

# 应用差异蛋白质组学的方法分析左氧氟沙星 对肺炎链球菌 *D39* 的作用

孙正华 阳小燕 贺翔 孙雪松\*

(暨南大学生命与健康工程研究院 广东 广州 510632)

**摘要:** 应用差异蛋白质组学的方法, 对肺炎链球菌 *D39* 在左氧氟沙星作用下蛋白质表达水平的变化进行了研究, 利用质谱技术共鉴定到 23 个差异蛋白质。这些蛋白质主要参与 DNA 的复制、转录以及蛋白质的翻译过程, 为深入了解抗生素的作用机理以及细菌的耐药机制提供重要理论基础。

**关键词:** 差异蛋白质组学, 肺炎链球菌, 左氧氟沙星

## The effect of Levofloxacin on *Streptococcus pneumoniae* *D39* revealed by comparative proteomics

SUN Zheng-Hua YANG Xiao-Yan HE Xiang SUN Xue-Song\*

(Institute of Life and Health Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

**Abstract:** The protein expression levels of *Streptococcus pneumoniae* *D39* upon Levofloxacin treatment were studied using comparative proteomics method. In total, 23 differentially expressed proteins were identified via mass spectrometry. These proteins mainly involved in the DNA replication, transcription and protein translation. This study provides important information to the molecular mechanism of antibiotics actions and the drug resistance of bacteria.

**Keywords:** Comparative proteomics, *Streptococcus pneumoniae*, Levofloxacin

肺炎链球菌是引起中耳炎、鼻窦炎、细菌性脑膜炎、败血症和肺炎等一系列人类疾病的最重要的病原菌。肺炎链球菌首先无症状地共生在 60% 的健康儿童和 30% 的健康成人的咽喉部, 进而感染宿主的肺, 血管和脑, 在全球范围内引起相当高的发病率

和死亡率<sup>[1-3]</sup>。

目前用于治疗由肺炎链球菌引起的疾病的药物主要为抗生素类药物。青霉素由于其长期使用而产生的日益严重的抗药性而逐渐被抗药性较小的氟喹诺酮类药物所代替<sup>[4-5]</sup>。左氧氟沙星就是目前应用最

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000373); 广东省自然科学基金项目(No. 10451063201005247); 暨南大学科研培育与创新基金项目(No. 21609301)

\* 通讯作者: Tel: 86-20-85226165; E-mail: tsunxs@jnu.edu.cn

收稿日期: 2010-12-22; 接受日期: 2011-03-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

广的该类药物之一。左氧氟沙星是氧氟沙星的左旋体,具有广谱抗菌作用,抗菌作用强,对金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌等革兰阳性菌和肺炎支原体、肺炎衣原体等都有较强的抗菌作用<sup>[6-7]</sup>。

差异蛋白质组学通常以成对的样本为研究对象,分析比较样本在病理或给药条件下特定蛋白质的表达变化,进而阐明疾病发病机理和药物作用机制,发现一些潜在的生物标志物和药物作用靶标。本文应用体外抑菌试验,采用差异蛋白质组学的方法和技术,研究了肺炎链球菌在左氧氟沙星作用下的蛋白质表达变化,以期更好的阐明氟喹诺酮类抗生素的抑菌机理以及肺炎链球菌的耐药机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**肺炎链球菌 D39。

**1.1.2 抗生素:**左氧氟沙星,购自广州市华侨医院。

**1.1.3 培养基:**Todd-Hewitt Broth 培养基,含 0.5% 的酵母提取物(均由 OXIOD 公司生产)。

**1.1.4 试剂:**尿素、硫脲、CHAPS、DTT、IAA、PMSF、过硫酸铵、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、铁氰化钾均购自 Sigma 公司;固相 pH 梯度干胶条(pH 4.0-7.0, 13 cm)、2D Clean-Up Kit、IPG 缓冲液(pH 4.0-7.0)购自 GE 公司;丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、SDS、Tris 购自广州展晨生物公司;胰蛋白酶购自 Promega 公司;其他试剂均为国产分析纯。

**1.1.5 仪器:**IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT 垂直电泳槽、Image-Scanner 扫描仪产自美国 GE 公司;小型高速冷冻离心机产自德国 Eppendorf 公司;CO<sub>2</sub> 细胞培养箱产自上海一恒科技有限公司;MilliPore 纯水系统产自美国 MilliPore 公司;4 800 plus MALDI-TOF-TOF Analyzer 串联飞行时间质谱仪产自美国 AB 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 最低抑菌浓度(MIC)测定:**采用试管二倍稀释法进行测定<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 生长曲线的测定:**从 0-9 h,每间隔 1 h 对培养的细菌取样测定 600 nm 波长的 OD 值,然后根据

各时间点和对应的 OD 值绘制生长曲线。

**1.2.3 细菌培养与收集:**实验设置 3 组平行实验,每组又分为加药组和空白组,分别加入 Sub-MIC 的左氧氟沙星和等体积的培养基,于 37 °C、5%浓度的 CO<sub>2</sub> 环境中进行培养。当细菌的生长达到对数期中期时( $OD_{600}=0.7$ )开始收菌,在 4 °C 以 5 000×g 离心 10 min,去掉培养基,然后用在冰上预冷的无菌 PBS 对离心沉淀下来的菌体进行洗涤,4 °C、5 000 g×10 min 离心重复 3 次。最后将所得菌体转移至干净的离心管中,-80 °C 冻存。

**1.2.4 细菌蛋白的提取与纯化:**采用反复冻融和超声裂解法提取细菌蛋白<sup>[9]</sup>,裂解液配方为:15 mmol/L Tris-HCl、7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% (M/V) CHAPS,使用前现加 2% (V/V) IPG 缓冲液(pH 4.0-7.0)、1% (M/V) DTT 和 1% (M/V) PMSF 混合物。首先将所得菌体加入适量裂解液,充分涡旋混匀,然后置于液氮中速冻 10 min,随后于 37 °C 解冻,如此反复冻融 3 次。使用超声仪(30% 功率)以 5 s 脉冲超声法超声 15 min,充分裂解蛋白。所得溶液置冰上充分冷却,加入 1% (V/V) 的核酸酶混合物,冰上静置 30 min。低温离心 10 min (4 °C, 12 000 r/min),取上清。以 Bradford 法测定蛋白浓度,分装后于-80 °C 保存备用。

蛋白质的纯化采用 2D Clean-Up Kit 试剂盒,并按说明书进行操作。

**1.2.5 双向电泳(2DE):**参照文献[10]方法进行,上样量为 100 μg。

**1.2.6 图像分析:**3 次重复的 2D 胶通过 Imagemaster 6.0 软件进行分析,对 2 倍以上差异的蛋白质点进行 *t*-test 统计分析,只有  $P<0.01$  且差异表达在 2 倍以上的蛋白质点才进行进一步的质谱鉴定。

**1.2.7 质谱鉴定:**对通过图像分析选取的差异蛋白质点进行胶内酶解。完全冻干的样品用 1.5 μL 含 0.1% TFA 的 30% 乙腈充分溶解,取 0.8 μL 样品点于 384 孔不锈钢点样板上,然后取 0.4 μL 5 g/L 的 CHCA 基质溶液于样品点上,自然风干以后进行质谱鉴定。质谱鉴定在美国 AB 公司 4800 plus MALDI-TOF-TOF Analyzer 串联飞行时间质谱仪上进行,采用外标校正,正离子反射模式检测。每个样

品首先进行一次一级质谱分析,再选择一级质谱中信噪比大于或等于 50、信号由强到弱的 7 个前体离子进行二级质谱分析。获得的二级质谱数据通过 GPS Explore (V3.6, 美国 AB 公司)进行分析整合,然后使用 MASCOT (V2.1, Matrix Science, London, U.K.) 搜库软件对本地数据库中的肺炎链球菌 *D39* 进行检索,鉴定蛋白质。搜库参数设置如下:检索数据库为 *Streptococcus pneumoniae D39*, 切割的酶为 Trypsin, 允许最大的胰酶漏切位点数为 2, 可变修饰为半胱氨酸乙酰胺化和甲硫氨酸氧化, 无固定修饰, 允许母离子质量误差为 50 ppm, 片段离子质量误差为 0.2 D。

## 2 结果与分析

### 2.1 最低抑菌浓度(MIC)测定结果

试管二倍稀释法测定结果表明左氧氟沙星对肺炎链球菌 *D39* 的最低抑菌浓度(MIC)为 2 mg/L。

### 2.2 生长曲线测定结果

生长曲线测定结果如图 1 所示,从图中我们可以看到,加入 1  $\mu\text{g/mL}$  (Sub-MIC)左氧氟沙星后,肺炎链球菌 *D39* 的生长受到了明显的抑制,整个生长曲线向后延迟了约 2 h。

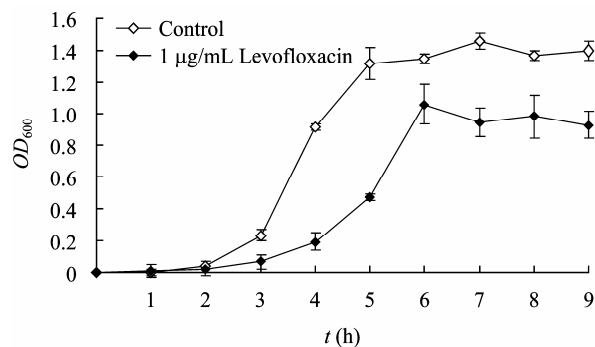


图 1 生长曲线图

Fig. 1 Growth curve of *Streptococcus pneumoniae D39*

### 2.3 双向电泳结果

如图 2 所示,实验获得了质量较高的双向凝胶电泳银染图谱。3 次重复实验结果采用 Imagemaster 6.0 软件进行分析,共得到  $786 \pm 47$  个清晰蛋白质点,比较了在对照组和加入 1  $\mu\text{g/mL}$  左氧氟沙星的作用条件下肺炎链球菌 *D39* 蛋白质表达的差异,并从中筛选到 36 个  $P < 0.01$ 、表达差异在 2 倍以上的蛋白质点进行质谱鉴定。图 2 中 A、B 分别代表了对照组和给药组肺炎链球菌 *D39* 蛋白质表达情况,图中箭头标示的是质谱鉴定到的 23 个差异蛋白质点的位置和编号。

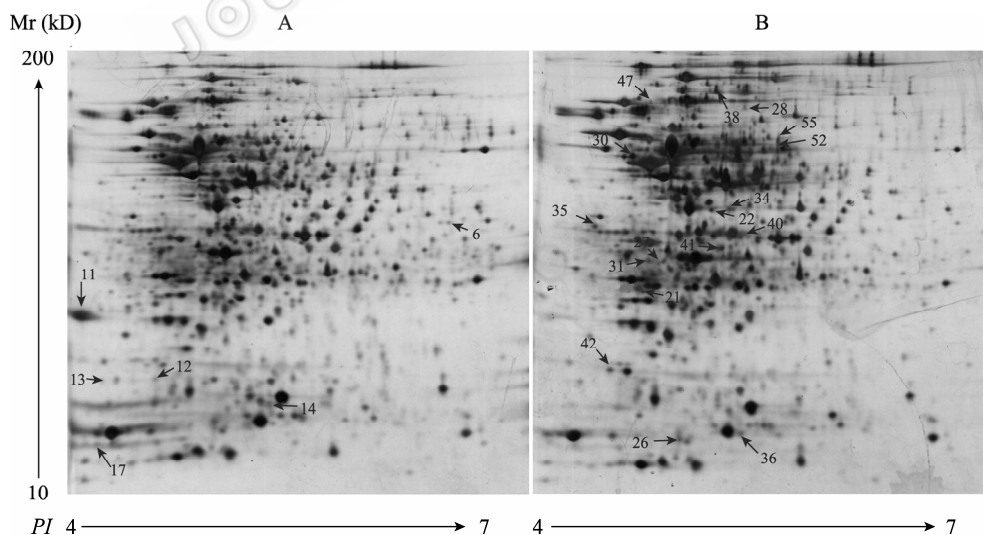


图 2 肺炎链球菌的双向电泳图

Fig. 2 The 2-DE map of *Streptococcus pneumoniae D39*

注: A、B 分别代表未处理和左氧氟沙星处理组;箭头标示差异蛋白质点的位置。

Note: A: Untreated with Levofloxacin; B: Treated with Levofloxacin. The arrows in the maps mark the positions of 23 proteins differentially expressed.

## 2.4 质谱鉴定结果

对筛选到的 36 个差异蛋白质点进行了质谱鉴定, 获得的质谱数据通过对本地数据库中肺炎链球菌 D39 的检索, 获得相应的 gi 号, 然后根据 gi 号到 NCBI 数据库中查询相应蛋白质的功能, 去冗余之后, 共鉴定到 23 个蛋白。根据蛋白质的分子功能, 将所鉴定到的 23 个蛋白质分成如下几类(表 1), 主要包括: (1) 核糖体蛋白。50S 核糖体蛋白 L4, L15; (2) 跨膜转运蛋白。MATE 外排家族蛋白(MATE efflux family protein); (3) 转录调控因子。氧化还原剂敏感的转录抑制因子 Rex (Redox-sensing transcriptional repressor Rex), 分解代谢产物控制蛋白 A (Catabolite control protein A); (4) 翻译调控因子。肽链释放因子 3 (Peptide chain release factor 3), 延伸因子 G (Elongation factor G); (5) 合成和水解酶类。半胱氨酰-tRNA 合成酶(CysteinyI-tRNA synthetase), 甲硫氨酰 tRNA 合成酶(Methionyl-tRNA synthetase),

磷酸丙酮酸水合酶(Phosphopyruvate hydratase), Cof 家族蛋白(Cof family protein); (6) 氧化还原酶。核糖核苷酸二磷酸还原酶  $\beta$  亚基(Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta), 吡啶核苷酸二硫化物氧化还原酶(Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase); (7) 异构酶。DNA 拓扑异构酶 IV A 亚基(DNA topoisomerase IV subunit A); (8) 其它。磷酸硫胺素焦磷酸化酶(Thiamine-phosphate pyrophosphorylase), 鸟苷酸激酶(Guanylate kinase), 半乳糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶(Galactose-1-phosphate uridylyltransferase)。其中一些蛋白与 DNA 的复制、转录以及蛋白质的翻译相关。同时, 为了确认质谱鉴定结果的可靠性, 我们对肺炎链球菌 D39 的反库也进行了检索, 结果显示没有鉴定到任何蛋白, FDR (False discovery rate)为 0。图 3 和图 4 分别为鉴定 50S 核糖体蛋白 L4 和磷酸硫胺素焦磷酸化酶(Thiamine-phosphate pyrophosphorylase)的质谱图。

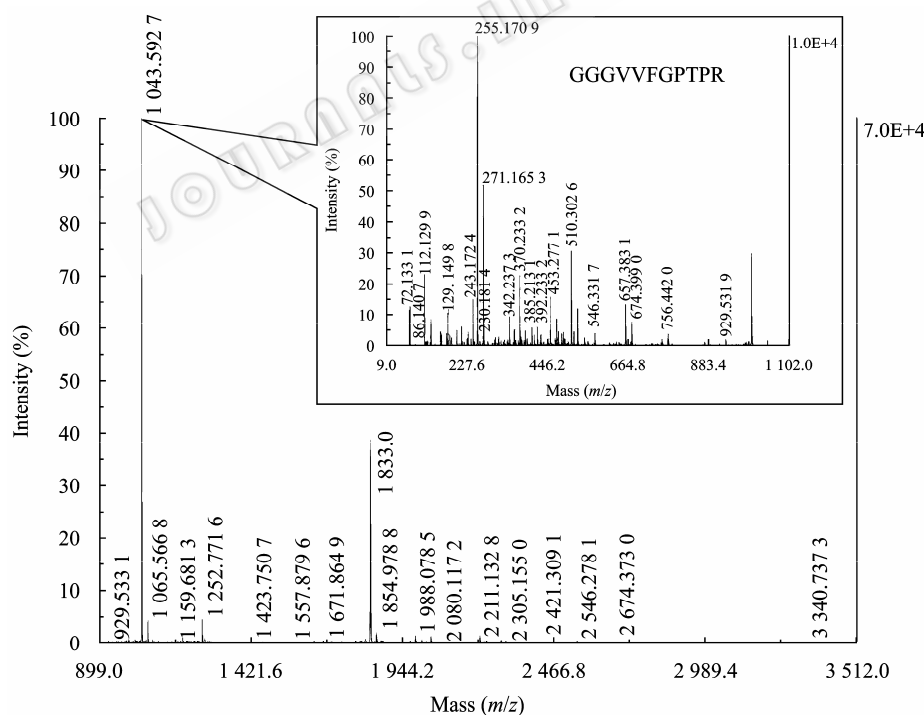


图 3 鉴定 50S 核糖体蛋白 L4 的 PMF 和 MS/MS 图  
Fig. 3 The PMF and MS/MS spectra of 50S ribosomal protein L4

表 1 左氧氟沙星作用下肺炎链球菌差异蛋白质鉴定结果  
Table 1 Summary of differentially expressed proteins of *S. pneumoniae* D39 upon Levofloxacin treatment

Spot No.	Protein name	MW(kDa)/pI	Score/CI%	Vol% (C)/Vol% (T) ( $\bar{x} \pm s$ )	Accession No.	Function
11	50S ribosomal protein L4	22.096/9.99	84/100	1.220 $\pm$ 0.153/0	gi 116515366	Structural constituent of ribosome
12	50S ribosomal protein L15	15.436/10.28	39/99.967	0.059 $\pm$ 0.010/0	gi 116515385	Structural constituent of ribosome
31	MATE efflux family protein	50.028/9.48	18/95.938	0.049 $\pm$ 0.005/0.114 $\pm$ 0.027	gi 116517066	Drug transmembrane transporter activity
17	Redox-sensing transcriptional repressor Rex	24.180/9.10	18/95.914	0.170 $\pm$ 0.035/0	gi 116515408	Transcription repressor activity
40	Catabolite control protein A	37.020/5.47	22/98.031	0.063 $\pm$ 0.009/0.166 $\pm$ 0.024	gi 116517109	Transcription regulator activity
28	Peptide chain release factor 3	58.445/5.09	26/99.258	0.033 $\pm$ 0.011/0.074 $\pm$ 0.010	gi 116516944	Translation release factor activity
41	Elongation factor G	76.783/4.86	73/100	0.032 $\pm$ 0.012/0.088 $\pm$ 0.023	gi 116516752	Translation elongation factor activity
21	CysteinyI-tRNA synthetase	51.049/5.13	19/95.41	0.040 $\pm$ 0.007/0.082 $\pm$ 0.005	gi 116517189	Cysteine-tRNA ligase activity
38	Methionyl-tRNA synthetase	75.603/4.87	28/99.603	0.081 $\pm$ 0.013/0.210 $\pm$ 0.053	gi 116516229	Methionine-tRNA ligase activity
27	Phosphopyruvate hydratase	47.047/4.70	107/100	0.027 $\pm$ 0.006/0.059 $\pm$ 0.009	gi 116516768	phosphopyruvate hydratase activity
55	Cof family protein	51.808/6.45	18/95.147	0.036 $\pm$ 0.013/0.168 $\pm$ 0.024	gi 116516548	Hydrolase activity
14	DNA topoisomerase IV subunit A	93.389/5.50	18/95.841	0.150 $\pm$ 0.017/0	gi 116515631	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) activity
35	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	36.939/4.42	39/99.952	0.048 $\pm$ 0.007/0.117 $\pm$ 0.016	gi 116517162	Ribonucleoside-diphosphate reductase activity
42	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	47.143/4.83	19/97.042	0.045 $\pm$ 0.015/0.121 $\pm$ 0.017	gi 116515420	Oxidoreductase activity
52	Thiamine-phosphate pyrophosphorylase	23.319/4.82	19/95.885	0.049 $\pm$ 0.011/0.133 $\pm$ 0.032	gi 116516536	Thiamin-phosphate diphosphorylase activity
26	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	56.217/5.10	19/96.754	0.081 $\pm$ 0.018/0.169 $\pm$ 0.021	gi 116517165	Transferase activity
13	Guanylate kinase	23.661/4.74	52/98.764	0.043 $\pm$ 0.006/0	gi 116516658	Guanylate kinase activity
47	HIT family protein	19.607/6.46	56/99.461	0.020 $\pm$ 0.006/0.064 $\pm$ 0.011	gi 116515557	Catalytic activity
6	Competence protein CglD	14.676/9.60	20/97.335	0.035 $\pm$ 0.013/0	gi 116516816	Uncharacterised
30	Hypothetical protein SPD_1119	13.702/9.75	18/95.224	0.101 $\pm$ 0.026/0.220 $\pm$ 0.019	gi 116515673	Uncharacterised
34	Hypothetical protein SPD_0091	37.882/5.10	38/99.952	0.044 $\pm$ 0.012/0.108 $\pm$ 0.031	gi 116517133	Uncharacterised
36	Hypothetical protein SPD_0119	41.348/9.01	17/95.32	0.059 $\pm$ 0.021/0.146 $\pm$ 0.023	gi 116515480	Uncharacterised
22	Hypothetical protein SPD_1235	10.301/7.85	18/95.059	0.067 $\pm$ 0.016/0.138 $\pm$ 0.020	gi 116516476	Uncharacterised

Note: C, T represent the control and treatment samples, respectively.

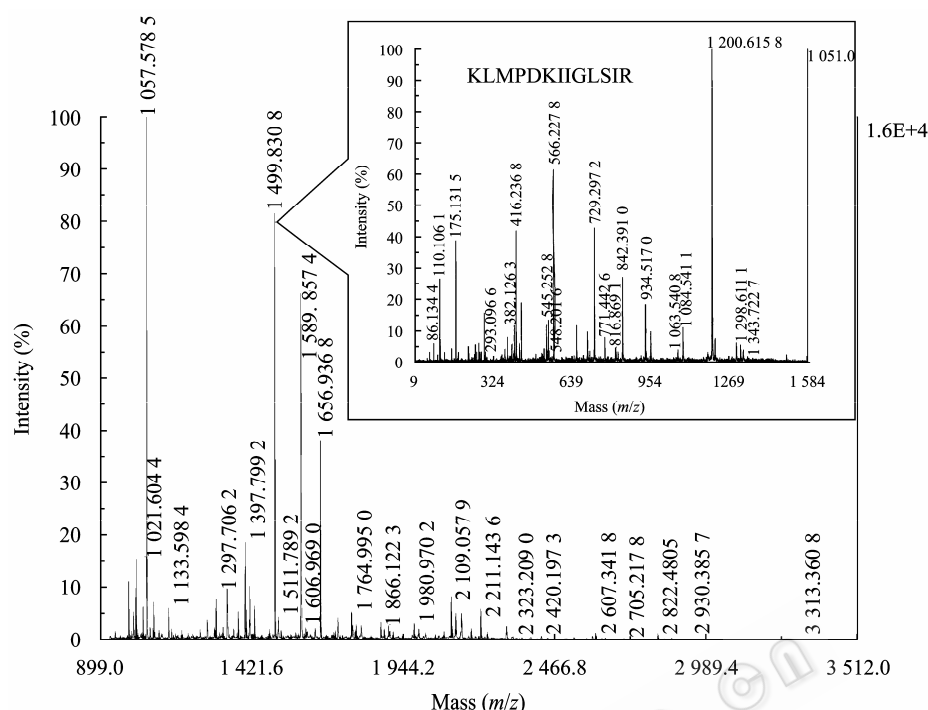


图4 鉴定磷酸硫胺素焦磷酸化酶的 PMF 和 MSMS 图

Fig. 4 The PMF and MS/MS spectra of thiamine-phosphate pyrophosphorylase

### 3 讨论

差异蛋白质组学主要研究生物样本在不同处理条件下特定蛋白质在表达和修饰等方面的变化。由于蛋白质被认为是生命功能的最后执行者,因此,差异蛋白质组学的实验结果具有直观明了的特点,有利于阐明疾病复杂的发病机理和药物的作用机制,在疾病和药物研究相关领域应用广泛。本文应用差异蛋白质组学的方法,对肺炎链球菌 D39 在左氧氟沙星作用下蛋白质表达水平的变化进行了研究。实验共鉴定到 23 个差异蛋白质,主要包括核糖体蛋白、转运蛋白、转录翻译调控因子以及一些酶类,这些蛋白主要参与 DNA 的复制、转录以及蛋白质的翻译过程,并可能与肺炎链球菌对喹诺酮类药物的耐药性相关。

左氧氟沙星是一种新型的氟喹诺酮类抑菌药物,对革兰氏阳性菌和阴性菌都有较强的抑菌作用,其作用靶标分别是 DNA 螺旋酶和 DNA 拓扑异构酶 IV<sup>[11-14]</sup>。氟喹诺酮类药物对革兰氏阳性菌的抗菌

机制是抑制 DNA 拓扑异构酶 IV 的活性,使双链 DNA 分子不能解除连接,从而抑制 DNA 的复制和转录,达到抗菌的目的<sup>[15-18]</sup>。在研究中我们发现,在左氧氟沙星处理后,肺炎链球菌 D39 中 DNA 拓扑异构酶 IV 有显著低表达,一方面,同其它喹诺酮类药物一样,左氧氟沙星直接作用于 DNA 拓扑异构酶 IV,抑制其活性,从而阻碍 DNA 的复制与转录;另一方面,左氧氟沙星很可能还作用于 DNA 拓扑异构酶 IV 上游的某些调控区域,抑制了 DNA 拓扑异构酶 IV 的表达,间接的阻碍了 DNA 的复制与转录,最终达到抑菌的目的。至于细菌是通过一种什么样的方法和途径对 DNA 拓扑异构酶 IV 的表达进行调节还有待进一步的研究。

细菌的耐药性主要通过以下 3 个途径来实现:修饰作用靶点、抑制药物活性和降低胞内药物浓度<sup>[19]</sup>。其中降低胞内药物浓度是细菌普遍采用的一种耐药机制,它主要通过一些由跨膜转运蛋白组成的泵出系统来完成的。根据结构和功能的不同,可以将细菌的泵出系统分为 MFS、SMR、MATE、ABC

和 RND 等 5 大类型<sup>[20-21]</sup>。有研究表明, MATE 泵出系统能特异识别一些药物和毒性化合物, 是细菌对喹诺酮类药物产生耐药性的主要机制之一<sup>[22-23]</sup>。在鉴定到的蛋白中, 我们发现 MATE 外排家族蛋白显著高表达, 这说明肺炎链球菌体内的 MATE 泵出系统对左氧氟沙星具有一定的识别能力, 这种识别会增加 MATE 转运蛋白的表达, 增强对药物的泵出, 进而促使细菌对药物产生耐药性。

## 参 考 文 献

- [1] Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, et al. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen disease epidemiology treatment, and prevention[J]. Pharmacotherapy, 2005, 25(9): 1193-1212.
- [2] Tuomanen EI, Masure HR. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection[J]. Microb Drug Resist, 1997, 3(4): 297-308.
- [3] Bartlett JG, Mundy LM. Community-acquired pneumonia[J]. N Engl J Med, 1995, 333(24): 1618-1624.
- [4] Chiou CC, Liu YC, Huang TS, et al. Extremely high prevalence of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among children in Kaohsiung, Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(7): 1933-1937.
- [5] Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(S1): S9-S15.
- [6] Klugman KP, Gootz TD. *In vitro* and *in vivo* activity of trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae*[J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 39(S2): 51-55.
- [7] Davis R, Bryson HM. Levofloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy[J]. Drugs, 1994, 47(4): 677-700.
- [8] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 48(S1): 5-16.
- [9] 贺翔, 银兴峰, 张留辉, 等. 利用固定化金属亲和层析和质谱技术鉴定化脓性链球菌铜结合蛋白[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1656-1662.
- [10] 张留辉, 阳小燕, 贺翔, 等. 肺炎链球菌蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. 江西农业学报, 2010, 22(3): 17-21.
- [11] Khodursky AB, Zechiedrich EL, Cozzarelli NR. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(25): 11801-11805.
- [12] Pan XS, Fisher LM. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparflaxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(2): 471-474.
- [13] Pan XS, Fisher LM. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(11): 2810-2816.
- [14] Fukuda H, Hiramatsu K. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(2): 410-412.
- [15] Roca J. The mechanisms of DNA topoisomerases[J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20(4): 156-160.
- [16] Pan XS, Fisher LM. *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topo-isomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(5): 1129-1136.
- [17] Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials[J]. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27668-27677.
- [18] Shea ME, Hiasa H. Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase-IV-quinolone-DNA ternary complexes[J]. J Biol Chem, 1999, 274(32): 22747-22754.
- [19] Schmitz FJ, Higgins PG, Mayer S, et al. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21(9): 647-659.
- [20] Zeller V, Janoir C, Kitzis MD, et al. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(9): 1973-1978.
- [21] van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60: 457-470.
- [22] Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance[J]. Drug Resist Updates, 1999, 2(1): 38-55.
- [23] Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug efflux transporters in the MATE family[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794(5): 763-768.