾、脑、血液等组织器官分离鉴定了大量的大肠杆菌,300余株经血清分型和毒力因子检测鉴定为 ExPEC,这些菌株可造成猪脑膜炎、

败血症和肺炎等^[10]。对这些菌株进行药敏试验表明,它们均为多重耐药菌株,耐药谱广、耐药性强^[11]。ExPEC 菌株目前广泛地从不同国家零售鸡肉、牛肉、猪肉、餐馆、即食食品(包括肉类、水果和蔬菜)中分离得到^[12-14],因此,推测肉制品可能是人 ExPEC 感染的最主要来源。

本研究通过测定 ExPEC PPECC042 菌株对博落回主要活性成分血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱的最小抑菌浓度,研究亚抑菌浓度的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱对 ExPEC 主要外膜蛋白和 II 型毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, T-A)系统基因及其调控基因表达的影响,初步探讨博落回生物碱对 ExPEC 的抑菌作用及对细菌生理活动的影响,以期对临床认识和理解博落回生物碱的药理作用及正确合理使用药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

ExPEC 野生型分离株 PPECC042 (WT)、*tolC* 基因缺失株 PPECC042: $\Delta tolC$ ($\Delta tolC$)、*hicAB* 基因缺失株 PPECC042: $\Delta hicAB$ ($\Delta hicAB$)、*yafON* 基因缺失株 PPECC042: $\Delta yafON$ ($\Delta yafON$)和 *prlF-yhaV* 基因缺失株 PPECC042: $\Delta prlF-yhaV$ ($\Delta prlF-\Delta yhaV$)均由本研究室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

环丙沙星、氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素, Sigma 公司;血根碱、白屈菜红碱和原阿片碱由湖南农业大学曾建国惠赠;RNA 提取试

剂盒 RNeasy Mini Kit, Qiagen 公司; DNase I 和溶菌酶, Fermentas 公司; 反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit, Thermo Fisher 公司; 荧光定量试剂盒 SYBR Select Master Mix, Roche 公司; 引物(表 1)由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

表 1 用于 qRT-PCR 的引物
Table 1 Primers for qRT-PCR

Primer name ^a	Sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>rrsGF</i>	TATTGCACAATGGGCGCAAG ^[15]	234
<i>rrsGR</i>	ACTTAACAAACCGCCTGCGT ^[15]	
<i>ompCF</i>	CACTACCGTTTTTACCCTGA	136
<i>ompCR</i>	GGTGGTGATACCTACGATTC	
<i>ompXF</i>	CTGCAACTTCTACCGTAACT	109
<i>ompXR</i>	GGGCTGTTGTCTTCTTCATA	
<i>ompFF</i>	GTTACGACCGTAGTCGATAG	187
<i>ompFR</i>	TTATGCCCCGTCTTGTTTGA	
<i>tolCF</i>	TCCCTGCAGTTAACTCAATC	151
<i>tolCR</i>	TCAACACGTTGAAATAAGCG	
<i>acrRF</i>	TTGATTGGGTTCTACTTCG	142
<i>acrRR</i>	GCCAGACAGGTGATGATAAA	
<i>robF</i>	GACGGTTTATCCTTACGACA	217
<i>robR</i>	AGTTAACGTGTTGATGGTGA	
<i>marRF</i>	AATTATTCCATTGGGTCGCT	156
<i>marRR</i>	TTTTTCAGTTCAACCGGAGT	
<i>rpoSF</i>	ATTTATGTCGATCTCACGCA	220
<i>rpoSR</i>	CATTTGGGTTGGGGAAAATC	
<i>soxSF</i>	CCAACCCAGCTAAAGTTAT	210
<i>soxSR</i>	ACCAATCTTGATGTGCTGAT	
<i>bcrF</i>	GTGAAAAATGTGCTGACGAT	149
<i>bcrR</i>	TTGACAATCTCAACATCGGT	
<i>yafOF</i>	CCAATTCAGCAGAACGAATG	123
<i>yafOR</i>	TTGTTATCTCGAGCCAGTTT	
<i>yafNF</i>	TCTTTCTAATAATCGCCCCG	147
<i>yafNR</i>	CGGCGTGTAATTCCTCTAA	
<i>hicAF</i>	TGGCAGCAACCATTAAAC	119
<i>hicAR</i>	AACTCAAACCGAGTTGTTTC	
<i>hicBF</i>	GTCGCCTCTAAAGTATTGCT	117
<i>hicBR</i>	GTGCAAGTTAAATAGGCGAG	
<i>prlFF</i>	ATTACGAAATTCTGCCTGGT	142
<i>prlFR</i>	TGAATGTTGAATGGACGAGT	
<i>yhaVF</i>	GCGGTAGTCCATAAAGTGAT	248
<i>yhaVR</i>	TTGCTGAATACGGTATAGGC	

Note: ^a: Subscripts F and R indicate forward primers and reverse primers.

1.2 不同菌株对药物 MIC 的测定

参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (M100-S19) 推荐的肉汤微量稀释法^[16], 以 LB 培养基测定 WT、 $\Delta hicAB$ 、 $\Delta yafON$ 、 $\Delta prlF-yhaV$ 和 $\Delta tolC$ 菌株对不同药物的 MIC。所测 MIC 的药物分别为环丙沙星、氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、血根碱、白屈菜红碱和原阿片碱。每次试验 3 个重复, 重复 3 次, 比较不同菌株对不同药物的 MIC。

1.3 qRT-PCR 基因表达分析

1.3.1 细菌 RNA 的提取和反转录

将 WT、 $\Delta tolC$ 菌株分别接种含 1/2 MIC 亚抑菌浓度的白屈菜红碱、原阿片碱和血根碱的 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h, 向培养物中以 1:5 的体积比迅速加入预冷的酚:乙醇 (1:9) 溶液, 冰浴 10 min 后 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 收集细菌菌体, 按照溶菌酶使用说明书将菌体用溶菌酶处理后, 按照 RNeasy Mini Kit 说明书提取总 RNA, 并以 DNase I 对 RNA 进行处理去除基因组 DNA。将提取的总 RNA 按照 PrimeScript RT Reagent Kit 说明书反转录为 cDNA 后 -40 °C 保存备用。

1.3.2 实时荧光定量 PCR

参照 SYBR Select Master Mix 说明书采用 SYBR green 法, 以 *rrsG* 基因作为内参基因, 对外膜蛋白基因 *ompC*、*ompX*、*ompF*、*tolC* 及调控基因 *acrR*、*rob*、*marR*、*rpoS*、*soxS*、*bcr* 和 II 型 T-A 系统基因 *yafON*、*hicAB*、*prlF-yhaV* 进行表达量分析, 实验所用引物见表 1。PCR 反应体系: 2×SYBR qPCR Mix 12.5 μL, cDNA 2.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, ddH₂O 8.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 然后从 72 °C 升至 95 °C, 每 20 s 升温 1 °C, 进

行熔解曲线分析。结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法, 即 $\Delta C_t = C_t(\text{目的基因}) - C_t(\text{内参基因})$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{处理组}) - \Delta C_t(\text{参照组})$, 参照组目的基因相对表达倍数即为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.4 统计分析

采用非配对 Student's *t* test 的统计学分析方法进行统计学显著性差异分析, 其中两组之间的 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 不同菌株对不同药物 MIC 的测定结果

采用微量肉汤稀释法对 WT、 $\Delta hicAB$ 、 $\Delta yafON$ 、 $\Delta prfF-yhaV$ 和 $\Delta tolC$ 菌株测定不同药物的 MIC, 结果如表 2 所示, $\Delta tolC$ 菌株对环丙沙星、氯霉素的敏感性与 WT 菌株相比显著增加, 与文献[17]报道的一致。 $\Delta hicAB$ 和 $\Delta prfF-yhaV$ 菌株对氯霉素敏感性略有升高, 分别为 4 倍和 2 倍。此外, $\Delta tolC$ 菌株对原阿片碱、血根碱、白屈菜红碱的敏感性分别提高 2、16 和 16 倍, 并且 $\Delta hicAB$ 菌株对血根碱的敏感性增加了 2 倍(表 2)。结果表明, TolC 不仅在 ExPEC 的抗生素抗性方面发挥着重要作用, 还可以对原阿片碱、血根碱、白屈菜红碱等生物碱的抗性发挥着重要作用; 此外, 细菌的不同

表 2 ExPEC 及其来源的不同菌株对抗菌剂的敏感性测定

Table 2 Antimicrobial susceptibilities of ExPEC strains ($\mu\text{g/mL}$)

Strain	KAN	CIP	AMP	CHL	PRO	SAN	CHE
WT	>512	256	>512	32	256	128	256
$\Delta hicAB$	>512	256	>512	8	256	64	256
$\Delta yafON$	>512	256	>512	32	256	128	256
$\Delta prfF-yhaV$	>512	256	>512	16	256	128	256
$\Delta tolC$	>512	16	>512	1	128	8	16

Note: KAN: Kanamycin; AMP: Ampicillin; CHL: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; PRO: Protopine; SAN: Sanguinarine; CHE: Chelerythrine.

T-A 系统或许可能在抗生素和生物碱的敏感性方面也发挥着作用。

2.2 亚抑菌浓度血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱对细菌外膜蛋白基因及调控基因表达的影响结果

外膜蛋白是 ExPEC 含有的独特的脂质双分子层结构外膜, 其在增强细菌黏附侵袭能力、物质运输及相关功能物质的合成等方面发挥着重要作用^[17-18], 外膜蛋白还可以改变细胞外膜的通透性而诱导细菌耐药性的形成^[18], 因此, 本研究在亚抑菌浓度的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在下, 比较了 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的主要外膜蛋白基因的表达水平。结果表明: 当在 1/2 MIC 血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在时对 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株 *ompX*、*ompF*、*tolC* 基因的表达水平具有较大影响, 对 *ompC* 基因的表达水平影响较小; 其中, 当存在 1/2 MIC 白屈菜红碱时, WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *ompX* 和 *tolC* 基因的表达水平显著升高($P < 0.01$); 当存在 1/2 MIC 血根碱时, WT 菌株的 *tolC* 基因的表达水平显著下降($P < 0.01$) (图 1A)。在 $\Delta tolC$ 菌株中, 1/2 MIC 血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱可以不同程度地促进 *ompX* 和 *ompC* 基因的表达, 相反地, 它们对 *ompF* 基因的表达却存在着不同程度的抑制($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (图 1A)。结果表明, 不同的生物碱对不同的外膜蛋白表达有不同的影响, 或许是由于不同生物碱对不同细胞外膜蛋白的通透性不同或适配性不同造成的。

通过对参与外膜蛋白调控的部分调控子基因表达水平分析, 结果显示当存在 1/2 MIC 血根碱时, WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *marR* 和 *rpoS* 基因的表达水平显著升高($P < 0.01$), 并且 *marR* 基因在 1/2 MIC 白屈菜红碱时的表达水平也显著升高($P < 0.01$) (图 1B)。结果表明, 不同的生物碱对于 ExPEC 参与应激反应具有不同的分子机

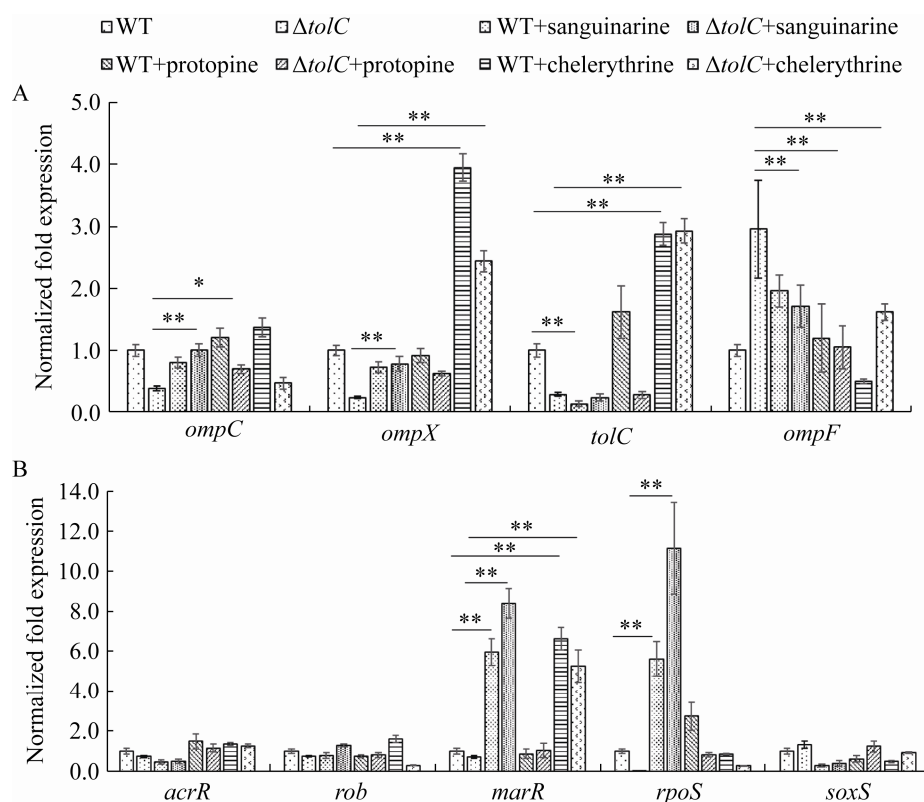


图 1 亚抑菌浓度生物碱对 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株外膜蛋白基因(A)及调控基因表达的的影响(B) 数据以平均值 \pm 标准误表示。以双尾非配对 t 检验进行差异性显著分析, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。下同

Figure 1 The effects of sub-inhibitory concentrations of alkaloids to outer membrane protein genes (A) and their regulatory genes (B) expression of ExPEC WT and $\Delta tolC$ strain. Values are shown in means \pm standard error of the mean. Statistically significant fold changes were determined using two-tailed unpaired Student's t tests. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$. The same below.

制,而且 TolC 外膜蛋白的缺失与否对细菌参与应激反应同样具有影响作用。

2.3 亚抑菌浓度血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱对细菌 II 型 T-A 系统基因表达的影响结果

T-A 系统在维持细菌生理功能方面发挥着重要作用,本研究在亚抑菌浓度的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在下比较了 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *yafON*、*hicAB* 和 *prlF-yhaV* 这 3 个 T-A 系统基因的表达水平。结果显示,在 1/2 MIC 的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在下,可以不同程度地影响 WT 菌株和 $\Delta tolC$ 菌株的

yafO 和 *yafN* 基因的表达水平,当白屈菜红碱存在时 WT 菌株的 *yafO* 和 *yafN* 基因水平表达显著上升($P<0.01$),当原阿片碱存在时显著降低了 WT 菌株的 *yafN* 基因表达($P<0.01$);在 $\Delta tolC$ 菌株中,当存在原阿片碱时 *yafN* 基因的表达水平显著增加($P<0.01$) (图 2A)。在 1/2 MIC 的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在下,可以不同程度地降低 WT 菌株的 *hicA* 和 *hicB* 基因表达,而促进 $\Delta tolC$ 菌株中 *hicA* 和 *hicB* 基因的表达,其中原阿片碱对 $\Delta tolC$ 菌株 *hicA* 和 *hicB* 基因表达的促进作用最强($P<0.01$) (图 2B),结果表明外膜蛋白 TolC 的完整性对于 T-A 系统 *hicAB* 参

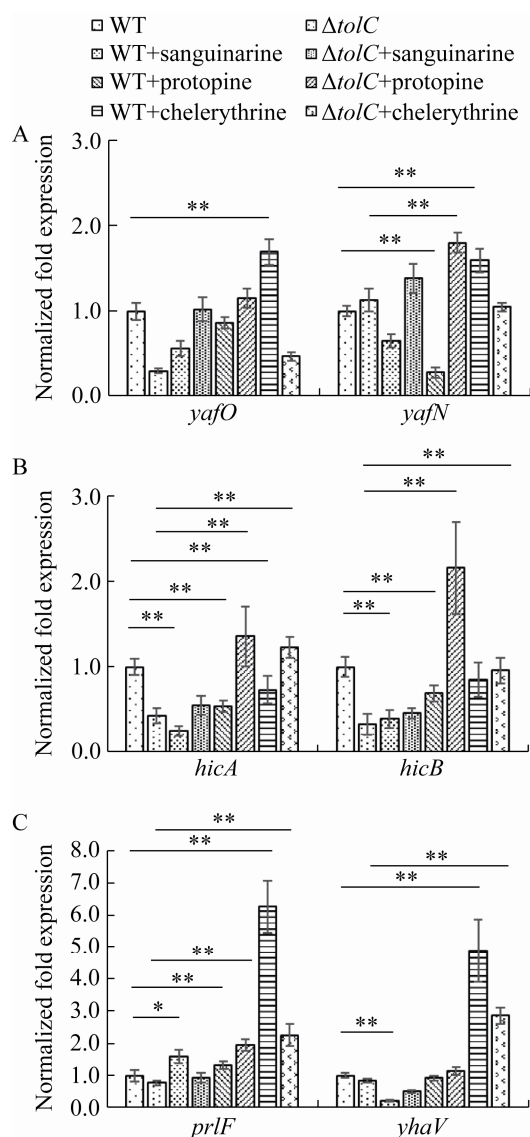


图 2 亚抑菌浓度生物碱对 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株 II 型 T-A 系统基因表达的影响

Figure 2 The effects of sub-inhibitory concentrations of alkaloids to type II T-A genes expression of ExPEC WT and $\Delta tolC$ strain.

与细菌应激具有一定的影响。在 1/2 MIC 的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在下,可以不同程度地促进 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *prlF* 基因表达,并且 WT 菌株在 1/2 MIC 的白屈菜红碱存在下 *prlF* 和 *yhaV* 基因表达水平与不存在生物碱相比表达量分别增加了 6 倍和 5 倍,而在

$\Delta tolC$ 菌株中其表达量也呈现显著增加;在血根碱存在的情况下,WT 菌株的 *prlF* 基因表达量略有增加外,*yhaV* 基因的表达量显著降低,是不添加生物碱的 0.22 倍(图 2C)。因此,结果表明 II 型 T-A 系统参与了 ExPEC 不同生物碱的应激反应,并且外膜完整性对不同 T-A 系统参与生物碱的应激反应具有不同的作用。

3 讨论与结论

3.1 亚抑菌浓度博落回生物碱对 ExPEC 外膜蛋白及调控基因表达的影响

外膜蛋白的完整性对细菌是非常重要的,也是非常必需的,这些外膜蛋白涉及细菌广泛的生理过程,如脂质代谢、细胞黏附、膜结构稳定性及应激适应等^[19-20],其中外膜蛋白 TolC 缺失后导致外膜结构完整性破坏,造成细菌对外界应激反应性改变^[17],外膜蛋白还可以改变细胞外膜的通透性而诱导细菌耐药性的形成^[18]。当亚抑菌浓度的血根碱、白屈菜红碱和原阿片碱存在时,对 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *ompC*、*ompX*、*ompF*、*tolC* 基因的表达具有较大的影响,表明外膜蛋白不同程度地参与了 ExPEC 对生物碱的应激反应过程。此外,本研究发现 T-A 系统 *hicAB* 缺失还可造成 ExPEC 对血根碱和氯霉素的敏感性增高。已有研究表明血根碱可以诱导耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株膜结合细胞壁自溶酶的释放,导致细菌的溶解,并且血根碱还可以改变细胞膜的形态结构^[8],并且细菌在外界环境刺激下,一些外膜蛋白通过调整自身表达(如 OmpC 和 OmpF 等)维持细胞渗透压平衡,控制小分子物质或分泌蛋白的扩散,其与细菌耐药性相关^[21-22]。当革兰氏阴性菌接触抗生素后,细菌可以通过改变外膜蛋白的组成或其表达量(如 OmpF 和 OmpC)降低外膜通透性,使细菌产生获得性耐药性^[23]。过量表达 OmpX 可降

低 OmpC 和 OmpF 的表达量,从而降低细菌对 β -内酰胺类抗生素的敏感程度^[24]。因此, *hicAB* 的缺失导致对血根碱和氯霉素敏感性的增高或许与外膜蛋白表达水平的改变相关,并且外膜蛋白参与了 ExPEC 对亚抑菌浓度生物碱的应激反应,通过不同外膜蛋白表达水平的改变以适应生物碱的应激反应。由于不同生物碱对不同外膜蛋白表达的影响不同,当外排泵蛋白 TolC 缺失时,血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱可以不同程度地促进 *ompX* 和 *ompC* 基因的表达,其可能机制是尽可能维持细菌胞内环境平衡,或者由于 TolC 外排泵蛋白的缺失而增加 *ompX* 和 *ompC* 基因表达水平,促进细菌对生物碱分子向外排出的通透性。RpoS 在细菌应对高渗透压、高温、低 pH、氧化、饥饿和抗生素压力等应激环境下的生理活动中发挥着决定性的作用^[25],并且 MarR 家族也是细菌在发挥抗生素抗性中最重要的调控子^[26],而本研究结果显示,血根碱对 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *marR* 和 *rpoS* 基因的表达水平具有显著的升高作用,白屈菜红碱可以显著促进 *marR* 基因的表达水平,并且在 $\Delta tolC$ 菌株中血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱可以不同程度地促进 *rpoS* 基因的表达水平,因此,对 *marR* 和 *rpoS* 基因表达的影响表明外膜完整性与否对不同亚抑菌浓度生物碱的应答或应激反应机制存在不同,其表达的改变是对生物碱应激的适应性反应。

3.2 亚抑菌浓度博落回生物碱对 ExPEC II 型 T-A 系统表达的影响

细菌和古细菌中普遍存在着 T-A 系统,主要维持细菌生理功能的发挥,II 型 T-A 系统是目前研究较多的一类,其中毒素和抗毒素都是蛋白质,包括 MazE-MazF、RelE-RelB、YefM-YoeB、MqsR-MqsA 和 ShpA-ShpB 等,毒素通常抑制细菌生长,而抗毒素则中和毒素。本研

究在亚抑菌浓度的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在下比较了 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *yafON*、*hicAB* 和 *prlF-yhaV* 这 3 个 II 型毒素-抗毒素基因的表达水平,结果发现在 1/2 MIC 的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在下,可以不同程度地促进 WT 和 $\Delta tolC$ 菌株的 *prlF* 基因表达,并且在 WT 菌株存在血根碱的情况下, *prlF* 基因表达量略有增加外, *yhaV* 基因的表达量显著降低,这或许是由于细菌为了应对亚抑菌浓度生物碱的应激反应而促使细菌生长出现抑制,从而避免对细菌造成损伤。然而,在白屈菜红碱存在时 WT 菌株的 *yafO* 和 *yafN* 基因水平表达显著上升,当原阿片碱存在时显著降低了 WT 菌株的 *yafN* 基因表达;而在 $\Delta tolC$ 菌株中,当存在原阿片碱时 *yafN* 基因的表达水平明显增加;在 1/2 MIC 的血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱存在时可以不同程度地降低 WT 菌株的 *hicA* 和 *hicB* 基因表达,但促进 $\Delta tolC$ 菌株中 *hicA* 和 *hicB* 基因的表达。已有报道在大肠杆菌 K-12 菌株中, HicA (58 个 aa) 的表达引起 *ompA* 等外膜蛋白基因 mRNA 在特定位点的断裂,同时造成细菌蛋白翻译速度急剧下降,从而引起细菌生长停滞,而 *hicB* 的表达可以中和 HicA 的毒素作用发挥抗毒素功能,使细菌复苏生长^[27]。类鼻疽杆菌 HicA 毒素超表达可以引起细菌生长停滞,并且增加对环丙沙星和头孢他啶耐受性的持留细菌数量,缺失 *hicAB* 基因的类鼻疽杆菌显著降低对环丙沙星耐受的持留细菌的发生率^[28]。因此本研究结果提示,不同生物碱对不同 T-A 系统表达的影响不同,并且细菌外膜完整性在 T-A 系统应对生物碱的反应过程中具有重要的作用,当细菌外膜完整时,生物碱促使毒素基因表达抑制细菌生长;而当外膜完整性破坏(例如 TolC 缺失)时,生物碱可促使细菌抗毒素基因表达水平升高。此外, *hicAB* 和 *prlF-yhaV* 缺失对

氯霉素、血根碱敏感性增加的原因可能与抗毒素 *hicB* 基因的表达量增加相关, 从而导致细菌对氯霉素、血根碱的耐受性降低, 并且降低了对氯霉素和血根碱耐受的持留细菌数量。

本研究结果表明, T-A 系统和外膜蛋白参与了 ExPEC 对生物碱的应激反应过程, ExPEC 在参与不同博落回生物碱的应激过程中, 对主要外膜蛋白和 II 型 T-A 系统表达的影响也不同; 并且 TolC 外膜完整性在 ExPEC 参与对生物碱的应激中具有重要的作用, 对 T-A 系统的表达具有重要的影响作用。为了进一步明确生物碱对 T-A 系统和外膜蛋白的影响, 通过蛋白质水平和全基因转录组两个层次对其进行深入了解和研究, 对于认识其药理作用具有十分重要的理论意义。

REFERENCES

- [1] 侯博, 曾建国. 血根碱的生物学活性及博落回提取物在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报, 2018, 30(2): 413-420
Hou B, Zeng JG. Biological activities of sanguinarine and application of *Macleaya cordata* extract in animal production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(2): 413-420 (in Chinese)
- [2] Gudev D, Ralcheva SP, Moneva P, Bonovska M, Valchev G, Valcheva A. Effect of supplemental Sangrovit on some biochemical indices and leukocytes phagocytic activity in growing pigs[J]. Archiva Zootechnica, 2004(7): 123-134
- [3] Jesionek W, Fornal E, Majer-Dziedzic B, Móricz ÁM, Nowicky W, Choma IM. Investigation of the composition and antibacterial activity of Ukrain™ drug using liquid chromatography techniques[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1429: 340-347
- [4] Dzink JL, Socransky SS. Comparative *in vitro* activity of sanguinarine against oral microbial isolates[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1985, 27(4): 663-665
- [5] Hamoud R, Reichling J, Wink M. Synergistic antimicrobial activity of combinations of sanguinarine and EDTA with vancomycin against multidrug resistant bacteria[J]. Drug Metabolism Letters, 2014, 8(2): 119-128
- [6] Hamoud R, Reichling J, Wink M. Synergistic antibacterial activity of the combination of the alkaloid sanguinarine with EDTA and the antibiotic streptomycin against multidrug resistant bacteria[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2015, 67(2): 264-273
- [7] Obiang-Obounou BW, Kang OH, Choi JG, Keum JH, Kim SB, Mun SH, Shin DW, Park CB, Kim YG, Han SH, et al. *In vitro* potentiation of ampicillin, oxacillin, norfloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin by sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(8): 869-874
- [8] Obiang-Obounou BW, Kang OH, Choi JG, Keum JH, Kim SB, Mun SH, Shin DW, Kim KW, Park CB, Kim YG, et al. The mechanism of action of sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2011, 36(3): 277-283
- [9] Yang XJ, Miao F, Yao Y, Cao FJ, Yang R, Ma YN, Qin BF, Zhou L. *In vitro* antifungal activity of sanguinarine and chelerythrine derivatives against phytopathogenic fungi[J]. Molecules, 2012, 17(11): 13026-13035
- [10] Tan C, Tang XB, Zhang X, Ding Y, Zhao ZQ, Wu B, Cai XW, Liu ZF, He QG, Chen HC. Serotypes and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from diseased pigs in China[J]. The Veterinary Journal, 2012, 192(3): 483-488
- [11] Tang XB, Tan C, Zhang X, Zhao ZQ, Xia X, Wu B, Guo AZ, Zhou R, Chen HC. Antimicrobial resistances of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from swine in China[J]. Microbial Pathogenesis, 2011, 50(5): 207-212
- [12] Xia XD, Meng JH, Zhao SH, Bodeis-Jones S, Gaines SA, Ayers SL, McDermott PF. Identification and antimicrobial resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail meats[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(1): 38-44
- [13] Lyhs U, Ikonen I, Pohjanvirta T, Raninen K, Perko-Mäkelä P, Pelkonen S. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in poultry meat products on the Finnish retail market[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2012, 54: 64
- [14] Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, Kuskowski MA, Sherwood JS, Barnes HJ, DebRoy C, Wannemuehler YM, Obata-Yasuoka M, Spanjaard L, et al. Associations

- between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2012, 9(1): 37-46
- [15] Lee JH, Kim YG, Cho MH, Wood TK, Lee J. Transcriptomic analysis for genetic mechanisms of the factors related to biofilm formation in *Escherichia coli* O157:H7[J]. Current Microbiology, 2011, 62(4): 1321-1330
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015
- [17] Hou B, Meng XR, Zhang LY, Tan C, Jin H, Zhou R, Gao JF, Wu B, Li ZL, Liu M, et al. TolC promotes ExPEC biofilm formation and curli production in response to medium osmolarity[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 574274
- [18] 许姝, 张东, 魏星, 武琥琮, 刘家奇, 王亨, 朱国强. 肠道外致病性大肠杆菌外膜蛋白研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(5): 537-541
Xu S, Zhang D, Wei X, Wu HZ, Liu JQ, Wang H, Zhu GQ. Research advances in outer membrane proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(5): 537-541 (in Chinese)
- [19] Lin J, Huang SX, Zhang QJ. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches[J]. Microbes and Infection, 2002, 4(3): 325-331
- [20] Hong H, Patel DR, Tamm LK, Van Den Berg B. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(11): 7568-7577
- [21] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 593-656
- [22] Dupont M, James CE, Chevalier J, Pagès JM. An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(9): 3190-3198
- [23] Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(12): 893-903
- [24] Dupont M, Dé E, Chollet R, Chevalier J, Pagès JM. *Enterobacter aerogenes* OmpX, a cation-selective channel mar- and osmo-regulated[J]. FEBS Letters, 2004, 569(1/2/3): 27-30
- [25] Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*[J]. Annual Review of Microbiology, 2011, 65: 189-213
- [26] Beggs GA, Brennan RG, Arshad M. MarR family proteins are important regulators of clinically relevant antibiotic resistance[J]. Protein Science, 2020, 29(3): 647-653
- [27] Jørgensen MG, Pandey DP, Jaskolska M, Gerdes K. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and Archaea[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(4): 1191-1199
- [28] Butt A, Higman VA, Williams C, Crump MP, Hemsley CM, Harmer N, Titball RW. The HicA toxin from *Burkholderia pseudomallei* has a role in persister cell formation[J]. The Biochemical Journal, 2014, 459(2): 333-344