

吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的转录组影响分析

李欣奕, 塔玛莎·库尔曼江, 王小静, 胡开桂, 王昊, 张颖, 曹文芝*, 李金玉*

新疆师范大学生命科学学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054

李欣奕, 塔玛莎·库尔曼江, 王小静, 胡开桂, 王昊, 张颖, 曹文芝, 李金玉. 吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的转录组影响分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2648-2665.

LI Xinyi, Tamasha Kurmanjiang, WANG Xiaojing, HU Kaigui, WANG Hao, ZHANG Ying, CAO Wenzhi, LI Jinyu. Pyrazolone-copper complex P-FAH-Cu-phen affects transcriptome of *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2648-2665.

摘要:【背景】金黄色葡萄球菌是目前食品和临床引起感染的重要病原菌, 迫切需要开发新型抗菌药物。【目的】分析吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的转录组影响和主要代谢信号通路。【方法】采用液体稀释法测定 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。将终浓度 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的配合物分别作用于对数生长期的金黄色葡萄球菌 30 min 和 2 h, 进行转录组测序及分析。【结果】P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 分别为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与空白对照相比, 配合物处理细菌 30 min 后, 其差异基因共有 356 个, 其中上调表达 180 个、下调表达 176 个; 配合物处理细菌 2 h 后, 其差异基因共有 23 个, 其中上调表达 3 个、下调表达 20 个。差异基因功能主要富集于膜的组成部分、细胞质、质膜、ATP 结合、发病机制、金属离子结合、组氨酸生物合成过程、DNA 结合、水解酶活性、跨膜转运蛋白活性、硝酸盐同化、硝酸盐代谢过程、硝酸还原酶复合物、硝酸还原酶活性等。差异基因涉及的信号通路主要有双组分系统、群体感应、氮代谢、三羧酸循环、氨基酸代谢等。【结论】影响细菌质膜组成、毒素生成、生物膜形成、细胞壁合成、能量代谢等可能是吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的主要抑菌作用。

资助项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01A119); 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室招标课题项目(XJDX1414-2018-02); 新疆维吾尔自治区“百名青年博士引进计划”天池博士(BS2019003); 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室项目(XJTSWZ-2021-02)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China (2021D01A119), the Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology of China (XJDX1414-2018-02), the Dr. Tianchi of the “Hundred Young Doctors Introduction Program” of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China (BS2019003), and the Xinjiang Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation of China (XJTSWZ-2021-02).

*Corresponding authors. E-mail: CAO Wenzhi, caowenzhi521888@163.com; LI Jinyu, lijinyu234@163.com

Received: 2022-09-20; Accepted: 2022-11-23; Published online: 2023-01-20

研究为揭示吡唑啉酮铜配合物抑制金黄色葡萄球菌分子机制提供了理论依据。

关键词: 吡唑啉酮铜配合物; 金黄色葡萄球菌; 转录组; 抑菌机制

Pyrazolone-copper complex P-FAH-Cu-phen affects transcriptome of *Staphylococcus aureus*

LI Xinyi, Tamasha Kurmanjiang, WANG Xiaojing, HU Kaigui, WANG Hao, ZHANG Ying, CAO Wenzhi*, LI Jinyu*

Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation in Xinjiang, School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

Abstract: **[Background]** *Staphylococcus aureus* is a major bacterial pathogen causing infections in food and human body, and there is an urgent need to develop new antibacterial agents. **[Objective]** To study the effects of the pyrazolone-copper complex P-FAH-Cu-phen on the transcriptome and main metabolic signaling pathways of *S. aureus*. **[Methods]** The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of P-FAH-Cu-phen on *S. aureus* were determined by liquid dilution method. The *S. aureus* in the logarithmic growth phase was treated with P-FAH-Cu-phen at the final concentration of 2 µg/mL for 30 min and 2 h, respectively, and then the transcriptome was sequenced and analyzed. **[Results]** The MIC and MBC of P-FAH-Cu-phen on *S. aureus* were 2 µg/mL and 4 µg/mL, respectively. Compared with the blank control, P-FAH-Cu-phen treatment for 30 min led to 356 differentially expressed genes (DEGs), including 180 up-regulated genes and 176 down-regulated genes. P-FAH-Cu-phen treatment for 2 h resulted in 23 DEGs, including 3 up-regulated genes and 20 down-regulated genes. The DEGs were mainly enriched in membrane components, cytoplasm, plasma membrane, ATP binding, pathogenesis, metal ion binding, histidine biosynthesis process, DNA binding, hydrolytic enzyme activity, transmembrane transporter activity, nitrate assimilation, nitrate metabolism process, nitrate reductase complex, nitrate reductase activity, etc. The signaling pathways involving the DEGs mainly included two-component system, quorum sensing, nitrogen metabolism, tricarboxylic acid cycle, amino acid metabolism and so on. **[Conclusion]** P-FAH-Cu-phen may inhibit *S. aureus* by affecting plasma membrane composition, toxin production, biofilm formation, cell wall synthesis, and energy metabolism. The study provides a theoretical basis for revealing the molecular mechanism of the inhibition on *S. aureus* by P-FAH-Cu-phen.

Keywords: P-FAH-Cu-phen; *Staphylococcus aureus*; transcriptome; antibacterial mechanism

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是目前食品和临床上引起感染的重要病原菌^[1], 由于其对多种抗生素产生了抗性^[2-3], 因此, 研究

新型的药物很有必要。在抗生素出现之前, 金属离子由于具有抗菌活性而广泛应用在医学上^[4-5]。提交到开放抗菌药物数据库(Community for

Open Antimicrobial Drug Discovery, CO-ADD)的所有 906 种金属化合物中,有 246 种对被测生物的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)小于或等于 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,其中 88 种活性金属化合物无细胞毒性或溶血活性^[6]。在众多金属配合物中,席夫碱 (Schiff base)类金属配合物因具有抗菌、抗肿瘤等突出的生物活性,近年来引起了学者广泛的关注。吡唑啉酮金属配合物就是一种具有潜力的新型席夫碱类抗菌药物^[7-9],在结构上含有 2 个 N 原子和 1 个酮基的内酰胺环^[10],不仅具有合成简便、结构稳定等特性,而且能与多种金属离子配位,形成结构复杂且生物活性更强的配合物。

近年来研究表明,金属配合物主要通过抑制细胞壁合成、核糖体功能、核酸合成、叶酸代谢、细胞膜功能发挥抗菌机制^[11]。转录组是细胞或组织在特定状态下的所有转录本的集合,既能够获得基因的构成、功能信息,又能够反映在特殊环境下的基因表达调控机制。转录组学方法可以揭示所涉及的生物学途径,从而确定新药的靶点以及新的治疗策略^[12]。尽管人们已经认识到吡唑啉酮金属配合物作为抗菌药物开发的优势,然而目前对此类抗菌药物的研究主要集中在合成及活性上,对其抗菌机制的报道较少^[13]。鉴于吡唑啉酮配体和金属元素的不同,吡唑啉酮铜配合物表现的抗菌活性和抗菌机制具有差异性,利用转录组测序和分析技术将有助于深度阐明吡唑啉酮类配合物的抑菌分子机制。我们前期合成了一种吡唑啉酮铜配体和 1,10-菲咯啉 (1,10-phenanthroline, phen) 的杂环有机化合物^[14](命名为 P-FAH-Cu-phen),以金黄色葡萄球菌为研究对象,采用转录组测序技术从分子水平解析了 P-FAH-Cu-phen 作用下的金黄色葡萄球菌的转录组信息变化,旨在挖掘 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌的关键基因及相关代谢通

路,为开发新型吡唑啉酮金属配合物用于预防及控制金黄色葡萄球菌感染药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物

吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen 由新疆大学应用化学研究所制备。

1.1.2 菌株

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均为新疆师范大学生命科学学院新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室保存菌株,以上菌株均使用 LB 培养基培养。

1.1.3 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0。细菌总 RNA 快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; FastKing cDNA 第 1 链合成试剂盒、SuperReal 荧光定量预混试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。实时荧光定量 PCR 仪,赛默飞世尔科技公司;紫外分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)测定

采用液体稀释法测定 MIC 和 MBC。将对数生长期(OD_{600} 约为 0.6)的金黄色葡萄球菌稀释到 LB 液体培养基中,调整细菌终浓度为 2×10^6 CFU/mL,得到菌悬液。用液体培养基将 P-FAH-Cu-phen 母液稀释至不同浓度(1、2、4、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$),按 1:1 比例将 100 μL 稀释后的配合物加入含有 100 μL 菌悬液的 96 孔板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。0.5% DMSO 为阴性对照(最大配合物浓度对应的 DMSO 浓度)。每个浓度设置 3 个重复孔。与阴性对照对比,以无可见细菌生长的最

低浓度为最低抑菌浓度(MIC)。然后, 将每个孔的 100 μ L 培养物转移到琼脂平板培养基中, 继续培养 24 h, 以琼脂平板上无菌落或少于 5 个菌落的最低浓度为最低杀菌浓度(MBC)。

1.2.2 样品处理

将配合物 P-FAH-Cu-phen 加入对数生长期的金黄色葡萄球菌悬液中(OD_{600} 约为 0.6), 使其终浓度为 2 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 继续培养 30 min 和 2 h 后取样, 每个处理 2 个重复, 以不加配合物培养 30 min 和 2 h 的金黄色葡萄球菌作为空白对照。配合物处理 30 min 的实验组 2 个重复样分别标记为 phen 30 min-1 和 phen 30 min-2, 培养 30 min 的空白对照组标记为 ck 30 min-1 和 ck 30 min-2, 配合物处理 2 h 的实验组标记为 phen 2 h-1 和 phen 2 h-2, 培养 2 h 的空白对照组标记为 ck 2 h-1 和 ck 2 h-2。样品用锡箔纸包裹后立即置于液氮中, 共计 8 个样品, 利用装有干冰的冰盒将收集的样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 RNA 提取、质检、建库和转录组分析。

1.2.3 转录组测序数据处理

使用 Illumina HiSeq 对配合物处理前后的样品进行转录组测序。对原始数据进行剪切过滤, 采用 fastp 软件运用统计学的方法对构建的文库和所有测序 reads 进行质控分析, 得到原始数据 raw data。基于 Burrows-Wheeler 方法, 将 clean data 与参考基因组进行比对, 获得用于后续分析的 mapped data (reads), 同时对转录组测序的比对结果进行质量评估。

1.2.4 表达量分析及差异基因筛选

利用表达定量软件 RSEM 分别对基因的表达水平进行定量分析, 以转录本的条数(transcripts per million, TPM)为计算单位, 进行样本间基因的差异表达分析。基于负二项分布的 DESeq2 软件对 raw counts 进行统计分析, 基于筛选条件 $P\text{-adjust}<0.05$ & $|\log_2FC|\geq 1$ 获得比较组间差异表达

基因(differentially expressed gene, DEG)。

1.2.5 转录组数据验证

随机选取 10 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证转录组数据的可靠性。利用 Primer Premier 5.0 设计 RT-qPCR 引物(表 1), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 以 16S rRNA 基因为内参基因。按细菌总 RNA 快速抽提试剂盒说明书, 提取空白组和 P-FAH-Cu-phen 配合物处理 30 min 和 2 h 时的细菌总 RNA; 使用用于 qPCR 的 FastKing RT Kit (With gDNase)混液合成 cDNA; 使用 SuperReal PreMix Color (SYBR Green)进行实时荧光定量 PCR, 在每个反应中将 10 μ L $1\times$ SYBR Green qPCR 预混液与 2 μ L cDNA 样品、各 0.6 μ L 引物(最终浓度为 0.3 μ mol/L)和 6.8 μ L RNase-free ddH₂O 混合。用 RT-qPCR 对转录组测序中部分差异表达基因进行表达水平的相对定量检测, 系统^[15]按以下步骤进行扩增: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 32 s, 40 个循环。处理数据的公式为 $10^{(CT_{\text{内参基因}}-CT_{\text{目的基因}})/3.5}\times 100$, 运用 GraphPad Prism 8 软件作图分析。

1.2.6 GO 功能和 KEGG 富集分析

采用 BLAST2 GO 比对软件将差异表达基因序列与 GO 数据库进行比对。采用软件 goatools 对差异基因进行 GO 富集分析, Fisher 精确检验进行富集分析。为控制计算假阳性, 默认采用 Bonferroni 方法对 P 值进行校正, 当经过校正的 $P<0.05$ 时, 认为此 GO 功能存在显著富集情况。采用 Diamond 软件将差异表达基因序列与 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)数据库比对, Fisher 精确检验进行富集分析。默认采用 Benjamini and Hochberg (BH) 方法对 P 值进行校正, $P<0.05$ 时, 满足此条件的 KEGG 通路定义为在基因集中显著富集的 KEGG 通路。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Gene name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	Description
SAOUHSC_01633	TTCCTGCTCAATTCGGTGGG	TGTCGCTTATCGCGTCGAA	Glycine cleavage system P-protein subunit
SAOUHSC_00362	AATTCTTACAGGTTGCGCGTC	GCTTGCTTCATCTCTGCATCAC	Conserved hypothetical protein
SAOUHSC_00634	TTATCGGCGGTGGCATAACAG	ACGGTTGTGGATGTACGTGA	ABC transporter substrate-binding protein
SAOUHSC_02640	AATGGTGCCTCTGGTTCTGG	CCCGCTTCTTGACCTACGAG	Conserved hypothetical protein
SAOUHSC_02388	CAGCGAAGCAAGTGTGGTC	GCGTGATGTATGGCTTGCTT	Conserved hypothetical protein
SAOUHSC_01035	AGGGCATGGTTCTCAAGGTG	ACCAGATGGAATGCGACCAG	Conserved hypothetical protein
SAOUHSC_01614	ACAAGCAAAGGCAGAGGGAA	ATGGAAGGATGTGCGTGTGT	Dihydrolipoamide dehydrogenase
SAOUHSC_02116	TGAAAGAGCGTGTTTCGTCA	TACGCCACCCATTAACCAGT	Glutamyl (Gln)-tRNA amidotransferase B subunit
SAOUHSC_00898	ACCTGAAGAGTGGGTTGACG	ACTTACCACCAGCATCACCG	Argininosuccinate lyase
SAOUHSC_02702	GATTTACAGACTGCTCGTCGT	ACGAGCTAGGGATACTCGAAA	Conserved hypothetical protein
16S rRNA	CGTGCTACAATGGACAATACAAA	ATCTACGATTACTAGCGATTCCA	Reference gene

2 结果与分析

2.1 MIC、MBC 的测定

采用液体稀释法测定 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 平均值分别为 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌高通量测序质量及序列比对分析

为保证后续数据分析质量的可靠性,需要对

数据质量进行质控。由表 2 可知,通过测序,各样品获得的有效 clean reads 比例均在 99.15% 以上, clean bases 均达到 3.03 Gb 以上,各样品的 clean reads 错误率均低于 0.027%, Q20 和 Q30 水平分别在 97.5% 和 93.04% 以上,揭示转录组测序数据质量可靠,可用于后续结果分析。将质控后得到的高质量序列与指定的参考基因组比对,空白对照组和配合物组各个样本间的 total mapped 均在 95% 以上,uniq mapped 也在

表 2 RNA-Seq 质控数据统计

Table 2 RNA-Seq quality control data statistics

Sample name	Raw reads	Clean reads (%) ^a	Clean bases (bp)	Clean error rate (%) ^b	Q20 value (%) ^c	Q30 value (%) ^d
phen 30 min-1	26 183 304	26 018 268 (99.37%)	3 585 247 473	0.025 0	98.06	94.09
phen 30 min-2	24 031 352	23 843 232 (99.22%)	3 337 026 785	0.026 0	97.69	93.10
ck 30 min-1	22 954 850	22 801 954 (99.33%)	3 137 013 406	0.025 2	97.98	93.84
ck 30 min-2	24 380 010	24 200 512 (99.26%)	3 359 839 463	0.025 2	97.99	93.89
phen 2 h-1	23 451 736	23 273 160 (99.24%)	3 226 763 831	0.025 0	98.08	94.11
phen 2 h-2	24 438 366	24 287 570 (99.38%)	3 333 509 361	0.024 4	98.28	94.67
ck 2 h-1	24 234 580	24 028 812 (99.15%)	3 364 315 310	0.026 1	97.64	93.04
ck 2 h-2	22 241 584	22 093 010 (99.33%)	3 030 512 350	0.024 8	98.16	94.32

^a: Clean Reads 占 raw reads 的百分比. ^b: Clean error rate 占 raw reads 的百分比. ^c: 测序碱基质量达到 Q20 水平占 clean reads 的百分比. ^d: 测序碱基质量达到 Q30 水平占 clean reads 的百分比

^a: Clean reads as a percentage of raw reads. ^b: Clean error rate as a percentage of raw reads. ^c: Q20 as a percentage of clean reads. ^d: Q30 as a percentage of clean reads.

表 3 转录组序列比对结果统计

Table 3 Statistics of transcriptome sequence alignment result

Sample name	Total reads	Genome mapped reads ^a	Unmapped reads ^b	Uniq mapped reads ^c
phen 30 min-1	26 018 268	25 464 001 (97.87%)	554 267 (2.13%)	24 930 692 (95.82%)
phen 30 min-2	23 843 232	23 112 881 (96.94%)	730 351 (3.06%)	22 664 771 (95.06%)
ck 30 min-1	22 801 954	22 023 021 (96.58%)	778 933 (3.42%)	21 550 188 (94.51%)
ck 30 min-2	24 200 512	23 445 071 (96.88%)	755 441 (3.12%)	22 986 855 (94.98%)
phen 2 h-1	23 273 160	22 792 765 (97.94%)	480 395 (2.06%)	15 524 874 (66.71%)
phen 2 h-2	24 287 570	22 882 611 (94.22%)	1 404 959 (5.78%)	22 303 739 (91.83%)
ck 2 h-1	24 028 812	23 071 768 (96.02%)	957 044 (3.98%)	22 518 102 (93.71%)
ck 2 h-2	22 093 010	21 339 396 (96.59%)	753 614 (3.41%)	20 822 029 (94.25%)

^a: Genome mapped reads 占 total reads 百分比. ^b: Unmapped reads 占 total reads 百分比. ^c: Uniq mapped read 占 total reads 的百分比

^a: Genome mapped reads as a percentage of total reads. ^b: Unmapped reads percentage of total reads. ^c: Uniq mapped read as a percentage of total reads.

65%–95%之间, 表明选择的参考基因组是可行的(表 3)。将上述序列进行拼接和分析, 共获得 2 821 361 bp、GC 含量为 32.87%的基因组序列。分别在 NR 数据库、Swiss-Prot 数据库、Pfam 数据库、clusters of ortholog groups (COG) 数据库、GO 数据库、KEGG 数据库进行比对, 有 2 892 个序列获得注释, 注释基因数目和注释百分比分别为 NR (2 883, 99.69%)、Swiss-Prot (2 026, 70.06%)、Pfam (2 342, 80.98%)、COG (2 118, 73.24%)、GO (2 151, 74.38%)、KEGG (1 500, 51.87%) (表 4)。以上结果表明转录组组装结果可靠, 可以用于后续研究。

表 4 转录组数据基础注释统计结果

Table 4 Statistical of transcriptome data base annotation results

Annotated database	Annotated gene number	Gene percentage (%)
NR	2 883	99.69
Swiss-Prot	2 026	70.06
Pfam	2 342	80.98
COG	2 118	73.24
GO	2 151	74.38
KEGG	1 500	51.87

Gene percentage (%): Gene percentage annotated by annotated gene number to database (NR, Swiss-Prot, Pfam, COG, GO, KEGG).

2.3 P-FAH-Cu-phen 作用后金黄色葡萄球菌的差异基因整体统计

将空白对照组与配合物组处理金黄色葡萄球菌的基因进行表达量差异分析, 分析结果如表 5 所示。P-FAH-Cu-phen 处理 30 min 的实验组(phen 30 min)与培养 30 min 的空白对照组(ck 30 min)相比, 共筛选到 356 个差异表达基因, 其中 180 个上调表达、176 个下调表达。P-FAH-Cu-phen 处理 2 h 的实验组(phen 2 h)与培养 2 h 的空白对照组(ck 2 h)相比, 共筛选到 23 个差异表达基因, 其中 3 个上调表达、20 个下调表达。以上统计结果表明, 配合物 P-FAH-Cu-phen 处理 30 min 时, 金黄色葡萄球菌的差异基因最多, 上调基因略多于下调基因。处理 2 h 后差异基因变少, 但以下调基因居多。

表 5 P-FAH-Cu-phen 与空白对照组作用金黄色葡萄球菌的差异基因统计

Table 5 Differential expressed genes statistics of *Staphylococcus aureus* between P-FAH-Cu-phen and blank control group

Group name	Gene number
ck 30 min vs. phen 30 min up_mRNA	180
ck 30 min vs. phen 30 min down_mRNA	176
ck 30 min vs. phen 30 min all_mRNA	356
ck 2 h vs. phen 2 h up_mRNA	3
ck 2 h vs. phen 2 h down_mRNA	20
ck 2 h vs. phen 2 h all_mRNA	23

2.4 转录组数据的 RT-qPCR 验证

为了评估转录组数据, 随机筛选 10 个差异表达基因, 以 16S rRNA 为内参基因进行实时荧光定量 PCR 验证。由图 1 可知, RT-qPCR 验证结果与 RNA-Seq 数据具有良好的一致性, 证实本研究中 RNA-Seq 分析的结果具有可靠性。这 10 个基因包括甘氨酸裂解系统 P 蛋白亚基、谷氨酰(Gln)-tRNA 氨基转移酶、ABC 转运蛋白底物结合蛋白、二氢硫辛酰胺脱氢酶、精氨酸琥珀酸裂解酶和某些假设蛋白等。

2.5 差异表达基因的 GO 富集分析

基于 GO 数据库, 对以上获得的差异表达基因进行 GO 功能注释分析, 结果主要分为生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular

composition, CC)和分子功能(molecular function, MF)这三大类。P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 30 min 后, 由图 2 可知, 其差异基因富集于生物过程分类(407 个基因)的主要有发病机制(pathogenesis)、转录调控 DNA 模板(regulation of transcription, DNA-templated)和组氨酸生物合成过程(histidine biosynthetic process), 占 unigenes 总数的比例分别为 3.4%、2.7%和 4.2%; 富集于细胞组成分类(317 个基因)的主要有膜的组成部分(integral component of membrane)、细胞质(cytoplasm)、质膜(plasma membrane)和胞液(cytosol), 占 unigenes 总数的比例分别为 27.4%、20.1%、14.5%和 11.3%; 富集于分子功能分类(654 个基因)的主要有 ATP 结合(ATP binding)、金属离子结合(metal ion binding)、DNA 结合(DNA binding)、水解酶活性(hydrolase activity)和跨膜转运蛋白活性(transmembrane transporter activity), 占 unigenes 总数的比例分别为 6.7%、4.5%、3.5%、2.4%和 2.3%。

P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 2 h 后, 绝大部分是下调基因, 由图 3 可知, 下调表达基因主要集中在生物过程分类(15 个基因)中的硝酸盐同化(nitrate assimilation)和硝酸盐代谢过程(nitrate metabolic process), 占 unigenes 总数的比例分别为 20%和 13.3%; 细胞组分类(20 个基因)中的膜的组成部分(integral component of membrane)、质膜(plasma membrane)、细胞质(cytoplasm)和硝酸还原酶复合物(nitrate reductase complex), 占 unigenes 总数的比例分别为 40%、20%、15%和 15%; 分子功能分类(40 个基因)中的硝酸还原酶活性(nitrate reductase activity)、4 铁 4 硫簇结合(4 iron, 4 sulfur cluster binding)、金属离子结合(metal ion binding)和跨膜转运蛋白活性(transmembrane transporter activity), 占 unigenes 总数的比例分别

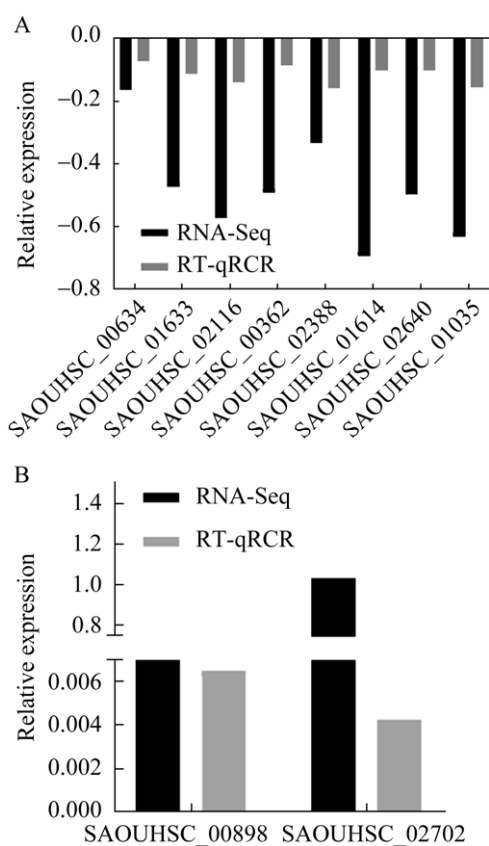


图 1 转录组数据的 RT-qPCR 验证

Figure 1 RT-qPCR validation of transcriptome data.

A: ck 30 min vs. phen 30 min. B: ck 2 h vs. phen 2 h.

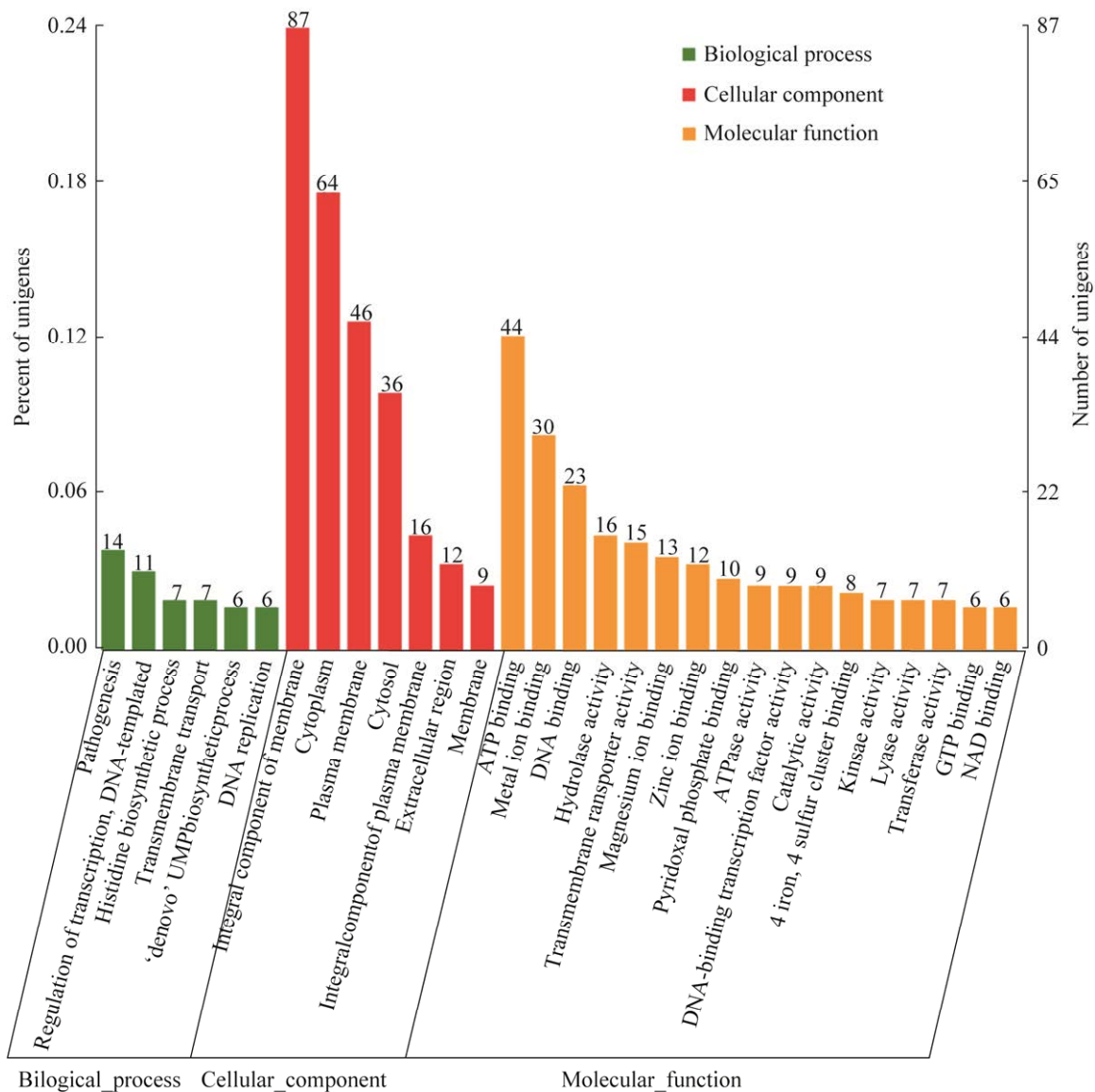


图 2 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 30 min 后差异表达基因的 GO 注释分类图

Figure 2 Go annotated classification map of differentially expressed genes after P-FAH-Cu-phen treatment of *Staphylococcus aureus* for 30 min.

为 10%、7.5%、7.5%和 7.5%。通过以上分析可以看出, 配合物处理金黄色葡萄球菌 30 min 后, 主要作用于细胞的组分和分子功能, 引起了包括细胞质膜组分的破坏和一些分子功能诸如 ATP 结合、DNA 结合、金属离子结合的变化, 药物处理 2 h 主要引起膜成分及硝酸盐代谢途径的变化。

2.6 差异表达基因的 KEGG 富集分析

基于 KEGG 数据库, P-FAH-Cu-phen 处理

30 min 后, 金黄色葡萄球菌的 356 个差异基因被定位到 KEGG 主要代谢通路, 与 ck 30 min 比较, 差异上调基因涉及 37 条通路, 显著富集的通路有 6 条($P < 0.05$) (图 4A), 分别为氮代谢 (7 个基因), 组氨酸代谢 (8 个基因), 双组分代谢 (15 个基因), 丙酮酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (7 个基因), 群体感应 (11 个基因), 嘧啶代谢 (7 个基因), 其中双组分系统和群体感应中富集

的基因数量最多。下调基因涉及 76 条通路，显著富集的通路有 5 条($P<0.05$) (图 4B)，分别为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(10 个基因)，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成(6 个基因)，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解(6 个基因)，灵芝红素生物合成(3 个基因)，三羧酸循环(7 个基因)，其中甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢富集的

基因数量最多。P-FAH-Cu-phen 处理 2 h 后，与 ck 2 h 比较，差异上调基因显著富集于丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢(1 个基因)和精氨酸生物合成通路(1 个基因) (图 4C)。下调基因涉及 4 条通路，显著富集的通路有 2 条($P<0.05$)，分别为氮代谢(5 个基因)和双组分系统(8 个基因) (图 4D)。

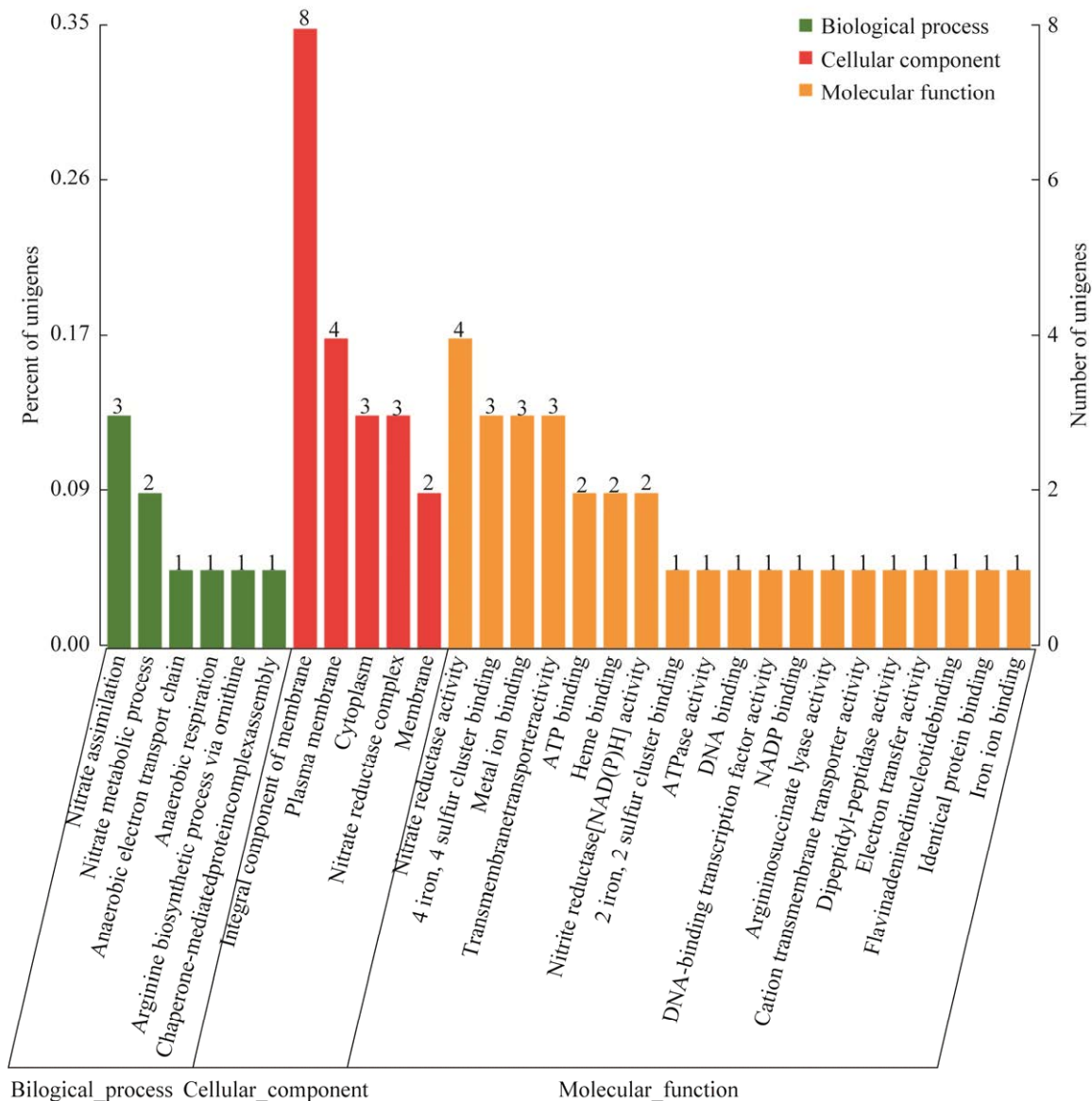
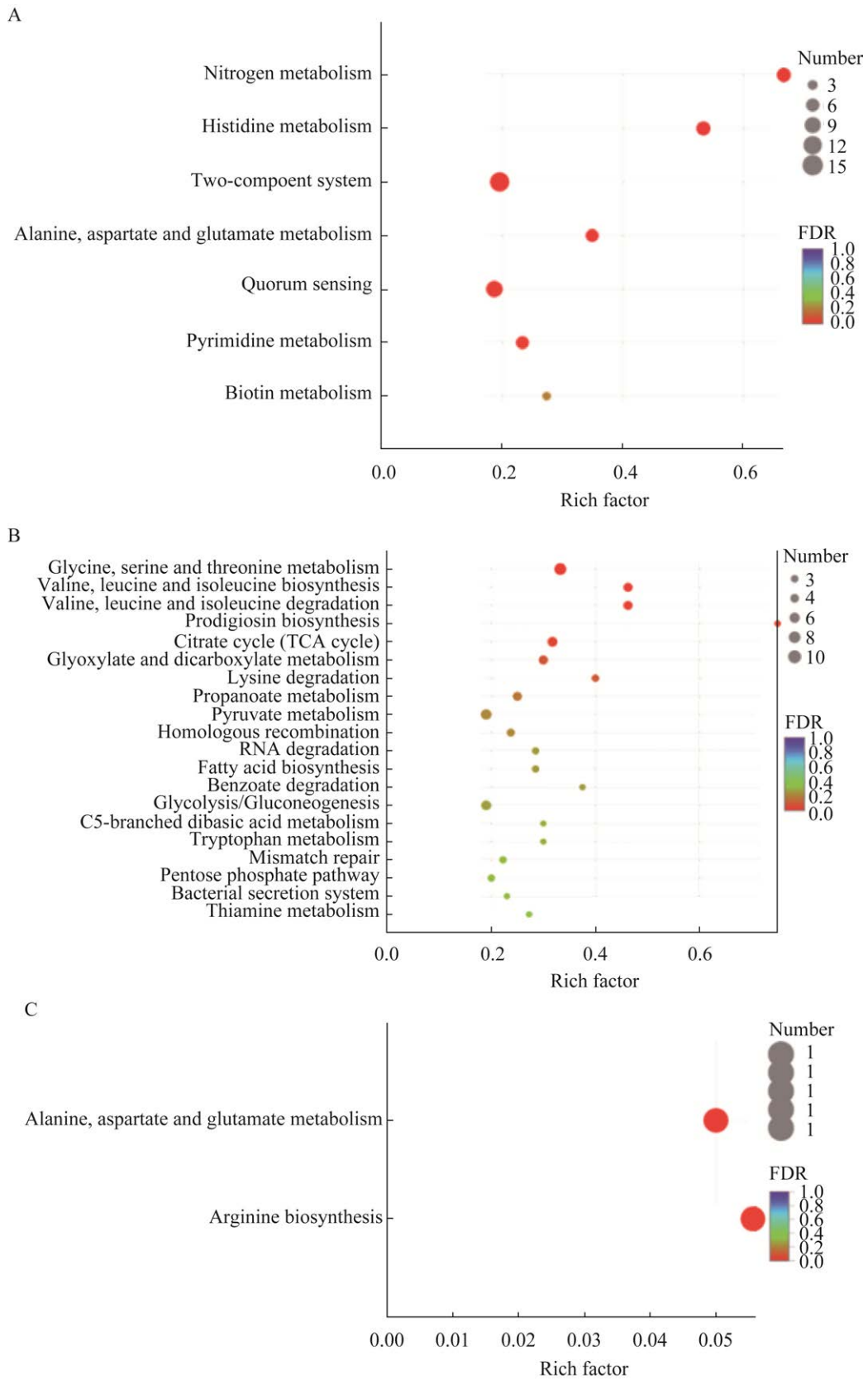


图 3 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 2 h 后差异表达基因的 GO 注释分类图

Figure 3 GO-annotated classification map of differentially expressed genes after P-FAH-Cu-phen treatment of *Staphylococcus aureus* for 2 h.



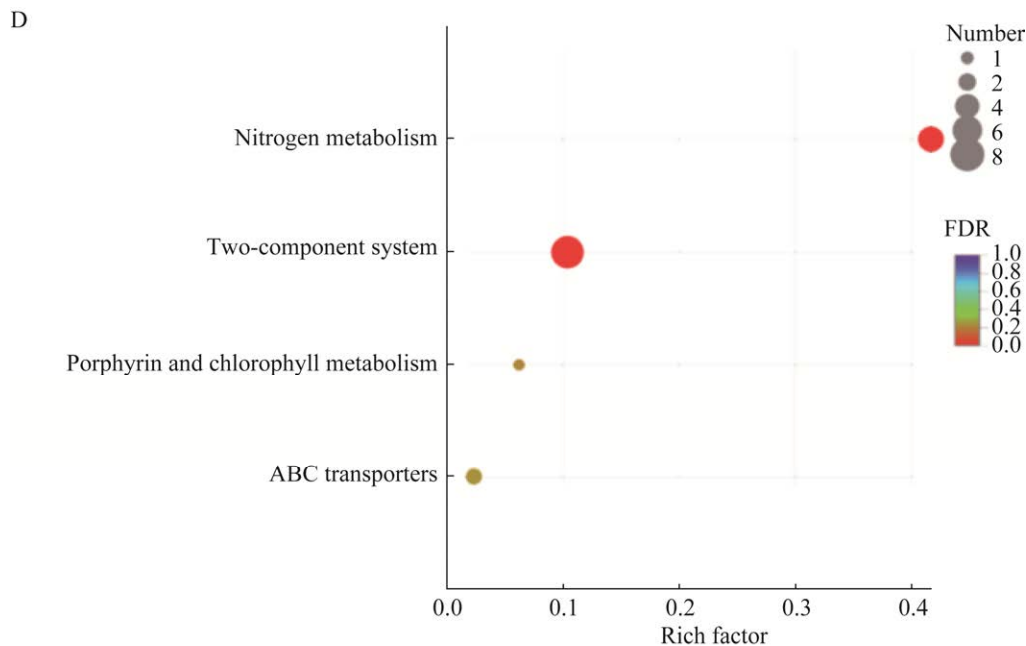


图4 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌的 KEGG Pathway 富集结果气泡图 A: ck 30 min vs. phen 30 min 上调基因. B: ck 30 min vs. phen 30 min 下调基因. C: ck 2 h vs. phen 2 h 上调基因. D: ck 2 h vs. phen 2 h 下调基因

Figure 4 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment results of P-FAH-Cu-phen treatment of *Staphylococcus aureus*. A: ck 30 min vs. phen 30 min up genes. B: ck 30 min vs. phen 30 min down genes. C: ck 2 h vs. phen 2 h up genes. D: ck 2 h vs. phen 2 h down genes.

2.6.1 涉及的双组分系统(two-component system) 代谢途径及其调控的相关差异表达基因变化

双组分系统是普遍存在于细菌中的一种信号传递系统, 能够使细菌感知、响应和适应各种环境、压力源和生长条件, 是细菌的适应生存机制^[16]。KEGG pathway 分析表明, 在 P-FAH-Cu-phen 作用 30 min 后, 金黄色葡萄球菌参与双组分系统(map02020)的 21 个基因中 5 个下调、15 个上调(表 6)。编码参与胞壁水解酶转运和抑制胞壁水解酶活性的穿孔素类蛋白(IrgB/IrgA)参与氮代谢和细胞呼吸能量守恒的硝酸还原酶(NarH、NarG、NarJ、NarI)、硝酸盐转运蛋白(NarT), 从胞外吸收有机磷酸盐化合物的糖磷酸转移蛋白 UhpT, 参与钾稳态的 K⁺摄取转运蛋白家族(KdpB、KdpC、KdpA), 在细胞生长的不同

阶段差异调节细胞壁相关蛋白和毒素表达的 Agr 调节系统, 这些基因表达上调; 而参与环境温度传感和膜流动性调节的组氨酸激酶传感器(DesK), 调节细胞壁生物合成和抗生素耐药的 VraSR 调节系统, 参与三羧酸循环及有氧或厌氧细胞生长的重要代谢酶苹果酸脱氢酶(SfcA), 有助于产生质子动力(proton motive force, PMF)、维持细菌能量守恒、驱动特定的代谢途径或提供各种应激条件(包括缺氧、中等碱化、高温)及接触有毒化合物保护的细胞色素 bd 泛醇氧化酶(CydA), 这些基因表达下调。在 P-FAH-Cu-phen 作用 2 h 后, 金黄色葡萄球菌参与双组分系统的 8 个基因下调(表 7), 其中包括硝酸还原酶(NarH、NarG、NarJ、NarI)和硝酸盐转运蛋白(NarT)基因, 这与 P-FAH-Cu-phen 作用 30 min 后这些基因表

达上调的结果相反。与此同时,控制金黄色葡萄球菌的硝酸还原酶和亚硝酸还原酶操纵子的双组分系统 NreCBA (包含 3 种蛋白质 NreC、NreB 和 NreA), 其基因表达也下调, 表明金黄色葡萄球菌的能量代谢被抑制。以上研究结果表明, P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌的不同时

表 6 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 30 min 影响的双组分系统代谢通路及其调控的相关差异表达基因

Table 6 A two-component systemic metabolic pathway and its regulated related differentially expressed genes affected by P-FAH-Cu-phen on *Staphylococcus aureus* for 30 min

Gene ID	Regulate	KO name	Description
SAOUHSC_00233	Up	<i>lrgB</i>	Holin-like protein LrgB
SAOUHSC_00232	Up	<i>lrgA</i>	Holin-like protein
SAOUHSC_02680	Up	<i>narH</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, beta subunit
SAOUHSC_02681	Up	<i>narG</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, alpha subunit
SAOUHSC_00183	Up	<i>uhpT</i>	MFS transporter, OPA family, hexose phosphate transport protein UhpT
SAOUHSC_02311	Up	<i>kdpB</i>	Potassium-transporting ATPase ATP-binding subunit
SAOUHSC_02310	Up	<i>kdpC</i>	Potassium-transporting ATPase KdpC subunit
SAOUHSC_02312	Up	<i>kdpA</i>	Potassium-transporting ATPase potassium-binding subunit
SAOUHSC_02671	Up	<i>narT</i>	MFS transporter, NNP family, putative nitrate transporter
SAOUHSC_02679	Up	<i>narJ</i>	Nitrate reductase molybdenum co-factor assembly chaperone
SAOUHSC_02678	Up	<i>narI</i>	Nitrate reductase gamma subunit
SAOUHSC_02261	Up	<i>agrB</i>	Accessory gene regulator protein B
SAOUHSC_02262	Up	<i>agrD</i>	AgrD protein
SAOUHSC_02264	Up	<i>agrC</i>	Two-component system, LytTR family, sensor histidine kinase AgrC
SAOUHSC_02265	Up	<i>agrA</i>	Two-component system, LytTR family, response regulator AgrA
SAOUHSC_02099	Down	<i>vraS</i>	Two-component system, NarL family, vancomycin resistance sensor histidine kinase VraS
SAOUHSC_02098	Down	<i>vraR</i>	Two-component system, NarL family, vancomycin resistance associated response regulator VraR
SAOUHSC_01313	Down	<i>desK</i>	Two-component system, NarL family, sensor histidine kinase DesK
SAOUHSC_01810	Down	<i>sfcA</i>	Malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)
SAOUHSC_01031	Down	<i>cydA</i>	Cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I

表 7 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 2 h 影响的双组分系统代谢通路及其调控的相关差异表达基因变化

Table 7 Two-component systemic metabolic pathways and their regulated related differentially expressed genes affected by P-FAH-Cu-phen on *Staphylococcus aureus* for 2 h

Gene ID	Regulate	KO name	Description
SAOUHSC_02671	Down	<i>narT</i>	MFS transporter, NNP family, putative nitrate transporter
SAOUHSC_02677	Down	<i>nreA</i>	Nitrogen regulatory protein A
SAOUHSC_02676	Down	<i>nreB</i>	NarL family, sensor histidine kinase NreB
SAOUHSC_02675	Down	<i>nreC</i>	NarL family, response regulator NreC
SAOUHSC_02679	Down	<i>narJ</i>	Nitrate reductase molybdenum co-factor assembly chaperone NarJ/NarW
SAOUHSC_02678	Down	<i>narI</i>	Nitrate reductase gamma subunit
SAOUHSC_02680	Down	<i>narH</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, beta subunit
SAOUHSC_02681	Down	<i>narG</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, alpha subunit

间内引起了金黄色葡萄球菌各种途径的应激反应,随着作用时间的延长,配合物主要通过影响能量平衡从而抑制金黄色葡萄球菌的生长。

2.6.2 涉及的群体感应(quorum sensing)代谢途径及其调控的相关差异表达基因变化

细菌毒力因子的产生受许多调节机制的控制,除双组分系统外,还需要通过细胞间彼此的交流生成一种自身诱导合成的物质(auto-inducer, AI),当 AI 浓度达到一定阈值时就会启动特定基因的表达,进而调控微生物群体的生理特征,如毒素、生物膜、抗生素的形成^[17],细菌的这种适应特性即为细菌的群体感应。KEGG pathway 分析表明,在 P-FAH-Cu-phen 作用 30 min 下,金黄色葡萄球菌参与群体感应(map02024)的 14 个基因中 3 个下调、11 个上调(表 8)。下调基因主要包括与细菌内膜蛋白插入和组装有关的信号识别粒子(Ffh)、易位蛋白酶(SecA)和家族膜蛋白插入酶(YidC),这些基因在膜的发生中发挥重要作用。上调表达的双组分 Agr 系统(AgrA、AgrC、AgrB 和 AgrD)调节了毒力因子

溶血素(Hld)、酚可溶性调节蛋白(PsmB)的表达。此外,谷氨酰内肽酶(SspA)基因表达上调,它是金黄色葡萄球菌产生的细胞外蛋白酶,主要降解葡萄球菌表面黏附分子,因此与生物膜的形成有关。以上分析表明,配合物可能通过影响群体感应系统来调控细菌内膜的组装、毒素的生成、生物膜的形成,从而影响细菌的代谢。

2.6.3 涉及的氮代谢(nitrogen metabolism)途径相关差异表达基因的变化

氮代谢的调节是微生物氮控制的主要方式。为了应对不断变化的氮供应,细菌已经进化出许多代谢途径适应环境营养供给^[18]。KEGG pathway 分析表明,在 P-FAH-Cu-phen 作用 30 min 后,金黄色葡萄球菌参与氮代谢(map00910)的 8 个基因上调(表 9)。编码硝酸还原酶/亚硝酸盐氧化还原酶 α 、 γ 和 β 亚基(NarG、NarI和NarH),亚硝酸盐还原酶(NADH 依赖型)大、小亚基(NirB和NirD),氨基甲酸激酶(ArcC)和谷氨酸合成酶(NADPH 依赖型)大、小链(GltB和GltD),这些基因表达上调。在 P-FAH-Cu-phen 作用 2 h 后,金黄

表 8 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 30 min 影响的群体感应代谢通路及其调控的相关差异表达基因
Table 8 Quorum sensing metabolic pathways and their regulated related differentially expressed genes affected by P-FAH-Cu-phen on *Staphylococcus aureus* for 30 min

Gene ID	Regulate	KO name	Description
SAOUHSC_01207	Down	<i>ffh</i>	Signal recognition particle subunit SRP54
SAOUHSC_02327	Down	<i>yidC</i>	YidC/Oxa1 family membrane protein insertase
SAOUHSC_00769	Down	<i>secA</i>	Preprotein translocase subunit SecA
SAOUHSC_00988	Up	<i>sspA</i>	Glutamyl endopeptidase
SAOUHSC_01377	Up	<i>ddpF</i>	Peptide/Nickel transport system ATP-binding protein
SAOUHSC_02260	Up	<i>hld</i>	Delta-hemolysin
SAOUHSC_02261	Up	<i>agrB</i>	Accessory gene regulator protein B
SAOUHSC_02262	Up	<i>agrD</i>	AgrD protein
SAOUHSC_02264	Up	<i>agrC</i>	Two-component system, LytTR family, sensor histidine kinase AgrC
SAOUHSC_02265	Up	<i>agrA</i>	Two-component system, LytTR family, response regulator AgrA
SAOUHSC_01135	Up	<i>psmB</i>	Phenol-soluble modulins beta
SAOUHSC_01136	Up	<i>psmB</i>	Phenol-soluble modulins beta
SAOUHSC_00929	Up	<i>ddpD</i>	Peptide/Nickel transport system ATP-binding protein
SAOUHSC_00928	Up	<i>ABC.PE.S</i>	Peptide/Nickel transport system substrate-binding protein

色葡萄球菌参与氮代谢的 5 个基因下调(表 10), 其中包括 *NarG*、*NarI*、*NarH*、*NirB* 和 *NirD*, 与 P-FAH-Cu-phen 作用 30 min 后这些基因表达上调的结果相反, 表明随着 P-FAH-Cu-phen 作用时间的延长, 配合物可能通过抑制金黄色葡萄球菌的氮素利用或能量代谢进而影响金黄色葡萄球菌的生长。

2.6.4 涉及的三羧酸(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环代谢通路相关差异表达基因的变化

TCA 循环是需氧生物氧化糖或其他物质获得能量的主要代谢途径^[19]。KEGG pathway 分析

表明, 在 P-FAH-Cu-phen 作用 30 min 下, 金黄色葡萄球菌参与 TCA (map00020)下调的有 7 个基因(表 11), 主要包括(顺)乌头酸水解酶(*AcnA*)、异柠檬酸脱氢酶(*Icd*)、二氢硫辛酰胺脱氢酶(*Lpd*)、丙酮酸脱氢酶(*PdhB*)、丙酮酸脱氢酶(二氢硫辛酰胺乙酰转移酶) (*AceF*)和苹果酸脱氢酶(醌) (*Mqo*)。以上分析表明, 配合物可能通过抑制 TCA 氧化途径的酶来降低内源性氧化应激, 阻滞 ATP 产生从而影响细菌的代谢和慢性感染。

表 9 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 30 min 影响的氮代谢通路相关差异表达基因及其调控的相关差异表达基因

Table 9 nitrogen metabolic pathways and their regulated related differentially expressed genes affected by P-FAH-Cu-phen on *Staphylococcus aureus* for 30 min

Gene ID	Regulate	KO name	Description
SAOUHSC_02681	Up	<i>narG</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, alpha subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]
SAOUHSC_02680	Up	<i>narH</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, beta subunit
SAOUHSC_02678	Up	<i>narI</i>	Nitrate reductase gamma subunit
SAOUHSC_02684	Up	<i>nirB</i>	Nitrite reductase (NADH) large subunit [EC:1.7.1.15]
SAOUHSC_02683	Up	<i>nirD</i>	Nitrite reductase (NADH) small subunit
SAOUHSC_01129	Up	<i>arcC</i>	Carbamate kinase [EC:2.7.2.2]
SAOUHSC_00435	Up	<i>gltB</i>	Glutamate synthase (NADPH) large chain [EC:1.4.1.13]
SAOUHSC_00436	Up	<i>gltD</i>	Glutamate synthase (NADPH) small chain

表 10 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 2 h 影响的氮代谢通路相关差异表达基因及其调控的相关差异表达基因

Table 10 nitrogen metabolic pathways and their regulated related differentially expressed genes affected by P-FAH-Cu-phen on *Staphylococcus aureus* for 2 h

Gene ID	Regulate	KO name	Description
SAOUHSC_02678	Down	<i>narI</i>	Nitrate reductase gamma subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]
SAOUHSC_02683	Down	<i>nirD</i>	Nitrite reductase (NADH) small subunit [EC:1.7.1.15]
SAOUHSC_02680	Down	<i>narH</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, beta subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]
SAOUHSC_02681	Down	<i>narG</i>	Nitrate reductase/Nitrite oxidoreductase, alpha subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]
SAOUHSC_02684	Down	<i>nirB</i>	Nitrite reductase (NADH) large subunit [EC:1.7.1.15]

表 11 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 30 min 影响的三羧酸循环通路相关差异表达基因

Table 11 Citrate cycle pathways and their regulated related differentially expressed genes affected by P-FAH-Cu-phen on *Staphylococcus aureus* for 30 min

Gene ID	Regulate	KO name	Description
SAOUHSC_01614	Down	<i>lpd</i>	Dihydrolipoamide dehydrogenase [EC:1.8.1.4]
SAOUHSC_01041	Down	<i>pdhB</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit [EC:1.2.4.1]
SAOUHSC_01043	Down	<i>lpd</i>	Dihydrolipoamide dehydrogenase [EC:1.8.1.4]
SAOUHSC_01042	Down	<i>aceF</i>	Pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase) [EC:2.3.1.12]
SAOUHSC_01347	Down	<i>acnA</i>	Aconitate hydratase [EC:4.2.1.3]
SAOUHSC_02647	Down	<i>mgo</i>	Malate dehydrogenase (quinone) [EC:1.1.5.4]
SAOUHSC_01801	Down	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42]

3 讨论

金黄色葡萄球菌引起多种人类疾病的能力反映了其对人体不同微环境的适应能力,并提示金黄色葡萄球菌的发病机制是一个复杂的过程^[20]。这些感染中的大多数不再对常见的抗生素有反应。因此,科学家们正在积极努力寻找临床可以替代的新型抗菌药物。吡唑啉酮在结构上具有多个配位位点,可与许多金属离子配位,而金属离子往往构成电子转移和反应的中心,因此二者的结合使得吡唑啉酮金属配合物具有更突出的生物活性^[21]。Joseph 等^[22]制备了 2 种 4-甲酰基吡唑啉酮的铜配合物,抗菌活性检测表明 2 种铜配合物均能抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等细菌的生长,效果与左氧氟沙星和莫西沙星等标准药物相当。Azam 等^[23]合成了一种以吡唑啉酮为核心配体的铜金属配合物,与标准药物阿莫西林相比,铜配合物对索氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)表现出更好的抗菌活性。这些研究表明,基于吡唑啉酮的铜配合物是抗菌药物的优良试剂。但目前对其抗菌机制的探索相对较少,特别是利用高通量测序技术来解析此类配合物的抗菌机制。

本研究前期合成了一种新型吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen,该配合物对金黄色葡萄球

菌具有较强的抑菌活性。本研究对其处理金黄色葡萄球菌不同时间(30 min 和 2 h)的转录组差异基因分析发现金黄色葡萄球菌响应金属配合物的调控具有时间差异性。作用 30 min 时,细菌的差异基因变化个数(356 个)最多,表明细菌在此时受到配合物的影响最大。进一步对差异基因的 GO 功能分析表明,差异基因主要集中在膜的组成部分、细胞质、质膜、ATP 结合、发病机制、金属离子结合、组氨酸生物合成过程、DNA 结合发生变化,水解酶活性、跨膜转运蛋白活性、硝酸盐同化、硝酸盐代谢过程、硝酸还原酶复合物、硝酸还原酶活性等功能上变化。这些差异基因揭示细菌质膜、转运蛋白、ATP 结合、DNA 结合、硝酸盐可能是该配合物的作用位点,这与先前报道的金属配合物的某些抑菌机制^[24]相一致。

KEGG 分析表明,差异上调基因主要富集在双组分系统、群体感应、氮代谢等通路,差异下调基因主要富集在双组分系统、氮代谢、TCA 循环代谢通路、氨基酸代谢等。细菌在自然环境包括抗菌药物的选择压力下会引发多种特异性和高度调节的适应性反应,这些反应可以保护细菌免受有害压力的影响^[25]。在本研究中,配合物 P-FAH-Cu-phen 作用金黄色葡萄球菌 30 min 时引起了双组分系统、群体感应代谢通路的变化,一些毒力因子、细胞壁合成、生物膜形成,能量代

谢等相关蛋白的基因表达上调表明金黄色葡萄球菌在面对急性压力时出现了应激反应,参与一些氮代谢,氨基酸代谢的基因也上调,这可能是细菌逐渐死亡过程中的代谢紊乱^[26]。同时我们也发现许多基因被下调。例如,与万古霉素耐药相关的双组分调节系统 VraSR,该系统由组氨酸激酶 VraS 和反应调控蛋白 VraR 构成。VraSR 能迅速感应细胞壁的伤害并做出相应的反应,通过调节细胞壁生物合成和抗生素耐药基因来促进对细胞壁抗生素的耐药性^[27]。金黄色葡萄球菌暴露于影响细胞壁的抗生素如糖肽、 β -内酰胺、杆菌肽、D-环丝氨酸和阳离子抗菌肽(cationic antimicrobial peptides, CAMP)中 VraSR 可被诱导^[28]。本研究中 VraSR 有明显的表达下调,推测 P-FAH-Cu-phen 可影响金黄色葡萄球菌的细胞壁。另外, CydA 表达下调。该酶是截至目前在原核生物电子传递链中唯一被鉴定的呼吸末端氧化酶,其主要作用是将分子氧与氢还原结合形成水,产生用于生产三磷酸腺苷的质子动力。它赋予细菌对各种压力源的抵抗力,是一种潜在的药物靶点^[29]。同时, CydA 被证明可以促进有害活性氧和氮物质的降解,在细菌氧化应激中发挥重要作用^[30]。因此, P-FAH-Cu-phen 对 CydA 的抑制表明细菌的能量代谢及氧化应激保护被阻断。此外,配合物处理后 Mqo 表达下调。它作为 TCA 中的重要氧化还原酶成员,催化苹果酸和草酰乙酸的相互转化,这种酶是细胞生长代谢和繁殖所必需的,它能否正常地催化反应进行会直接影响到整个 TCA 能否顺利地运转^[31]。总之, Mqo 的下调揭示了 P-FAH-Cu-phen 显著影响了细菌的生长代谢。在 P-FAH-Cu-phen 作用 2 h 后主要引起了氮代谢、双组分代谢通路、氨基酸代谢通路的变化,其中以下调基因居多。如在厌氧条件下参与呼吸代谢的硝酸盐相关基因。金黄色葡萄球菌能够在厌氧条件下采用硝酸盐

作为生长的氮源,或作为末端电子受体转换为硝酸盐呼吸,一方面通过降解硝酸盐从而避免体内累积损害;另一方面通过硝酸盐呼吸为自身代谢提供能量^[32]。因此,硝酸盐代谢的抑制提示配合物 P-FAH-Cu-phen 通过抑制金黄色葡萄球菌的氮素利用或能量代谢而抑制其生长。结合 TCA 循环中许多氧化还原酶的抑制,进一步证明在 P-FAH-Cu-phen 发挥抗菌作用的过程中能量代谢的调控占据着非常重要的地位。此外,还有很多酶(或其他蛋白)的表达受到了 P-FAH-Cu-phen 的抑制作用,它们分散在各个信号通路里,并且有些酶参与多个代谢途径,因此 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的转录组的影响是复杂的,还有很多信息有待进一步挖掘。

4 结论

本研究通过转录组分析了吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的基因表达的影响,结果表明随作用时间不同,配合物对金黄色葡萄球菌的功能和代谢影响具有差异性,功能变化主要发生在膜的组成部分、细胞质、质膜、ATP 结合等方面。差异上调基因主要富集在氮代谢、双组分系统、群体感应代谢通路,差异下调基因主要富集在双组分系统、氮代谢通路、TCA 循环代谢、氨基酸代谢。这些差异基因参与细菌质膜组成、毒素生成、生物膜形成、细胞壁合成、能量代谢等,揭示这可能是吡唑啉酮铜配合物 P-FAH-Cu-phen 对金黄色葡萄球菌的主要抑菌作用,其深层次的机制需通过相关实验进一步去探究。

致谢

感谢新疆师范大学校级重点学科生物学学科、中亚区域有害生物联合控制国际研究中心在人员和物资等方面的大力资助。

REFERENCES

- [1] TONG SYC, DAVIS JS, EICHENBERGER E, HOLLAND TL, FOWLER Jr VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 603-661.
- [2] CZAPLEWSKI L, BAX R, CLOKIE M, DAWSON M, FAIRHEAD H, FISCHETTI VA, FOSTER S, GILMORE BF, HANCOCK REW, HARPER D, HENDERSON IR, HILPERT K, JONES BV, KADIOGLU A, KNOWLES D, ÓLAFSDÓTTIR S, PAYNE D, PROJAN S, SHAUNAK S, SILVERMAN J, et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 239-251.
- [3] 蓝素桂, 李治蓉, 苏爱秋, 彭燕鸿, 廖燕科, 刘雪梅, 谭强. 金黄色葡萄球菌抗生素耐药研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(13): 310-317.
- LAN SG, LI ZR, SU AQ, PENG YH, LIAO YK, LIU XM, TAN Q. Review on the antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(13): 310-317 (in Chinese).
- [4] GABRIELIAN L, TRCHOUNIAN A. Antibacterial activities of transient metals nanoparticles and membranous mechanisms of action[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2019, 35(10): 162.
- [5] BELETE TM. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents[J]. *Human Microbiome Journal*, 2019, 11: 100052.
- [6] FREI A, ZUEGG J, ELLIOTT AG, BAKER M, BRAESE S, BROWN C, CHEN F, DOWSON CG, DUJARDIN G, JUNG N, KING AP, MANSOUR AM, MASSI M, MOAT J, MOHAMED HA, RENFREW AK, RUTLEDGE PJ, SADLER PJ, TODD MH, WILLANS CE, et al. Metal complexes as a promising source for new antibiotics[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(10): 2627-2639.
- [7] 张思琪, 王路, 王振宇. 吡啶啉酮衍生物及其金属配合物抗肿瘤研究进展[J]. *化学研究与应用*, 2014, 26(6): 777-784.
- ZHANG SQ, WANG L, WANG ZY. Antitumor activities of pyrazolone derivatives and their metal complexes[J]. *Chemical Research and Application*, 2014, 26(6): 777-784 (in Chinese).
- [8] YOUSIF E, MAJEED A, AL-SAMMARRAE K, SALIH N, SALIMON J, ABDULLAH B. Metal complexes of Schiff bases: preparation, characterization, and biological activity[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 10: S1639-S1644.
- [9] FARRELL N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, 232(1): 1-4.
- [10] LIU JJ, ZHAO MY, ZHANG X, ZHAO X, ZHU HL. Pyrazole derivatives as antitumor, anti-inflammatory and antibacterial agents[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(13): 1957-1966.
- [11] KHAIRNAR SD, SHINDE SG, SHRIVASTAVA VS. A short review on the improvement of antimicrobial activity by metal and nonmetal doping in nanoscale antimicrobial materials[J]. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery*, 2019, 9: 163.
- [12] DOMÍNGUEZ Á, MUÑOZ E, LÓPEZ MC, CORDERO M, MARTÍNEZ JP, VIÑAS M. Transcriptomics as a tool to discover new antibacterial targets[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(6): 819-828.
- [13] MARCHETTI F, PETTINARI C, NICOLA CD, TOMBESI A, PETTINARI R. Coordination chemistry of pyrazolone-based ligands and applications of their metal complexes[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, 401: 213069.
- [14] NURMAMAT M, YAN HL, WANG R, ZHAO HX, LI YH, WANG XJ, NURMAIMAITI K, KURMANJIANG T, LUO DF, BAODI J, XU GC, LI JY. Novel copper(II) complex with a 4-acylpyrazolone derivative and coligand induce apoptosis in liver cancer cells[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2021, 12(3): 467-476.
- [15] YANG B, KONG J, FANG X. Programmable CRISPR-Cas9 microneedle patch for long-term capture and real-time monitoring of universal cell-free DNA[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1-16.
- [16] LAUB MT, GOULIAN M. Specificity in two-component signal transduction pathways[J]. *Annual Review of Genetics*, 2007, 41: 121-145.
- [17] BUTRICO CE, CASSAT JE. Quorum sensing and toxin production in *Staphylococcus aureus* osteomyelitis: pathogenesis and paradox[J]. *Toxins*, 2020, 12(8): 516.
- [18] 李琴, 燕永亮, 苏磊, 战崙华, 张云华, 王荣富. 一般氮代谢调控蛋白NtrC的研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(3): 113-122.
- LI Q, YAN YL, SU L, ZHAN YH, ZHANG YH, WANG RF. Progress on general nitrogen regulation protein NtrC[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(3): 113-122 (in Chinese).
- [19] DELEPELAIRE P. Bacterial ABC transporters of iron containing compounds[J]. *Research in Microbiology*,

- 2019, 170(8): 345-357.
- [20] CHEUNG GYC, BAE JS, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 547-569.
- [21] PETTINARI C, TĂBĂCARU A, GALLI S. Coordination polymers and metal-organic frameworks based on poly (pyrazole)-containing ligands[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2016, 307: 1-31.
- [22] JOSEPH VA, PANDYA JH, JADEJA RN. Syntheses, crystal structure and biological evaluation of Schiff bases and copper complexes derived from 4-formylpyrazolone[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2015, 1081: 443-448.
- [23] AZAM M, WABAIDUR SM, ALAM M, TRZESOWSKA-KRUSZYNSKA A, KRUSZYNSKI R, AL-RESAYES SI, ALQAHTANI FF, KHAN MR, RAJENDRA. Design, structural investigations and antimicrobial activity of pyrazole nucleating copper and zinc complexes[J]. *Polyhedron*, 2021, 195: 114991.
- [24] NANDANWAR SK, KIM HJ. Anticancer and antibacterial activity of transition metal complexes[J]. *ChemistrySelect*, 2019, 4(5): 1706-1721.
- [25] KUMAR A, RAHAL A, SOHAL JS, GUPTA VK. Bacterial stress response: understanding the molecular mechanics to identify possible therapeutic targets[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2021, 19(2): 121-127.
- [26] HUA X, YANG Q, ZHANG WJ, DONG ZM, YU SY, SCHWARZ S, LIU SG. Antibacterial activity and mechanism of action of aspidinol against multi-drug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 619.
- [27] BLEUL L, FRANCOIS P, WOLZ C. Two-component systems of *S. aureus*: signaling and sensing mechanisms[J]. *Genes*, 2021, 13(1): 34.
- [28] HAAG AF, BAGNOLI F. The role of two-component signal transduction systems in *Staphylococcus aureus* virulence regulation[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, 409: 145-198.
- [29] BORISOV VB, SILETSKY SA, PAIARDINI A, HOOGEWIJS D, FORTE E, GIUFFRÈ A, POOLE RK. Bacterial oxidases of the cytochrome bd family: redox enzymes of unique structure, function, and utility as drug targets[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2021, 34(16): 1280-1318.
- [30] UNDEN G, KLEIN R. Sensing of O₂ and nitrate by bacteria: alternative strategies for transcriptional regulation of nitrate respiration by O₂ and nitrate[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(1): 5-14.
- [31] TAKAHASHI-ÍÑIGUEZ T, ABURTO-RODRÍGUEZ N, VILCHIS-GONZÁLEZ AL, FLORES ME. Function, kinetic properties, crystallization, and regulation of microbial malate dehydrogenase[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2016, 17(4): 247-261.
- [32] FUCHS S, PANÉ-FARRÉ J, KOHLER C, HECKER M, ENGELMANN S. Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4275-4289.