

研究报告

末端氧化酶 CyxA 增强肺炎克雷伯菌对外界环境的抵抗力及致病性

卢慧改¹, 宋国源¹, 张福升¹, 田玉姣¹, 谢继臣¹, 肖潇¹, 李蓓^{1,3}, 李默然^{*1,2}

1 湖北医药学院基础医学院, 湖北 十堰 442000

2 湖北医药学院附属人民医院呼吸科, 湖北 十堰 442000

3 湖北医药学院生物医药研究院, 湖北 十堰 442000

卢慧改, 宋国源, 张福升, 田玉姣, 谢继臣, 肖潇, 李蓓, 李默然. 末端氧化酶 CyxA 增强肺炎克雷伯菌对外界环境的抵抗力及致病性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3818-3832.

LU Huigai, SONG Guoyuan, ZHANG Fusheng, TIAN Yujiao, XIE Jichen, XIAO Xiao, LI Bei, LI Moran. Terminal oxidase CyxA enhances the resistance to external environment and pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3818-3832.

摘要:【背景】细胞色素 bd 末端氧化酶存在于许多致病菌中, 保护细菌免受各种不利环境应激的损害, 促进多种致病菌的毒力, 由于真核生物缺乏这种酶, 被认为是开发新型抗菌药物的一个有前景的靶标, 肺炎克雷伯菌(以下简称“肺克”)中末端氧化酶的作用至今尚不清楚。【目的】探究末端氧化酶 CyxA 在肺炎克雷伯菌中的生物学功能。【方法】构建 *cyxA* 基因无痕缺失株与回补株, 通过体外实验比较野生株 WT 及敲除株 $\Delta cyxA$ 的生长能力、生物被膜和荚膜合成能力、对不同环境因素(酸性、高渗、氧化、还原)及抗生素的抵抗力, 同时结合体内感染实验分析 CyxA 对肺克致病性的作用。【结果】缺失 *cyxA* 基因后肺克体外有氧生长能力明显降低, 生物被膜和荚膜合成能力无差异, 对 pH 5.5、1.9%氯化钠、过氧化氢、 β -巯基乙醇和部分 β -内酰胺类及氨基糖苷类抗生素的抵抗力降低。通过小鼠滴鼻实验发现缺失 *cyxA* 基因后肺克的致病性降低。【结论】本研究首次证实末端氧化酶 CyxA 促进肺克有氧生长, 增强该菌对酸性、高渗、氧化还原环境及部分抗生素的抵抗力, 从而增强肺克的致病性。该研究为进一步阐明末端氧化酶对肺克致病性的分子机制奠定基础, 为后续开发靶向肺克末端氧化酶的新型抗菌药物提供参考。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 末端氧化酶; CyxA; 抵抗力; 致病性

资助项目: 国家自然科学基金(81902034); 湖北医药学院人才启动金项目(2021QDJZR021); 湖北医药学院基础医学院研究生科技创新项目(JC2022015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81902034), the Faculty Development Grants from Hubei University of Medicine (2021QDJZR021), and the Graduate Science and Technology Innovation Project of School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine (JC2022015).

*Corresponding author. E-mail: moranli@whu.edu.cn

Received: 2022-12-27; Accepted: 2023-01-18; Published online: 2023-02-16

Terminal oxidase CyxA enhances the resistance to external environment and pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*

LU Huigai¹, SONG Guoyuan¹, ZHANG Fusheng¹, TIAN Yujiao¹, XIE Jichen¹, XIAO Xiao¹, LI Bei^{1,3}, LI Moran^{*1,2}

¹ School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

² Department of Respiratory Medicine, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

³ Biomedical Research Institute, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

Abstract: [Background] Cytochrome bd terminal oxidase, existing in a variety of bacterial pathogens, protects bacteria from environmental stress conditions and enhances the virulence. As bd oxidase is absent in eukaryotes, it is considered as a promising target for developing novel antimicrobials. The role of terminal oxidase in *Klebsiella pneumoniae* remains unclear. [Objective] This study aims to explore the biological role of the terminal oxidase CyxA in *K. pneumoniae*. [Methods] The *cyxA* traceless deletion mutant and complemented strain were constructed. The wild-type strain (WT) and the mutant $\Delta cyxA$ were compared by *in vitro* experiments in regard to the growth, biofilm formation, capsule synthesis, and resistance to different environmental factors (acidity, hyperosmosis, oxidation, and reduction) and antibiotics. Further, *in vivo* infection experiment was carried out to study the effect of CyxA on the pathogenicity of *K. pneumoniae*. [Results] The deletion of *cyxA* significantly inhibited the aerobic growth of *K. pneumoniae* *in vitro*, did not affect the biofilm formation or capsule synthesis, and weakened the resistance to pH 5.5, 1.9% NaCl, H₂O₂, β -mercaptoethanol, and some β -lactam and aminoglycoside antibiotics. Nasal drip experiments of mice showed that the pathogenicity of *K. pneumoniae* decreased after the deletion of *cyxA*. [Conclusion] This study demonstrated for the first time that the terminal oxidase CyxA promotes the aerobic growth and enhances the resistance to acidic, hyperosmotic, redox environment and some antibiotics, thus increasing the pathogenicity of *K. pneumoniae*. The findings lay a foundation for further deciphering the molecular mechanism of terminal oxidase affecting the pathogenicity of *K. pneumoniae* and provide a theoretical basis for the subsequent development of novel antibacterial agents targeting *K. pneumoniae* terminal oxidase.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; terminal oxidase; CyxA; resistance; pathogenicity

肺炎克雷伯菌(简称“肺克”)属肠杆菌科兼性厌氧菌,易在人的呼吸道、肠道和泌尿生殖道定殖,是医院内感染及社区获得性感染的主要致病菌,由于耐药菌株的日益流行,目前已成为一个严重的公共卫生问题^[1-2]。高毒力肺克的毒力和侵袭性更强,能够在健康个体中引起

严重的社区获得性感染,导致化脓性肝脓肿和眼内炎、脑膜炎、坏死性筋膜炎、脾脓肿、骨髓炎等转移性并发症,患者发病率和死亡率显著提高^[3-4]。尤其近年来临床上耐碳青霉烯高毒力肺克菌株逐年增加,由于其高毒力、高耐药性导致感染后几乎无药可医^[5-6]。因此,寻找治疗

肺克感染的新方法或新型抗菌药物迫在眉睫。

在自然界中,肺克广泛存在于哺乳动物的口腔、皮肤、肠道,以及土壤、水和医疗设备等环境中^[7]。在这些环境中,肺克会遭遇不同压力,如 pH 变化、氧化应激和渗透压应激等^[8]。肺克可通过呼吸道进入肺泡,被肺泡巨噬细胞吞噬内化,再与溶酶体融合形成吞溶酶体,最终形成酸性、大量活性氧/活性氮的杀菌环境。在感染早期,中性粒细胞被迅速招募至感染部位,并通过氧化和非氧化机制杀死病原体^[9-10]。此外,肺克也可通过消化道感染宿主,需面临胃酸性、肠道高渗等环境压力^[11-12]。肺克需要适应这些内外环境压力,在这些不利环境中生存是其感染宿主并传播的前提。病原菌会根据环境改变自身代谢途径获得最大能量从而持续感染宿主,其中末端氧化酶就是一种优化宿主环境新陈代谢的机制^[13]。

细菌存在 3 种有氧呼吸的末端氧化酶:细胞色素 bo3 氧化酶 Cyo、细胞色素 bd-I 氧化酶 CydAB 和细胞色素 bd-II 氧化酶 CyxAB,其中 CydAB 和 CyxAB 在微氧条件下发挥功能^[14-15]。细胞色素 bd 氧化酶存在于许多致病菌中,对氧气亲和力和高^[16]。研究发现,除提供生物能量外,bd 氧化酶在致病菌处于各种应激条件时提供保护,包括缺氧、高温和暴露于有毒化合物,如抗生素、一氧化氮、氰化物和硫化氢等;此外,bd 氧化酶被证明有助于降解有害的活性氧和活性氮,如过氧化氢或过氧亚硝酸盐^[14,16-17]。由于 bd 氧化酶促进了大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、结核分枝杆菌、单增李斯特菌等多种致病菌的毒力,且真核生物缺乏这种酶,被认为是开发新型抗菌药物的一个有前景的药物靶点^[16,18-21]。目前肺炎克雷伯菌中末端氧化酶的作用尚不清楚。因此本文探究细胞色素 bd-II 氧化酶在肺克中的功能,为以后开发针对肺克尤其是高耐药高

毒力肺克感染的有效新型抗菌药物提供前期理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用高毒力肺克菌株 NTUH-K2044、温敏型自杀载体 pKO3-km (卡那霉素抗性)由军事医学科学院微生物流行病学研究所惠赠。菌株 *Escherichia coli* DH5 α 和质粒 pGEM-T-easy 由本实验室保存,本研究所用引物详见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.2 实验动物

选用 8 周龄 BALB/c 小鼠,雌性,体重为 18–22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。小鼠均在清洁级实验室饲养,22 °C 左右恒温,12 h 光照,12 h 黑暗,勤更换水和饲料。动物实验符合伦理要求,通过湖北医药学院动物伦理委员会审批(2020-103)。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、酵母粉、NaCl、琼脂粉、MH 培养基,OXOID 公司;氨苄青霉素(ampicillin, AMP)、硫酸卡那霉素(kanamycin, KAN),Biotopped 公司;头孢哌酮(cefoperazone, CFP),TargetMOI 公司;哌拉西林(piperacillin, PIP),Aladdin 公司;2 \times Taq Plus Master Mix,诺唯赞生物科技有限公司;质粒提取、胶回收、PCR 产物回收试剂盒,Qiagen 公司;蔗糖、 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -me),Aresco 公司;KNO₃,天津市天力化学试剂有限公司;革兰染色试剂盒,Solarbio 公司;双氧水(H₂O₂),武汉市中天化工有限责任公司;成套药敏片,杭州微生物试剂有限公司;血平板,广东环凯微生物科技有限公司。PCR 仪,Bio-Rad 公司;紫外-可见分光光度计,Gene 公司;厌氧培养箱,Don Whitley

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
Gene knockout		
<i>cyxA</i> -A	GTATGCGGCCGCTCAGACATTGGCATTCCCT	476
<i>cyxA</i> -B	AGATAACCTTCAGTGGCGGGCAGGACTCCACAACAAAAT	
<i>cyxA</i> -C	ATTTTGTTGTGGAGTCCTGCCCGCCACTGAAGGTTATCT	504
<i>cyxA</i> -D	GTATGCGGCCGCGAGCCAGTCAAACATGCCG	
<i>cyxA</i> -F	CAGTAGCGGCATTCTCTAG	375
<i>cyxA</i> -R	GAGCGAACTCTTTCAACGC	
Gene complementation		
C- <i>cyxA</i> -F	AGGGCCCAAATATCACCACCCAGAATAG	2 432
C- <i>cyxA</i> -R	ATGCGGCCGCGGTCAGCCAGTCAAACATGC	
Sequencing		
pKO3-Km-F	AATAAGCGGATGAATGGCAG	266
pKO3-Km-R	TCCCTCACTTTCTGGCTGG	
pGEM-T-easy-km-F	GCGAATTGGGCCCGACGTC	444
pGEM-T-easy-km-R	CGCAGCCGAACGACCGAG	

下划线表示限制性内切酶位点(GCGGCCGC: *Not* I; GGGCCC: *Apa* I)

Underlines indicate restriction enzyme sites (GCGGCCGC: *Not* I; GGGCCC: *Apa* I).

Scientific 公司; 恒温培养箱、气浴恒温振荡器, 常州时国旺仪器制造有限公司; 光学显微镜, 奥林巴斯公司。

1.1.4 培养基

LB 液体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0; LB 固体培养基: 在上述液体培养基中加入琼脂粉 16.0 g/L; LD 固体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 蔗糖 50.0, 琼脂粉 16.0; MH 固体培养基: MH 液体培养基加琼脂粉 16.0 g/L。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

肺炎克雷伯菌在含 100 µg/mL AMP 的 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min 培养过夜, 根据需要在添加 25 µg/mL Kan 的 LB 液体培养基中培养含有该抗性质粒(pGEM-*cyxA*)的菌株。*E. coli* DH5α 用来构建重组质粒, 培养条件取决于质粒的特性。转入 pKO3-km 和 pKO3-*cyxAud* 质粒的菌株需在 200 r/min、30 °C、Kan (25 µg/mL)

的 LB 液体培养基中进行培养。

1.2.2 重组质粒的构建

以肺克 K2044 基因组 DNA(即直接以菌体热解后暴露的 DNA)作为 PCR 反应的模板, 用引物对 *cyxA*-A/B 和 *cyxA*-C/D 进行 PCR 扩增, 回收后分别得到 *cyxA* 基因上游同源臂 AB 和下游同源臂 CD 片段。PCR 反应体系(20 µL): 细菌基因组 DNA 1.0 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 0.5 µL, 2×*Taq* Plus Master Mix 10.0 µL, ddH₂O 8.0 µL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。将纯化后的上、下游同源片段 AB/CD 1:1 (浓度比)混合作为模板进行融合 PCR, 然后使用限制性内切酶 *Not* I 进行酶切过夜后连接至自杀载体 pKO3-km, 即得到敲除质粒 pKO3-*cyxAud*。PCR 反应体系(50 µL): 同源片段 AB/CD (300 ng/µL) 各 1 µL, 引物 *cyxA*-A/D (10 µmol/L) 各 1 µL, 2×*Taq* Plus Master Mix 25 µL, ddH₂O 21 µL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 58 °C 40 s,

72 °C 5 min, 2 个循环; 94 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。为了构建回补质粒 pGEM-cyxA, 以野生株 WT 为模板, 扩增包含 *cyxA* 基因编码区及毗邻上、下游区域共 2 432 bp 的基因片段, 使用胶回收试剂盒进行纯化回收, 将基因片段克隆至质粒 pGEM-T-easy 上的 *Apa* I 和 *Not* I 两个酶切位点之间。PCR 反应体系(50 μ L): 细菌基因组 DNA 1.0 μ L, 引物 C-cyxA-F/R (10 μ mol/L)各 2.5 μ L, Q5 High-Fidelity 2 \times Master Mix 25.0 μ L, nuclease-free water 19.0 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 2 min。

1.2.3 *cyxA* 基因缺失突变株和回补株的构建

cyxA 基因敲除参考文献[22]的方法进行: 在菌株 NTUH-K2044 中电转入重组质粒 pKO3-*cyxAud*, 首先将验证正确的阳性单菌落通过 43 °C 培养, 筛选 pKO3-*cyxAud* 重组整合至染色体上的菌株, 接着将其转接入含有蔗糖的 LD 平板上进行二轮同源重组, 此步骤为反向筛选, 挑取 pKO3-*cyxAud* 从染色体上丢失的菌株, 即在含 KAN 平板上无法生长而在含 AMP 平板上生长的单菌落, 用引物 *cyxA*-A/D 扩增时, PCR 产物明显小于阳性对照(以野生株 K2044 为模板), 用内部引物对 *cyxA*-F/R 扩增时为阴性, 并将其 *cyxA*-A/D 扩增产物进行测序, 最终得到 *cyxA* 无痕突变体。将回补质粒 pGEM-*cyxA* 电转入 *cyxA* 突变体中, 获得回补株 C-*cyxA*。

1.2.4 生长曲线及革兰氏染色实验

生长曲线测定: 取甘油管保存的肺炎克雷伯菌按体积比 1:100 接入 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 16 h, 取菌液于 LB 平板上划线后, 在 37 °C 培养箱中倒置培养出单菌落备用, 挑取不同菌株(WT、 Δ *cyxA*、C-*cyxA*)单菌落接种于 3 mL LB 培养基中培养过夜, 调 OD_{600} 值

约 1.2 后取 10 μ L 接种至含有 20 mmol/L KNO₃ 的 1 mL LB 液体培养基中, 于 37 °C 厌氧培养箱静置培养, 同时接种于适量的新鲜 LB 液体中, 37 °C、200 r/min 振荡培养, 选取不同时间点(0、2、4、6、8、10、24 h)的培养物用紫外-可见分光光度计测 OD_{600} 值, 绘制厌氧及有氧条件下的生长曲线。

革兰氏染色实验: 取上述活化过夜的菌液调 OD_{600} 值约为 1.2 后, 按 1% (体积分数)接种量转接到 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 继续培养至对数中期(OD_{600} 值约 1.5), 取肺炎克雷伯菌 WT、 Δ *cyxA*、C-*cyxA* 对数中期菌液进行涂片固定, 然后结晶紫初染 1 min、碘液媒染 1 min、脱色液脱色 20–60 s、番红复染 1 min 进行染色, 最后将标本在空气中晾干后使用油镜观察细菌形态大小。

1.2.5 生物被膜及荚膜实验

生物被膜试管观察实验: 细菌培养如上所述, 取 OD_{600} 值约 1.2 的 WT 及 Δ *cyxA* 菌液转接至无菌试管中, 37 °C 静置培养 2 d 后分别观察两株菌的生物被膜合成情况。

荚膜拉丝实验: 分别挑取不同菌株(WT、 Δ *cyxA*)的对数期菌液在血平板上划线, 37 °C 倒置培养 16 h, 使用无菌枪头对单菌落进行拉丝并记录拉丝长度。评判标准: 细菌的平均拉丝长度超过 5 mm 为阳性。

1.2.6 外界环境抵抗实验

酸性环境: 挑取 WT、 Δ *cyxA*、C-*cyxA* 菌株 37 °C、200 r/min 培养约 16 h, 按 1% (体积分数)接种量转接到新鲜 LB 液体培养基 37 °C、200 r/min 继续培养细菌至对数期(OD_{600} 值约 1.5), 调 OD_{600} 值至 1.2, 然后按体积比 1:100 分别转接到 pH 5.5 的 LB 培养基和 pH 7.0 的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 2 h 取菌液进行系列稀释后各取 10 μ L 滴于含 100 μ g/mL AMP 的

LB 平板 37 °C 培养 12 h 后进行细菌计数, 计算生存率(生存率(%)=不同 pH 的培养基细菌数/pH 7.0 的培养基细菌数×100)。实验重复 3 次。

高渗环境:预培养同酸性环境试验, 将 WT、 $\Delta cyxA$ 菌液按 1% 接种量分别转接到含 1% NaCl 的常规 LB 培养基及 1.9% NaCl 的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 2 h 后取菌液进行系列稀释后各取 10 μ L 滴于含 100 μ g/mL AMP 的 LB 平板 37 °C 培养 12 h 后进行细菌计数, 计算生存率(生存率(%)=1.9% NaCl 的培养基细菌数/含有 1% NaCl 培养基细菌数×100)。实验重复 3 次。

氧化还原环境:预培养同酸性环境试验, 将 WT、 $\Delta cyxA$ 、C-*cyxA* 菌液按 1% (体积分数) 接种量分别转接到加及不加过氧化氢(2、4 mmol/L)和 β -巯基乙醇(10 mmol/L)的 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 培养 2 h, 取菌液进行系列稀释后各取 10 μ L 滴于含 100 μ g/mL AMP 的 LB 平板 37 °C 培养 12 h 后进行细菌计数, 计算生存率(生存率(%)=含有不同浓度的 H_2O_2 或 β -me 的培养基细菌数/不含有 H_2O_2 或 β -me 培养基细菌数×100)。实验重复 3 次。

1.2.7 抗生素敏感性实验

纸片扩散法:根据 2020 年美国临床实验室标准化委员会 CLSI 标准, 使用 MH 固体培养基对 32 种抗菌药物进行药敏试验, 37 °C 培养 1 d, 记录抑菌环直径。

微量肉汤稀释法:使用 96 孔板选取 8 种抗生素测定其最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 将培养过夜的细菌菌液按 1% (体积分数) 接种量转接入 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 继续培养至细菌对数生长期(OD_{600} 值约 1.5), 以菌量 5×10^5 CFU/mL 加入含不同浓度抗生素培养基的 96 孔板中, 使每孔抗生素的终浓度依次为: 2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 μ g/mL,

在 37 °C 静置培养 18 h 后, 肉眼观察每个孔中的细菌生长情况, 无细菌生长的最低浓度孔即为其 MIC。选取两菌株间有明显差异的抗生素, 将 37 °C 抗生素处理 2 h 前后的菌液系列稀释并取 10 μ L 滴于含 100 μ g/mL AMP 的 LB 平板进行细菌计数, 计算生存率(生存率(%)=加抗生素后的培养基细菌数/未加抗生素前的培养基细菌数×100)。实验重复 3 次。

1.2.8 动物感染实验

取活化过夜的菌液调 OD_{600} 值约为 1.2 后, 按 1% (体积分数) 接种量转接入 LB 液体培养基中, 继续培养至细菌对数生长期(OD_{600} 值约 1.5), 取 1 mL 菌液, 25 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 将菌体用 PBS 缓冲液洗涤后重悬, 调至浓度为 2×10^4 CFU/mL 备用。将 9 只 BALB/c 小鼠随机分为 2 组。WT 组(5 只): 50 μ L K2044 野生株(浓度为 1×10^3 CFU/mL)菌悬液滴鼻; *cyxA* 组(4 只): 50 μ L $\Delta cyxA$ (浓度为 1×10^3 CFU/mL)菌悬液滴鼻, 感染后每隔 1 d 观察小鼠生存状况。

1.2.9 统计分析

文中涉及的数据分析使用 Microsoft Excel 实行, 统计学分析方法包括非配对双尾 *t* 检验(two-tailed Student's *t* test)和 Kaplan-Meier 法(log-rank 和 Gehan-Breslow-Wilcoxon)。当 $P < 0.05$ 时表明具有显著差异。相关图表使用 GraphPad Prism 8 生成。

2 结果与分析

2.1 构建 *cyxA* 基因缺失突变株和回补株

为了探究 *cyxA* 基因在肺炎克雷伯菌中的功能, 采用同源重组的方法将肺炎克雷伯菌 NTUH-K2044 菌株染色体上 *cyxA* 的编码区(图 1A)进行敲除, 将所获得的 *cyxA* 无痕缺失株命名为 $\Delta cyxA$ 。在经过 2 次同源重组后, 通过菌落 PCR

初步验证,当用外部引物 *cyxA*-A/*cyxA*-D 扩增时,野生株 WT 产生一个 2 344 bp 的扩增子而敲除株 $\Delta cyxA$ 为 980 bp,两者相差 1 364 bp,正好是 *cyxA* 编码区的大小(图 1B);当用内部引物 *cyxA*-F/*cyxA*-R 扩增时,野生株 WT 产生一个 375 bp 的扩增子而敲除株未扩增出条带(图 1C)。随后通过 DNA 测序证实 *cyxA* 基因缺失株构建成功。将 *cyxA* 编码区、上游启动区及下游转录终止区均克隆至载体 pGEM-T-easy 构建回补质粒,将其电转进 $\Delta cyxA$ 得到 *cyxA* 基因回补株 C-*cyxA*,经菌落 PCR 验证回补株构建成功。

2.2 基因 *cyxA* 缺失后影响肺炎克雷伯菌体外有氧生长和细菌形态

比较菌株 WT、 $\Delta cyxA$ 及 C-*cyxA* 分别在厌氧及有氧条件下的生长情况,结果显示,在厌氧培养条件下,3 株菌总体生长趋势一致,说明 *cyxA* 基因缺失不影响肺炎克雷伯菌体外厌氧生长能力(图 2A);而在有氧条件下, $\Delta cyxA$ 对数期和稳

定期的生长趋势明显低于 WT,且将该基因回补后 C-*cyxA* 的生长得到一定的恢复(图 2B),同时取对数期菌液进行革兰氏染色,使用光学显微镜观察细菌形态,发现相较于 WT 及 C-*cyxA*, $\Delta cyxA$ 菌株中出现不同程度的长杆状细菌(图 2C),说明 *cyxA* 基因缺失影响肺炎克雷伯菌体外有氧生长及细菌形态。

2.3 基因 *cyxA* 缺失后不影响肺炎克雷伯菌生物被膜及荚膜的合成

荚膜和生物被膜是肺炎克雷伯菌的重要毒力因子,为了探究 *cyxA* 基因是否影响肺炎克雷伯菌生物被膜及荚膜的合成,静置试管 2 d,观察到菌株 WT 及 $\Delta cyxA$ 在 LB 液体培养基中都能形成明显可见的生物被膜,两者之间无差异(图 3A),说明 *cyxA* 基因不影响肺炎克雷伯菌生物被膜合成;细菌拉丝实验显示 WT 及 *cyxA* 基因缺失株的拉丝长度都超过 5 mm,即拉丝试验阳性(图 3B),说明 *cyxA* 基因不影响肺炎克雷伯菌荚膜合成。

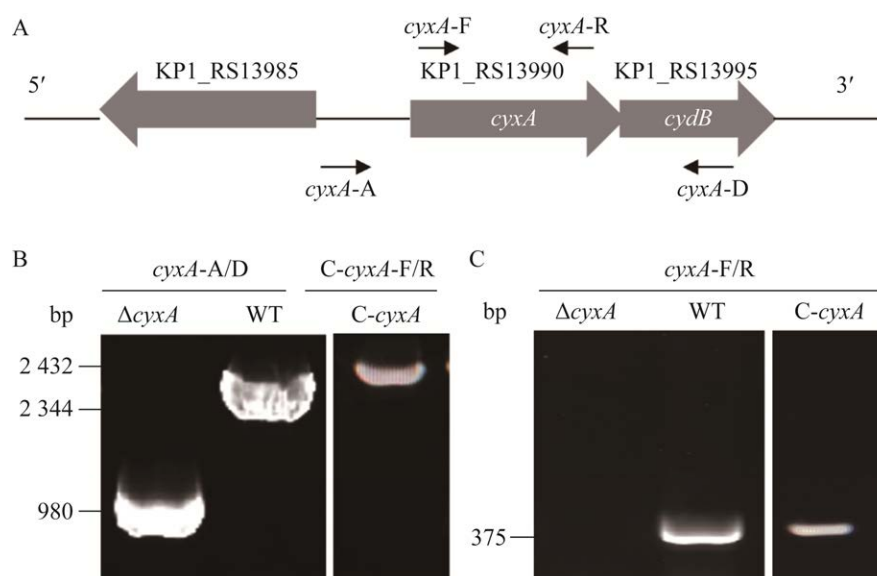


图 1 *cyxA* 基因缺失突变体的鉴定 A: *cyxA* 与两侧基因结构及引物位置示意图. B 和 C: *cyxA* 敲除株的 PCR 鉴定. B: 外部引物 *cyxA*-A/D 和 C-*cyxA*-F/R 的 PCR 结果; C: 内部引物 *cyxA*-F/R 的 PCR 结果

Figure 1 Identification of *cyxA* gene deletion mutant. A: Schematic view of structure of *cyxA* and flanking genes and primer positions. B and C: PCR identification of $\Delta cyxA$. B: The PCR results of external primers *cyxA*-A/D and C-*cyxA*-F/R; C: The PCR results of internal primers *cyxA*-F/R.

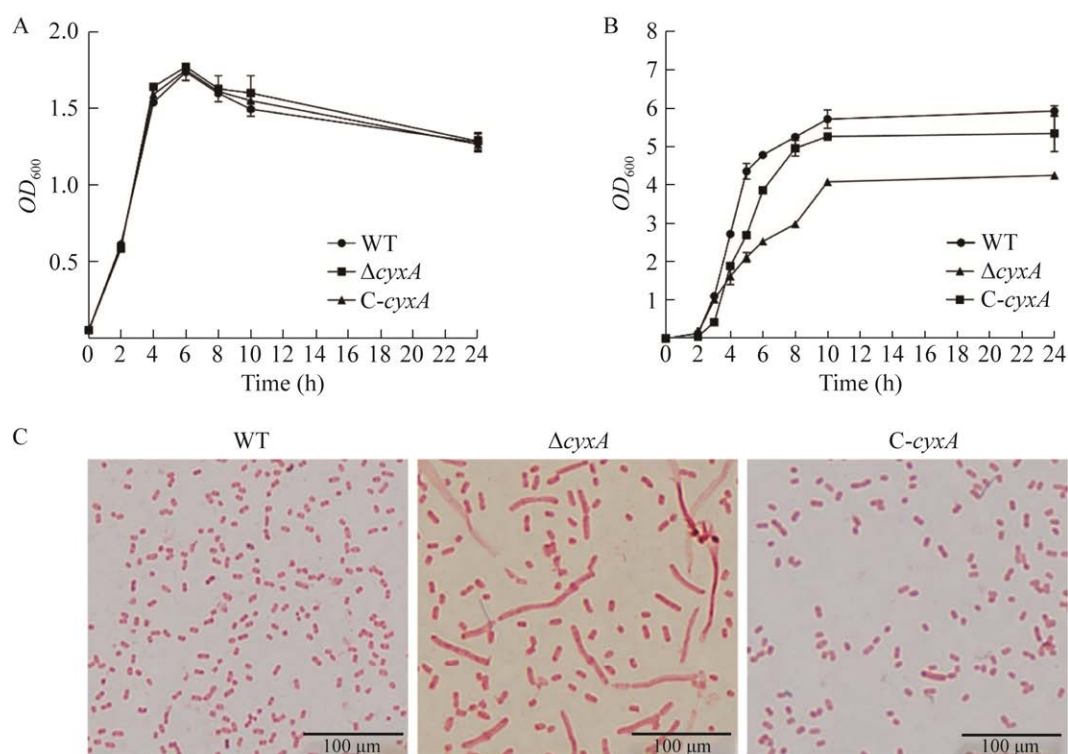


图2 *cyxA* 对肺炎生长及形态的影响 A: 菌株 WT、 $\Delta cyxA$ 和 C- $cyxA$ 的厌氧生长曲线. B: 有氧生长曲线. C: 革兰氏染色结果

Figure 2 The influence of *cyxA* gene to the growth and morphology of *Klebsiella pneumoniae*. A: The anaerobic growth curve of strains WT, $\Delta cyxA$ and C- $cyxA$. B: Aerobic growth curve. C: Gram staining.

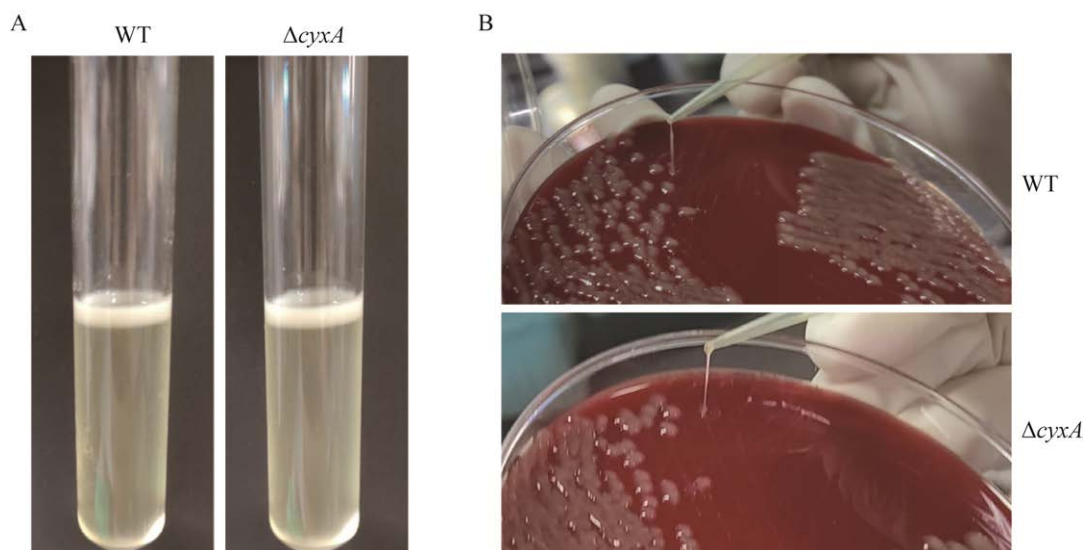


图3 菌株 WT、 $\Delta cyxA$ 的生物被膜形成(A)及荚膜拉丝实验(B)

Figure 3 The biofilm formation (A) and capsular synthesis (B) of strains WT and $\Delta cyxA$.

2.4 基因 *cyxA* 缺失后降低体外肺炎克雷伯菌对不同环境因素的抵抗力

细菌在感染宿主时会遇到一些恶劣环境,例如消化道酸性环境、肠道高渗环境及氧化应激环境等。有研究表明,大肠杆菌、鼠伤寒沙氏菌的末端氧化酶相关基因可以保护细菌免受不利环境的影响^[14-16],因此我们推测肺炎克雷伯菌中 *cyxA* 基因也可能发挥类似作用。

为了研究 *cyxA* 基因对肺炎克雷伯菌在体外适应不同环境的作用,先将 WT、 $\Delta cyxA$ 及 C-*cyxA* 菌株在 pH 7.0 及 pH 5.5 的 LB 液体培养基中培养 2 h,通过活菌计数计算生存率,结果发现 WT、 $\Delta cyxA$ 及 C-*cyxA* 菌株在 pH 5.5 的生存率分别降低至 95%、56%、89% (图 4A),且 WT 及 C-*cyxA*

菌株的生存率显著高于 $\Delta cyxA$ ($P < 0.01$),说明 *cyxA* 基因缺失降低肺炎克雷伯菌对酸性环境的抵抗力。接着将 WT、 $\Delta cyxA$ 分别在含有 1% 及 1.9% NaCl 的 LB 液体培养基中培养,体外模拟不同渗透压环境,结果发现在含有 1.9% NaCl 的高渗环境中,相较于 WT, $\Delta cyxA$ 菌株的生存率显著降低 (80.34% versus 65.30%, $P < 0.01$, 图 4B),说明 *cyxA* 基因缺失降低了肺炎克雷伯菌对高渗环境的抵抗力。此外,细菌进入宿主常会面临氧化还原胁迫,过氧化氢是一种强氧化剂, β -巯基乙醇是一种还原剂,将 WT、 $\Delta cyxA$ 及 C-*cyxA* 菌株使用不同浓度的 H_2O_2 进行处理后计算细菌存活率,发现在 2 mmol/L H_2O_2 的 LB 培养基中 $\Delta cyxA$ 菌株的存活率显著低于 WT (12.41% versus 2.89%,

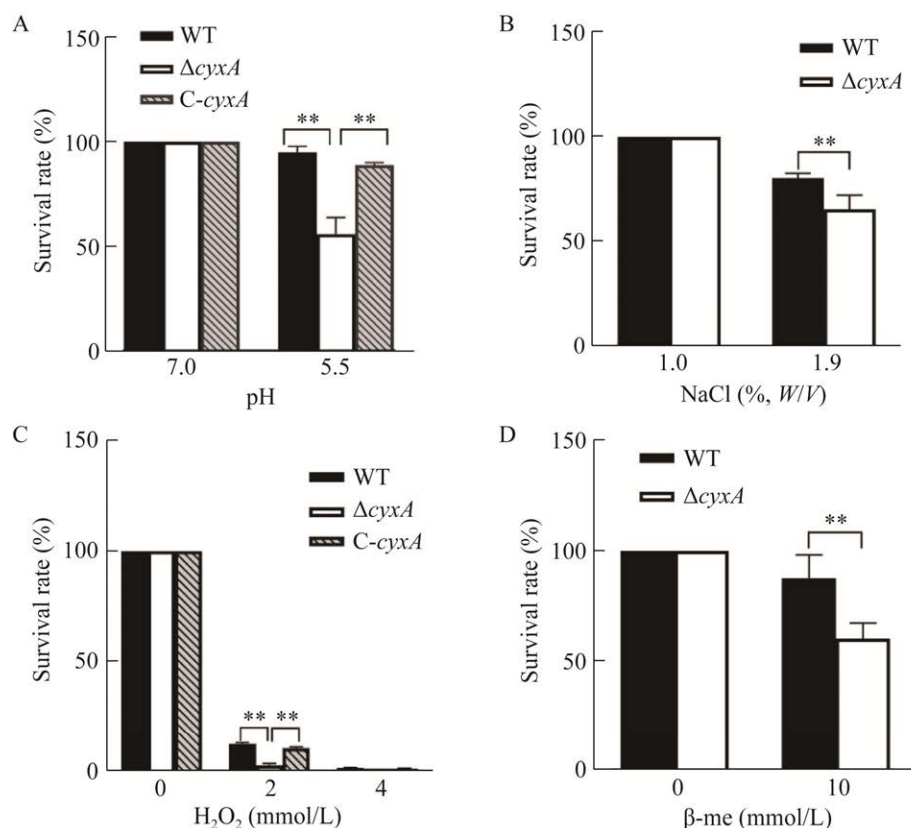


图 4 *cyxA* 对肺炎克雷伯菌不同环境抵抗力的影响 A: 酸性胁迫. B: 渗透胁迫. C: 氧化胁迫. D: 还原胁迫
Figure 4 The influence of *cyxA* gene to the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to different environments. A: Acid stress. B: Osmotic stress. C: Oxidative stress. D: Reductive stress. **: $P < 0.01$.

$P<0.01$), 当 H_2O_2 浓度增加至 4 mmol/L 时, 3 菌株几乎都不能存活(图 4C); 而在含 10 mmol/L β -me 的 LB 培养基中 $\Delta cyxA$ 菌株的存活率同样发生显著降低(87.5% versus 59.94%, $P<0.01$, 图 4D), 说明 *cyxA* 基因缺失也降低了肺克对氧化还原环境的抵抗力。

2.5 基因 *cyxA* 缺失后增加肺炎克雷伯菌对部分抗生素的敏感性

近年来, 多重耐药肺克尤其耐碳青霉烯类及产超广谱 β -内酰胺酶菌株日益增多, 给临床治疗带来极大困难^[2-6]。为了探究 *cyxA* 基因对肺克抗生素敏感性的影响, 通过纸片扩散法(K-B 法)筛选了 32 种抗生素对肺克 WT 及 $\Delta cyxA$ 菌株的杀菌作用, 发现相较于野生株 WT, 头孢哌酮及哌拉西林对 $\Delta cyxA$ 菌株的抑菌

环直径明显变大(图 5A、5B); 比较 2 种抗生素 2 h 处理下的生存率, 发现相较于 WT, $\Delta cyxA$ 菌株的生存率均降低(17.80% versus 3.16%, 0.36% versus 0.05%, 图 5C); 同时通过微量肉汤稀释法测定肺克 WT 及 $\Delta cyxA$ 菌株对头孢哌酮及哌拉西林在内的 8 种抗生素的 MIC, 结果同样发现, 与 WT 相比, 头孢哌酮、哌拉西林对 $\Delta cyxA$ 菌株的 MIC 值降低, 表明 *cyxA* 基因缺失后增加了肺克对头孢哌酮及哌拉西林 2 种常用 β -内酰胺类抗生素的敏感性。此外, 在庆大霉素、链霉素作用下, $\Delta cyxA$ 菌株的 MIC 值也降低至 WT 的一半, 而 C-*cyxA* 菌株恢复对这些抗生素的抵抗力(表 2), 综上表明 *cyxA* 基因降低了肺克对部分 β -内酰胺类及氨基糖苷类抗生素的敏感性。

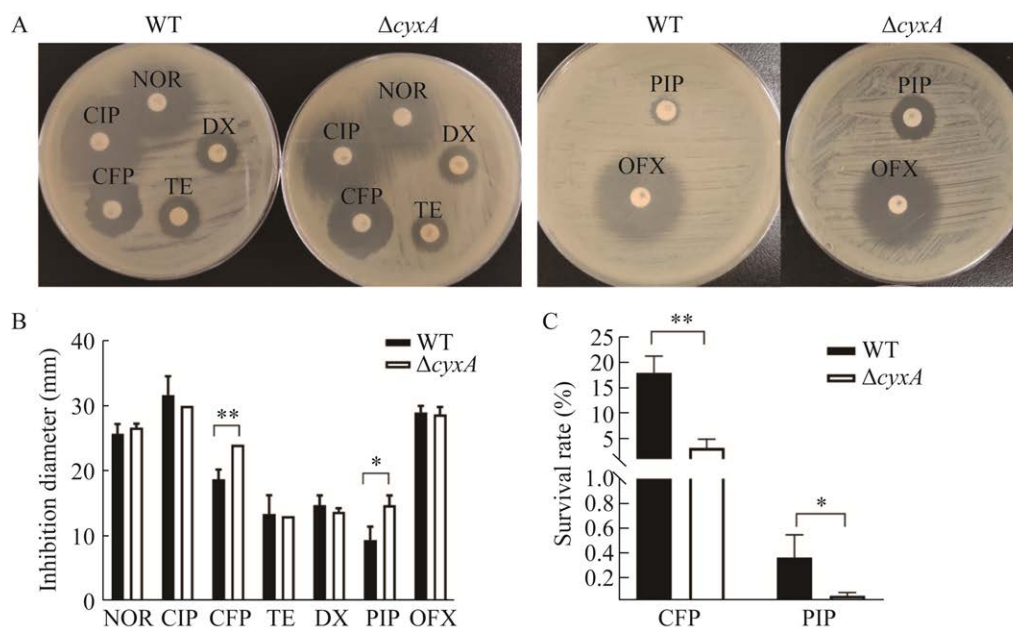


图 5 *cyxA* 对肺克不同抗生素敏感性的影响 A、B: WT 及 $\Delta cyxA$ 菌株纸片扩散法药敏试验结果. C: 生存率. NOR: 诺氟沙星; CIP: 环丙沙星; CFP: 头孢哌酮; TE: 四环素; DX: 双氯西林; PIP: 哌拉西林; OFX: 氧氟沙星; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

Figure 5 The influence of *cyxA* gene to the sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* to different antibiotics. A, B: Results of disk diffusion susceptibility test of strain WT and $\Delta cyxA$. C: Survival rate. NOR: Norfloxacin; CIP: Ciprofloxacin; CFP: Cefoperazone; TE: Tetracycline; DX: Dicloxacillin; PIP: Piperacillin; OFX: Ofloxacin; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

表 2 肺炎克雷伯菌 WT、 $\Delta cyx A$ 、C- $cyx A$ 对各种抗生素的 MIC 值

Table 2 MIC values of *Klebsiella pneumoniae* WT, $\Delta cyx A$ and C- $cyx A$ to various antibiotics

Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			Fold changes in MICs $\Delta cyx A/\text{WT}$
	WT	$\Delta cyx A$	C- $cyx A$	
Ceftazidime	1	1	1	1
Cefoperazone	>2 048	2 048	>2 048	<1
Piperacillin	>4 096	2 048	>4 096	<0.5
Gentamicin	16	8	16	0.5
Streptomycin	64	32	64	0.5
Tetracycline	16	16	16	1
Polymyxin B	8	8	8	1
Vancomycin	>2 048	>2 048	>2 048	1

2.6 基因 $cyx A$ 缺失后降低肺炎克雷伯菌的致病性

有研究发现在许多致病菌中, 细胞色素 bd 氧化酶可以增强它们的毒力^[16], 为了确定肺克 $cyx A$ 基因在体内感染中的作用, 我们通过滴鼻感染 BALB/c 小鼠, 记录感染后的存活情况。在 10^3 CFU/mL 浓度下, 野生株感染小鼠在 4 d 内全部死亡, 而 $cyx A$ 基因缺失株感染小鼠的 7 d 存活率达 50%, $cyx A$ 基因缺失株的存活率相对于野生株显著增加 ($P < 0.05$, 图 6), 说明 $cyx A$ 基因缺失株的致病性明显下降。

3 讨论与结论

细胞色素 bd 氧化酶目前只存在于细菌和古菌的电子传递链中, 帮助微生物在包括一氧化氮、铵、亚硝酸盐、硫化物、铬酸盐和氰化物等各种环境应激条件下生存, 可以直接分解过氧化氢和过氧亚硝酸盐, 有助于细菌抵抗这些由宿主抗感染免疫产生的活性氧和活性氮。此外, bd 氧化酶参与保护细菌免受抗生素诱导的应激。可能由于这些独特性质, bd 氧化酶增强不同病原菌的毒力^[16,23]。由于人和动物基因

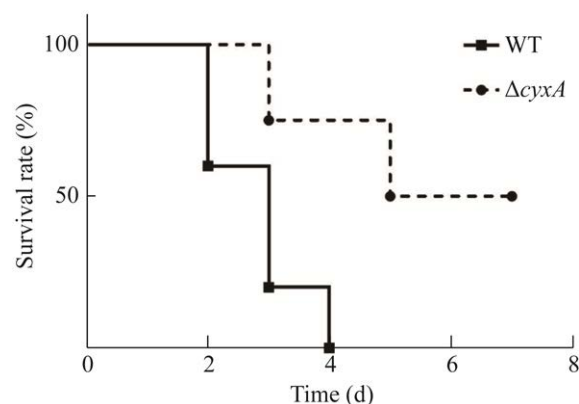


图 6 野生株 WT 和 $cyx A$ 基因缺失株滴鼻感染 BALB/c 小鼠的存活率 两组之间的存活率相比具有统计学差异 ($P < 0.05$)

Figure 6 Survival curves for the *Klebsiella pneumoniae* WT and $\Delta cyx A$ strains by intranasal infection. There was a significant difference in survival rate between the two groups ($P < 0.05$).

组不编码 bd 氧化酶, 其可以作为开发下一代抗菌药物的有吸引力和有前途的靶点。有些细菌含有 2 种不同的细胞色素 bd 氧化酶——bd-I 氧化酶 CydAB 和 bd-II 氧化酶 CyxAB, 其中关于 bd-II 氧化酶的研究较少^[16]。生物信息学分析发现肺克 K2044 菌株中同样存在 2 种 bd 氧化酶编码基因, $cyd A$ (KP1_RS7965)、 $cyd B$ (KP1_RS7970) 和 $cyx A$ (KP1_RS13990)、 $cyd B$ (KP1_RS13995), 且 bd 氧化酶对肺克的功能仍然未知。本研究构建了 $cyx A$ 无痕敲除株及回补株, 通过体内外实验发现, 末端氧化酶 Cyx A 不影响肺克生物被膜、荚膜合成, 但促进肺克有氧生长、增强该菌对酸性、高渗、氧化还原环境及抗生素的抵抗力, 从而增强肺克的致病性。

细胞色素 bd 氧化酶对不同致病菌生长的影响不尽相同。结核分枝杆菌和单增李斯特菌只有一种 bd 氧化酶, $cyd AB$ 缺失对结核分枝杆菌生长无显著影响^[24], 而单增李斯特菌 $\Delta cyd AB$ 缺失株表现出有氧生长缺陷^[19]。鼠伤寒沙门菌

和大肠杆菌均含有 2 种 bd 氧化酶, 鼠伤寒沙门菌 *cydA* 基因赋予其在 8% 氧浓度下生长的适应性优势而对 0.8% 氧浓度生长无影响, *cyxA* 基因为 0.8% 氧浓度下生长提供适应性优势而对 8% 氧浓度和厌氧条件下生长无影响^[21]; 大肠杆菌 *cydAB* 在微氧条件下表达量最高, bd-I 氧化酶除负责微氧呼吸还影响该菌有氧生长, bd-II 氧化酶缺陷突变体无明显有氧或厌氧生长缺陷, 被认为在极低氧水平下发挥功能^[15,25]。本研究证实 *cyxA* 基因缺失影响肺克有氧生长, 关于其对肺克微氧生长是否起作用有待进一步研究。同时发现 *cyxA* 敲除株菌体显著变长, 产生一些无隔多核的长丝体, 表明在染色体复制和分离之后、横隔形成之前细胞分裂被抑制, 这可能是 *cyxA* 敲除株生长缺陷的原因。铜绿假单胞菌末端氧化酶 *cioAB* 基因 (*cydAB* 同源基因) 突变也导致类似的细胞分裂缺陷^[26]。

细胞色素 bd 氧化酶还参与细菌对不同环境压力的响应。本研究发现 *cyxA* 基因缺失降低肺克对酸性环境的抵抗力。Cai 等发现结核分枝杆菌 $\Delta cydA$ 突变体对干扰素 γ 激活巨噬细胞形成吞噬溶酶体内的低 pH 非常敏感, 在 pH 值低至 4.5 的条件下无法维持最大耗氧量^[20]。*cyxA* 基因缺失也降低了肺克对 H_2O_2 的抵抗力。大肠杆菌 bd-I 氧化酶缺失突变体对 H_2O_2 暴露十分敏感, 且在外源 H_2O_2 存在时 bd-I 氧化酶表达增加^[27]。在尿路致病性大肠杆菌中, 缺乏 bd-I 或 bd-II 氧化酶的菌株在 1 mmol/L H_2O_2 处理后敏感性显著增加^[28]。bd 氧化酶的这种保护作用还存在于棕色固氮菌、布鲁氏菌、牙龈卟啉单胞菌、结核分枝杆菌和耻垢分枝杆菌中^[14]。此外, 据报道大肠杆菌 bd-I 氧化酶具有类过氧化氢酶和过氧化物酶活性^[14], 纯化 bd-II 氧化酶也具有很高的过氧化氢酶活性^[29], 可以直接代谢

H_2O_2 。肺克末端氧化酶 CyxA 是间接还是直接代谢 H_2O_2 而防御 H_2O_2 诱导的氧化损伤有待后续进一步研究。同时本研究发现 *cyxA* 基因缺失降低肺克对还原环境的抵抗力。大肠杆菌细胞色素 bd 缺陷突变体对还原剂 β -巯基乙醇的敏感性被认为是由于二硫键形成系统损伤^[30], 而鼠伤寒沙门菌 $\Delta cydABX$ 突变株对 β -巯基乙醇的敏感性与二硫键形成系统无关, 可能是由于 β -巯基乙醇介导的细胞色素 bd 损伤导致呼吸协同降低^[31], CyxA 对肺克 β -巯基乙醇抗性作用的具体机制需要更多实验证实。研究发现盐胁迫会导致植物和真菌内高浓度活性氧积累, 替代氧化酶有助于抵御渗透胁迫^[32]。本研究证实 *cyxA* 基因缺失降低肺克对高渗环境的抵抗力, 可能也是由于高盐增加了细菌胞内活性氧浓度, 目前尚未见细菌 bd 氧化酶参与渗透胁迫的相关报道。

有观点认为抗生素可以通过引发细菌胞内活性氧积累而杀菌^[33], bd 氧化酶对分枝杆菌抵抗氯法齐明、贝达喹啉和异烟肼的保护作用可能是由于其能清除或防止这些抗生素诱导产生活性氧^[16]。大肠杆菌 $\Delta cydAB$ 缺失株生物膜的细胞外膜通透性升高, 呼吸通量减少而阻碍质子介导的有毒化学物质排出, 因此增加了生物膜对 β -内酰胺类及氨基糖苷类抗生素的敏感性^[34]。本研究发现 *cyxA* 基因缺失增加肺克对部分 β -内酰胺类及氨基糖苷类抗生素敏感性, 与上述这些研究结果一致, 但具体分子机制仍需进一步探究。据报道, 由于末端氧化酶保护致病菌免受各种应激条件(酸性、氧化、抗生素等)的损伤, 因此促进了大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、结核分枝杆菌等多种致病菌的毒力, 增强其致病性^[14,16]。同样地, 本研究证实了末端氧化酶 CyxA 增强肺克的致病性。最近 Lee 等发现细胞色素 bd 氧

化酶抑制剂 ND-011992 与 bcc:aa₃ 氧化酶抑制剂 Q203 联用对不同复制和耐药非复制分枝杆菌临床分离株具有杀菌作用, 且在小鼠模型中相较于单一药物疗效提高^[35]。这一成果结合本研究结果, 提示未来开发针对肺克末端氧化酶的抑制剂是治疗肺克感染的一个十分有前景的途径, 特别是对于亟待解决的高耐药高毒力肺克感染的治疗具有深远意义, 值得深入探讨。

REFERENCES

- [1] GONZALEZ-FERRER S, PEÑALOZA HF, BUDNICK JA, BAIN WG, NORDSTROM HR, LEE JS, van TYNE D. Finding order in the chaos: outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis[J]. Infection and Immunity, 2021, 89(4): e00693-e00620.
- [2] HU YJ, ANES J, DEVINEAU S, FANNING S. *Klebsiella pneumoniae*: prevalence, reservoirs, antimicrobial resistance, pathogenicity, and infection: a hitherto unrecognized zoonotic bacterium[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(2): 63-84.
- [3] ZHU J, WANG T, CHEN L, DU H. Virulence factors in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 642484.
- [4] 蒋玉婷, 张珂, 刘唐娟, 黄莹莹, 温中薇, 孔晋亮, 陈一强. 高毒力肺炎克雷伯菌毒力和耐药机制研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(5): 473-480. JIANG YT, ZHANG K, LIU TJ, HUANG YY, WEN ZW, KONG JL, CHEN YQ. Research progress on virulence and drug resistance mechanism of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(5): 473-480 (in Chinese).
- [5] LAN P, JIANG Y, ZHOU JC, YU YS. A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2021, 25: 26-34.
- [6] TIAN DX, LIU X, CHEN WJ, ZHOU Y, HU DK, WANG WW, WU JZ, MU Q, JIANG XF. Prevalence of hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* under divergent evolutionary patterns[J]. Emerging Microbes & Infections, 2022, 11(1): 1936-1949.
- [7] WYRES KL, HOLT KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 2018, 45: 131-139.
- [8] CHOWDHURY R, SAHU GK, DAS J. Stress response in pathogenic bacteria[J]. Journal of Biosciences, 1996, 21(2): 149-160.
- [9] LIU D, CHEN ZF, YUAN Y, JING HM, ZOU JT, ZHANG XL, ZENG X, ZHANG WJ, ZOU QM, ZHANG JY. Innate immune effectors play essential roles in acute respiratory infection caused by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Immunology Research, 2020, 2020: 5291714.
- [10] OTTO NA, PEREVERZEVA L, LEOPOLD V, RAMIREZ-MORAL I, ROELOFS JJTH, van HEIJST JWJ, de VOS AF, van der POLL T. Hypoxia-inducible factor-1 α in macrophages, but not in neutrophils, is important for host defense during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumosepsis[J]. Mediators of Inflammation, 2021, 2021: 9958281.
- [11] KAUR CP, VADIVELU J, CHANDRAMATHI S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases[J]. Journal of Digestive Diseases, 2018, 19(5): 262-271.
- [12] WANG M, TIAN YJ, XU L, ZHANG FS, LU HG, LI MR, LI B. High osmotic stress increases OmpK36 expression through the regulation of KbvR to decrease the antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(3): e0050722.
- [13] GÖTZ F, MAYER S. Both terminal oxidases contribute to fitness and virulence during organ-specific *Staphylococcus aureus* colonization[J]. mBio, 2013, 4(6): e00976-e00913.
- [14] BORISOV VB, SILETSKY SA, NASTASI MR, FORTE E. ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2021, 10(6): 839.
- [15] CHANIN RB, WINTER MG, SPIGA L, HUGHES ER, ZHU WH, TAYLOR SJ, ARENALES A, GILLIS CC, BÜTTNER L, JIMENEZ AG, SMOOT MP, SANTOS RL, WINTER SE. Epithelial-derived reactive oxygen species enable AppBCX-mediated aerobic respiration of *Escherichia coli* during intestinal inflammation[J]. Cell Host & Microbe, 2020, 28(6): 780-788.e5.
- [16] 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.
- [17] FORTE E, BORISOV VB, VICENTE JB, GIUFFRÈ A. Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2017, 71: 171-234.
- [18] BEEBOUT CJ, ROBERTSON GL, REINFELD BI, BLEE AM, MORALES GH, BRANNON JR, CHAZIN WJ, RATHMELL WK, RATHMELL JC, GAMA V, HADJIFRANGISKOU M. Uropathogenic *Escherichia coli* subverts mitochondrial metabolism to enable intracellular bacterial pathogenesis in urinary tract infection[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(9): 1348-1360.
- [19] CORBETT D, GOLDRICK M, FERNANDES VE, DAVIDGE K, POOLE RK, ANDREW PW, CAVET J, ROBERTS IS. *Listeria monocytogenes* has both cytochrome *bd*-type and cytochrome *aa₃*-type terminal oxidases, which allow growth at different oxygen levels, and both are important in infection[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(11): e00354-e00317.
- [20] CAI Y, JAECKLEIN E, MACKENZIE JS, PAPAIVINASASUNDARAM K, OLIVE AJ, CHEN XC, STEYN AJC, SASSETTI CM. Host immunity increases *Mycobacterium tuberculosis* reliance on cytochrome *bd* oxidase[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(7): e1008911.
- [21] RIVERA-CHÁVEZ F, ZHANG LF, FABER F, LOPEZ CA, BYNDLOSS MX, OLSAN EE, XU GG, VELAZQUEZ EM, LEBRILLA CB, WINTER SE, BÄUMLER AJ. Depletion of butyrate-producing clostridia from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of *Salmonella*[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(4): 443-454.
- [22] 王慧, 卢慧改, 徐丽, 王萌, 张福升, 田玉姣, 李蓓, 李默然. 钼酸盐转运体 ModABC 促进肺炎克雷伯菌肌肉感染及其治疗新思路[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2784-2800.
- WANG H, LU HG, XU L, WANG M, ZHANG FS, TIAN YJ, LI B, LI MR. Molybdate transporter ModABC contributes to *Klebsiella pneumoniae* muscle infection and new insight into its treatment[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2784-2800 (in Chinese).
- [23] FRIEDRICH T, WOHLWEND D, BORISOV VB. Recent advances in structural studies of cytochrome *bd* and its potential application as a drug target[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(6): 3166.
- [24] KALIA NP, HASENOEHRL EJ, AB RAHMAN NB, KOH VH, ANG MLT, SAJORDA DR, HARDS K, GRÜBER G, ALONSO S, COOK GM, BERNEY M, PETHE K. Exploiting the synthetic lethality between terminal respiratory oxidases to kill *Mycobacterium tuberculosis* and clear host infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(28): 7426-7431.
- [25] STEINSIEK S, STAGGE S, BETTENBROCK K. Analysis of *Escherichia coli* mutants with a linear respiratory chain[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87307.
- [26] TAVANKAR GR, MOSSIALOS D, WILLIAMS HD. Mutation or overexpression of a terminal oxidase leads to a cell division defect and multiple antibiotic sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(7): 4524-4530.
- [27] LINDQVIST A, MEMBRILLO-HERNÁNDEZ J, POOLE RK, COOK GM. Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 78(1): 23-31.
- [28] BEEBOUT CJ, EBERLY AR, WERBY SH, REASONER SA, BRANNON JR, DE S, FITZGERALD MJ, HUGGINS MM, CLAYTON DB, CEGELSKI L, HADJIFRANGISKOU M. Respiratory heterogeneity shapes biofilm formation and host colonization in uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e02400-e02418.
- [29] FORTE E, NASTASI MR, BORISOV VB. Preparations of terminal oxidase cytochrome *bd*-II isolated from *Escherichia coli* reveal significant hydrogen peroxide scavenging activity[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2022, 87(8): 720-730.
- [30] van ORSDEL CE, BHATT S, ALLEN RJ, BRENNER EP, HOBSON JJ, JAMIL A, HAYNES BM, GENSON AM, HEMM MR. The *Escherichia coli* CydX protein is a member of the CydAB cytochrome *bd* oxidase complex and is required for cytochrome *bd* oxidase activity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(16): 3640-3650.
- [31] DUC KM, KANG BG, LEE C, PARK HJ, PARK YM, JOUNG YH, BANG IS. The small protein CydX is required for cytochrome *bd* quinol oxidase stability and function in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: a

- phenotypic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(2): e00348-e00319.
- [32] ROGOV AG, ZVYAGILSKAYA RA. Physiological role of alternative oxidase (from yeasts to plants)[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80(4): 400-407.
- [33] 刘聪, 冯佳妮, 李玮玮, 朱伟伟, 薛云新, 王岱, 赵西林. 细菌整体代谢与新抗生素及抗生素增效剂靶标[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(4): 313-320.
- LIU C, FENG JN, LI WW, ZHU WW, XUE YX, WANG D, ZHAO XL. Intact metabolism of bacteria and targets of new antibiotics and antibiotic synergism[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2022, 47(4): 313-320 (in Chinese).
- [34] BEEBOUT CJ, SOMINSKY LA, EBERLY AR, van HORN GT, HADJIFRANGISKOU M. Cytochrome *bd* promotes *Escherichia coli* biofilm antibiotic tolerance by regulating accumulation of noxious chemicals[J]. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2021, 7: 35.
- [35] LEE BS, HARDS K, ENGELHART CA, HASENOEHRL EJ, KALIA NP, MACKENZIE JS, SVIRIAEVA E, CHONG SMS, MANIMEKALAI MSS, KOH VH, CHAN J, XU JY, ALONSO S, MILLER MJ, STEYN AJC, GRÜBER G, SCHNAPPINGER D, BERNEY M, COOK GM, MORASKI GC, PETHE K. Dual inhibition of the terminal oxidases eradicates antibiotic-tolerant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2021, 13(1): e13207.