

ROS 在细菌耐药及抗生素杀菌中的作用机制

马丽娜¹, 米宏霏^{1,2}, 薛云新¹, 王岱¹, 赵西林¹

1. 厦门大学公共卫生学院, 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 厦门 361102;
2. 福建医科大学公共卫生学院, 福州 350108

摘要: 抗生素的不合理使用甚至滥用, 使得细菌耐药性问题日趋严重。如何解决这一难题是人类目前面临的一项巨大挑战。除开发新型抗菌药物之外, 寻找新的方法以增强现有抗生素的杀菌效果也是一种切实可行的策略。近期的研究发现活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)在细菌耐药及抗生素杀菌方面均发挥重要作用。非致死浓度的抗生素作用下产生的 ROS 会通过影响 MarR(Multiple antibiotic resistance repressor)-MarA (Multiple antibiotic resistance activator)激活药物外排泵, 通过 SoxR(Superoxide response transcriptional regulator)-SoxS(Superoxide response transcription factor)途径启动细菌应激保护机制以及通过促进 SOS DNA 损伤修复系统诱导耐药突变, 从而促成抗生素耐药与耐受的形。而致死浓度的抗生素作用产生的 ROS 则会参与抗生素杀菌并减少耐药菌产生。除与抗生素浓度有关外, ROS 参与细菌耐药与抗生素杀菌过程还会受到一系列遗传调控因子(如 MazEF、Cpx、SoxR 和 MarRAB)的影响, 因此存在一定复杂性。本文综述了 ROS 在细菌耐药与抗生素杀菌方面的作用机制, 以期寻找新的方法以增强现有抗生素杀菌效果, 解决抗生素耐药问题提供一定的借鉴和指导。

关键词: 活性氧簇; 杀菌; 耐药; 遗传调控

The mechanism of ROS regulation of antibiotic resistance and antimicrobial lethality

Lina Ma¹, Hongfei Mi^{1,2}, Yunxin Xue¹, Dai Wang¹, Xilin Zhao¹

1. State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China;
2. School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China

Abstract: Misuse and overuse of antibiotics have led to serious resistance problems that pose a grave threat to human health. How to solve the increasing antibiotic resistance problem is a huge challenge. Besides the traditional strategy of developing novel antimicrobial agents, exploring ways to enhance the lethal activity of antibiotics currently available is another feasible approach to fight against resistance. Recent studies showed that ROS plays an important role in regulat-

收稿日期: 2016-05-03; 修回日期: 2016-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81473251, 81301474, 31370166)和福建省自然科学基金项目(编号: 2014J01139, 2015J01345)资助
[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81473251, 81301474, 31370166) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (Nos. 2014J01139, 2015J01345)]

作者简介: 马丽娜, 硕士研究生, 专业方向: 流行病与卫生统计学。E-mail: malina3@163.com

通讯作者: 赵西林, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗感染药物及其作用机理。E-mail: zhaox5@xmu.edu.cn

王岱, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 病原微生物及感染性疾病。E-mail: daiwang@xmu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yezz.16-157

网络出版时间: 2016/7/14 15:51:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160714.1551.004.html>

ing both antibiotic resistance and antimicrobial lethality. ROS produced by sublethal levels of antibiotic induces antibiotic resistance through activating drug efflux pumps *via* MarR(Multiple antibiotic resistance repressor)-MarA(Multiple antibiotic resistance activator), triggers the protective function against stress *via* SoxR (Superoxide response transcriptional regulator)-SoxS (Superoxide response transcription factor), and promotes mutagenesis by induction of SOS system. On the contrary, ROS triggered by lethal levels of antibiotic promotes bacterial killing and suppresses resistance. In addition to the concentration of antibiotic, the role of ROS in mediating antimicrobial resistance and bacterial killing is also regulated by a series of genetic regulators (e.g. MazEF, Cpx, SoxR, MarRAB). Thus, how ROS contribute to antimicrobial resistance and bacterial killing is complex. In this review, we summarized the mechanism of ROS in regulating antibiotic resistance and antimicrobial lethality, which may provide references and guidance for finding new ways to enhance antimicrobial lethality of currently available antimicrobials and battling antibiotic resistance.

Keywords: ROS; bactericidal; resistance; genetic regulation

抗生素的发现是人类医学史上一个重要的里程碑,它的出现使细菌感染性疾病得到了有效的控制。自 1929 年发现青霉素后,越来越多不同种类的抗生素相继被发现并广泛使用。但由于细菌本身存在的繁殖优势,易使其对相应的生存压力产生耐药性或耐受性,加之人们对于抗生素的不合理使用甚至滥用,进一步加剧了致病菌抗(耐)药性的形成^[1,2],尤其是“超级细菌”的出现使得人们甚至面临着无药可用的困境。目前主要通过以下几种办法解决耐药这一难题:研发新型药物,限制抗生素的使用,寻找新的方法以增强现有的抗生素杀菌效果等。持续开发新型药物已经变得越来越困难^[2],限制抗生素的使用虽取得一定成效^[3~5],但并不能从根本上解决问题^[6],因此寻找新的方法以增强现有抗生素的杀菌效果^[7,8]在当前的研究中颇具前景。

活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)作为细胞能量代谢的副产物,在许多生理和病理过程中扮演重要角色。近年的研究发现,非致死浓度的抗生素介导积累的 ROS 可通过诱导 MarA(Multiple antibiotic resistance activator)、SoxS(Superoxide response, transcription factor)提高细菌耐药、耐受性的产生^[9,10],同时不同种类的抗生素不仅可以通过各自特异的作用机制杀菌,也可通过抗生素杀菌共有通路产生 ROS 参与抗生素杀菌,减少细菌数目,降低细菌耐药的产生^[11]。因此可以说 ROS 在细菌耐药及抗生素杀菌方面均发挥重要作用。本文对 ROS 参与细菌耐药及抗生素杀菌等方面的研究进展进行了综述,以期对解决细菌耐药性问题提供新的思路 and 参考。

1 ROS 的产生与清除

1.1 ROS 的产生

ROS 是一类含氧活性分子的总称,主要有 3 种类型:超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$),过氧化氢(H_2O_2)以及羟自由基($\cdot OH$)。广义上,ROS 还包括次氯酸盐($HOCl$)、过氧亚硝酸盐($ONOO^-$)、一氧化氮(NO)等^[12,13]。细菌体内有氧呼吸代谢过程会自然产生少量 ROS,在外源环境(如抗生素、紫外线、电离辐射或热刺激)的刺激下则会产生过多 ROS。已有研究表明 ROS 不仅参与抗生素杀菌,而且还可诱导基因突变形成^[14],这些突变基因有可能是产生抗生素耐药的重要因素^[9],因此清楚了解 ROS 产生的具体过程及其在胞内的作用机制显得尤为重要。

ROS 是生物有氧能量代谢中生成的副产物。在细菌内稳态代谢状态下,环境中的氧分子极易扩散到微生物中,与一系列生物分子产生反应。其中最重要反应为氧分子与黄素酶(Flavoenzymes)的相互作用,这一过程可以产生超氧化物和过氧化氢^[15]。研究发现呼吸链也可以产生超氧化物^[16],却不能直接产生过氧化氢^[17]。当在抗生素作用下,细菌胞内呼吸增强,则产生更多的 ROS^[18]。总的来说,胞内 ROS 的产生是在有氧条件下,氧分子通过持续的单电子传递生成超氧化物,过氧化氢以及有剧烈毒性的羟自由基的过程。

1.2 ROS 的清除

为应对 ROS 对细胞造成的损伤,生物体内也进化出一套自我保护机制。除体内存在的维生素 C、维生素 E 以及谷胱甘肽等抗氧化剂起到抗氧化作用

外^[19,20], 细胞内还存在许多抗氧化酶保护细胞免受 ROS 的损伤。例如, 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutases, SOD)可以分解超氧化物生成过氧化氢和氧($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$)。而过氧化氢又可在过氧化氢酶或过氧化物酶(Catalase/Peroxidase)作用下催化分解产生水和氧气($2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$)。值得注意的是, 在这一过程中, 相比过氧化氢酶, 过氧化物酶对过氧化氢具有更高的亲和性, 能够催化分解极微量的过氧化氢^[21]。因此细菌在未受到外界压力情况下, ROS 的产生与清除处于动态平衡, 不会对细胞造成较大损伤。

而当细菌在抗生素作用下产生的 ROS 过量积累时, 过氧化氢则会通过 Fenton 反应产生羟自由基($Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$)。大量产生的羟自由基具有剧烈毒性, 且目前尚未发现有相应的酶系统可以清除羟自由基。因此相对于超氧化物和过氧化氢, 羟自由基会对细胞造成巨大损伤, 使得 DNA 断裂、蛋白羰基化、脂质过氧化等, 而这些损伤最终则会引起细胞死亡^[22]。

2 ROS 与抗生素耐药

2.1 ROS 诱导 MarA、SoxS 参与抗生素耐药

造成细菌对抗生素耐药的机制有很多^[23], 获得性耐药大都通过基因突变或质粒介导, 其中抗生素处理造成的多重耐药多与外排泵(如 AcrAB-TolC^[24])有关。MarA 作为一种转录激活蛋白, 一方面通过激活 *acrAB* 和 *tolC* 基因(二者合成的 AcrAB-TolC 为大肠杆菌最主要的多重药物外排泵)的表达, 将药物排出; 另一方面也通过激活 MicF(一种反义 RNA)进而影响 *ompF*(编码的 OmpF 是大肠杆菌主要膜通道蛋白)的表达, 降低药物的摄入, 从而对多种抗生素产生耐药^[10]。例如研究已证实 *marA* 基因表达水平的上升与氟喹诺酮耐药水平升高有关^[25]。

SoxS 具有与 MarA 相似的功能^[26]。除具有调控抗生素多重耐药功能外, 作为超氧化物的感应物^[27,28], MarA 和 SoxS 也具有抗氧化胁迫的功能^[29~31]。因此 ROS 水平的升高可通过影响 MarA、SoxS 诱导启动 SoxRS-MarRAB-AcrAB 外排泵, 激活多重药物外排泵(AcrAB-TolC)使得药物外排从而促进细菌产生耐药。另外 ROS 激活 SoxS 后, SoxS 还可以上调一系列具有保护功能的基因表达, 帮助细菌逃避抗生素

杀伤, 从而使存活下来的细菌有更多机会产生耐药。例如研究发现 SoxS 可以激活应激保护机制, 使得超氧化物除具有杀伤作用外还可诱导保护作用^[32]。

2.2 药物浓度与 ROS 参与抗生素耐药的关联

近年来的研究发现非致死浓度的抗生素介导积累的 ROS 能够诱发基因突变^[9], 如 ROS 所产生的 8-oxo-guanine 即是公认的诱变剂^[33]。ROS 攻击 DNA 产生的损伤也可以诱导 SOS 系统, 使用容易出错的 DNA 聚合酶进行损伤修复, 从而提高细菌突变频率。通过检测胞内 ROS 水平, 以及在厌氧情况下实验研究, 证实非致死浓度的抗生素处理能够提高突变频率、促进耐药产生, 并且产生的多重耐药菌与抗生素诱导产生的 ROS 有关^[9]。

对于致死浓度的抗生素药物而言, 其能通过抗生素杀菌共有通路产生 ROS 参与并促进抗生素杀菌, 进而降低细菌数目, 减少产生耐药菌机会。最近研究发现当向抗生素中加入抗氧化剂(降低 ROS 至非致死水平)时, 抗氧化剂提高了细菌的存活率与耐药性^[34]。这一结果也再次证明 ROS 降低至非致死水平时无法参与杀菌但能够诱导产生耐药突变。

3 ROS 与抗生素杀菌

3.1 ROS 作为抗生素杀菌的共有通路

长期以来人们一直认为不同种类的抗生素通过结合不同的作用靶点和各异的作用机制发挥杀菌作用。如 β -内酰胺类抗生素在成熟的肽聚糖链上通过与青霉素结合蛋白(Penicillin-binding proteins, PBPs)的结合抑制转肽作用, 使得肽聚糖合成减少, 自溶素水平升高, 促进细胞溶解和死亡^[35,36]; 氨基糖苷类抗生素结合到核糖体 30S 亚基特定位点上, 造成延伸中的肽链上错误插入氨基酸, 使得蛋白发生错译以及错误折叠^[37]; 喹诺酮类抗生素则通过与细菌两种 IIA 型拓扑异构酶的结合干扰 DNA 超螺旋结构, 造成 DNA 双链断裂, 并通过依赖新蛋白合成或不依赖新蛋白合成途径造成细菌死亡^[38]。直到 2007 年, Collins 团队提出不同种类的抗生素可能通过激活呼吸链电子传递, 诱导大量的 ROS 积累进而参与杀菌, 并证实这一过程中, 三羧酸循环(TCA)、NADH 的氧化、铁硫簇(Fe-S cluster)的破坏以及 Fenton 反应均涉及羟自由基的产生与杀菌^[11](图 1)。

其研究发现: (1)使用荧光染料 HPF(3'-(p-Hy-

droxyphenyl) fluorescein)检测胞内羟自由基水平,发现在杀菌类抗生素(如诺氟沙星,氨苄西林,卡那霉素)作用下有大量的羟自由基产生,而在抑菌类抗生素处理下未观测到类似结果^[11]; (2)使用硫脲(ROS中和剂)或者联吡啶(游离铁螯合剂)与杀菌类抗生素共同作用时,检测到羟自由基减少且细菌的生存率提高; (3)在厌氧条件下部分喹诺酮类抗生素的杀菌效果下降^[39,40]。基于上述研究结果, Collins 团队提出抗生素作用下胞内 ROS 大量积累并参与抗生素杀菌。

进一步的研究发现: (1)当敲除编码过氧化氢酶/过氧化物酶的基因后,三类抗生素杀菌效果都得到增强^[41]; (2)在氨苄西林和卡那霉素杀菌过程中发现

有 DNA 修复基因参与(ROS 会介导 DNA 损伤)^[33]; (3)产生 ROS 的遗传调控途径中的成分会影响抗生素杀菌^[42~46]。这些研究结果从不同角度补充证实了致死浓度的抗生素能够产生 ROS 并促进抗生素杀菌,进一步验证了 Collins 团队的理论。这也能解释为何在抗生素作用于细菌时能够检测到氧化应激压力^[47,48],为何某些抗生素引起的杀伤与初始损伤不同^[33,49]。

然而, ROS 在抗生素杀菌过程中所扮演的角色并非那样简单。根据抗生素处理条件的差异, ROS 可能会发挥不同作用:具体来讲就是 ROS 在低抗生

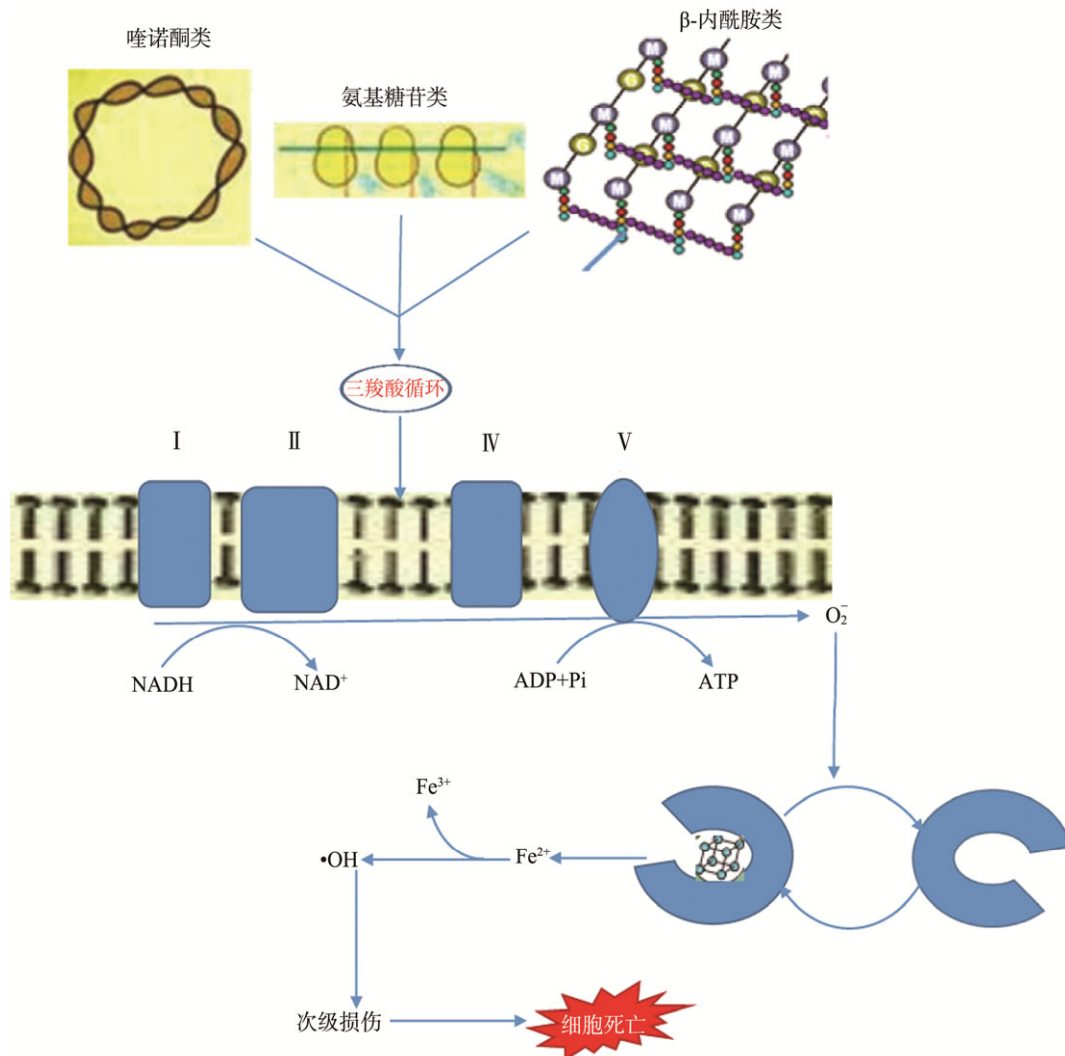


图 1 杀菌类抗生素的共有杀菌通路

Fig. 1 Model for a common mechanism of killing by bactericidal antibiotics

素浓度下起到保护作用,而在高抗生素浓度下则帮助杀菌^[50]。并且 ROS 参与抗生素杀菌也与抗生素的种类有关,如某些喹诺酮杀菌完全依赖于 ROS,有些则不依赖于 ROS^[39,51]。

3.2 对 ROS 杀菌共有通路的质疑及原因分析

由于 ROS 介导抗生素杀菌存在一定的复杂性,因此一些研究对此提出质疑。首先 Collins 团队提出的 ROS 杀菌共有途径,是基于抗生素压力下 ROS 在胞内的过量积累。但 Liu 等^[52]通过实验测定表明,抗生素处理后细菌的耗氧量并没有升高反而降低,并且细菌受到抗生素压力时胞内 H_2O_2 的含量也没有升高。Liu 等的研究还发现氨基糖苷类、诺氟沙星的杀菌结果在有氧或厌氧条件下均并无明显差异。与此同时, Keren 等^[53]对荧光染料 HPF 检测活性氧特异性提出质疑。首先,与有氧条件相比,在厌氧条件下,经抗生素处理后细菌胞内的 HPF 荧光值也会发生相应变化。其次,HPF 除了能够被羟自由基氧化外还能被其它物质氧化,如辣根过氧化酶、铁氰化物等。由此认为,荧光染料 HPF 作为表征胞内活性氧的指标,其特异性不够理想。另外, Ezraty 等^[54]对铁硫簇进行研究,发现铁硫簇的形成仅对氨基糖苷类抗生素杀菌有影响,并且其在杀菌作用方面所起作用主要与药物吸收有关,而非通过 ROS 共有途径。基于以上的研究结果,有些研究者认为 ROS 参与抗生素杀菌这一理论仍有待商榷。

针对以上分歧,我们推测可能存在以下原因:首先需区分初级损伤与由初级损伤引起的细胞内的反应(如 ROS 积累和次级损伤)。二者都会造成细胞死亡,因此需要将这二者造成的细胞死亡区分开。药物的吸收、外排以及靶点相互作用会影响初级损伤的形成,而且也会显著改变细菌对于药物的敏感度。因此杀菌实验时须使药物浓度标准化,即使用相同倍数的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。其次药物浓度和杀菌时间对杀菌结果会有很大的影响。如若仅使用单一药物浓度或者特定时间,可能会遗漏或忽视 ROS 介导的效果。例如厌氧环境对于低浓度的诺氟沙星杀菌有抑制作用,但却不会抑制其高浓度杀菌^[39]。而且高浓度、长时间的杀菌会杀死绝大多数细菌,仅余下低代谢水

平的持留菌^[55],无法体现出 ROS 杀菌效果。另外,细菌中存在的程序性死亡(Programmed cell death, PCD)也可能对结果造成干扰。实验已证实抗生素压力移除后仍存在由 ROS 介导 PCD 造成的细菌死亡^[44]。因此需要更准确的方法来确认细菌死亡与羟自由基积累的直接关系。

至于检测胞内 ROS 所用染料的特异性,Hempel 等^[56]的研究发现,相比于其它染料,近年研究大量应用的荧光染料 carboxy- H_2 DCFDA 用于指示 ROS 的特异性较好。Dwyer 等^[57]使用 7 种不同检测 ROS 的染料(包含了 carboxy- H_2 DCFDA)证实在致死浓度下诺氟沙星、氨基糖苷类以及庆大霉素均能够产生大量的 ROS。Lobritz 等^[18]后续的实验也解释了 Liu 等针对抗生素刺激后耗氧量以及 H_2O_2 生成量没有增加的质疑。

通过上述分析,我们可以明确抗生素作用时会产生 ROS 并参与抗生素杀菌,但这一过程存在一定的复杂性。有些抗生素杀菌仅依赖于初级损伤^[51],并且 ROS 参与抗生素杀菌与浓度以及作用时间有很大关联^[50]。因此为观察 ROS 参与抗生素杀菌应先对抗生素的浓度和作用时间进行摸索^[58]。

4 抗生素压力产生 ROS 的遗传调控

在抗生素作用下,ROS 的产生受压力反应调节。当细菌受到不同种类的抗生素压力刺激时,会产生特异的初级损伤,随后激活毒素-抗毒素系统(即 TA 模型,如 MazEF)。毒素蛋白 MazF 既能够降低 *katG* 基因表达增加羟自由基的产生,也会造成许多 mRNA 的断裂,进而产生错误折叠的短肽。有些错误折叠的短肽结合到细胞膜上时会激活 Cpx 膜蛋白压力系统^[42]。Cpx 一方面上调 YihE 蛋白的表达,降低 MazF 毒力^[44],另一方面 Cpx 的活化以及膜组分的紊乱会激活 Arc 氧化还原感应系统,通过干扰电子转移复合物(如细胞色素氧化酶)提高 ROS 水平(图 2)。ROS 在低抗生素浓度下起到保护作用,而在高抗生素浓度下则具有杀菌作用。因此推测在压力调节 ROS 产生过程中存在发挥双向调控作用的因子,目前已发现的双向调控因子有超氧化物和 Cpx 等^[50]。

超氧化物作为双向调控因子,在应对抗生素压力时既可通过 ROS 共有通路产生羟自由基起损伤作用,又可分别通过 SoxR 和 MarRAB 发挥保护作用。SoxR

作为超氧阴离子的感应物,在细胞内以二聚体形式存在。每个单体中含有一个 $[2Fe-2S]$ 中心,它是感知氧化胁迫的开关^[59,60]。当 $[2Fe-2S]$ 中心处于氧化态时,它能够与 SoxS 启动子特异结合使 SoxS 转录激活能力显著提高。SoxS 蛋白表达上升,进而激活下游基因表达^[61]。所调控的基因包括 *acrAB*(毒素的外排), *micF*(膜通透性调节)等,这些基因的表达能够减少氧化损伤。此外,超氧化物也可上调 MarA 的表达,通过降低药物摄入、增加药物的外排^[10],进而抑制药物初级损伤的形成,甚至引起细菌耐药。因此非致死浓度的抗生素产生的超氧化物可通过诱导 SoxRS-MarRAB-AcrAB 外排泵系统起保护作用(图2)。

5 结语与展望

不同于细菌自然代谢条件下 ROS 的产生,在抗生素作用过程中 ROS 的产生与作用具有一定的复杂性。ROS 在细菌胞内生成积累的过程与一系列复杂的调控因子有关,而 ROS 所发挥的作用则与抗生素浓度高低密切相关。具体来讲,ROS 一方面能够在非致死浓度的抗生素作用下通过诱导 MarA、SoxS 介导细菌产生抗生素耐药;另一方面在致死浓度抗生素作用下又能够参与抗生素杀菌,降低细菌数目,

降低产生耐药的频率。因此 ROS 在细菌耐药和抗生素杀菌中是一把双刃剑。

ROS 参与细菌耐药和抗生素杀菌是一个相对复杂的机制,目前仍存有一些尚未解决的问题。例如有关抗生素作用下产生 ROS 的遗传调控机制尚未完全清楚,若能清楚了解 ROS 在抗生素作用下产生的遗传调控机制并寻找到诱导 ROS 大量产生的抗生素佐剂将对增强现有抗生素杀菌效果,降低细菌耐药性具有重大意义。

再者,关于 ROS 的研究目前都是在体外进行,与体外实验微环境相比,体内感染的微环境更为复杂,很难确定其与体外哪种情况下的微环境相同。因此抗生素诱导细菌产生 ROS 并参与细菌耐药及抗生素杀菌是否在宿主体内依然存在也是将来要探索的另一重大问题。或许后续研究可以通过建立相关动物感染模型,观察 ROS 在体内是否仍与细菌耐药及抗生素杀菌有关。这无疑将为未来的细菌耐药和抗生素杀菌研究提供重要信息和新的思路。

参考文献(References):

- [1] Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, 1992, 257(5073): 1050–1055.
- [2] Livermore DM. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(9): 1941–1944.
- [3] Marshall DA, McGeer A, Gough J, Grootendorst P, Buitendyk M, Simonyi S, Green K, Jaszewski B, MacLeod SM, Low DE. Impact of antibiotic administrative restrictions on trends in antibiotic resistance. *Can J Public Health*, 2006, 97(2): 126–131.
- [4] Guo W, He Q, Wang ZY, Wei M, Yang ZW, Du Y, Wu C, He J. Influence of antimicrobial consumption on gram-negative bacteria in inpatients receiving antimicrobial resistance therapy from 2008–2013 at a tertiary hospital in Shanghai, China. *Am J Infect Control*, 2015, 43(4): 358–364.
- [5] Bergman M, Huikko S, Pihlajamäki M, Laippala P, Palva E, Huovinen P, Seppälä H. Effect of macrolide consumption on erythromycin resistance in *Streptococcus pyogenes* in Finland in 1997–2001. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(9): 1251–1256.
- [6] Bergman M, Nyberg ST, Huovinen P, Paakkari P, Hakanen AJ, the Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. Association between antimicrobial consumption and resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(3): 912–917.
- [7] Malik M, Li LP, Zhao XL, Kerns RJ, Berger JM, Drlica K.

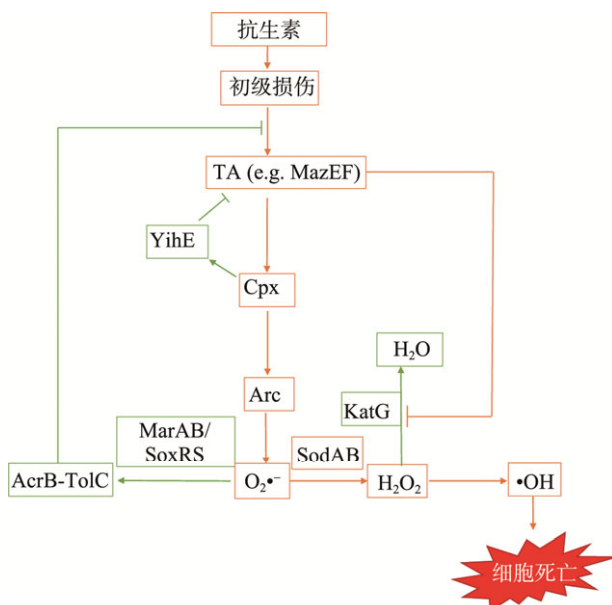


图 2 抗生素诱导 ROS 产生过程中压力反应调节
Fig. 2 Antibiotics-induced ROS and the stress-response regulation

- Lethal synergy involving bicyclomycin: an approach for reviving old antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(12): 3227–3235.
- [8] Long QX, Du QL, Fu TW, Drlica K, Zhao XL, Xie JP. Involvement of Holliday junction resolvase in fluoroquinolone-mediated killing of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(3): 1782–1785.
- [9] Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell*, 2010, 37(3): 311–320.
- [10] Aleksun MN, Levy SB. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol*, 1999, 7(10): 410–413.
- [11] Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 2007, 130(5): 797–810.
- [12] Rajendran M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016, 13: 175–187.
- [13] Huang XW, Zhao Q, Chen DZ, Zhang LS. Mutations in the D-loop region of mitochondrial DNA and the ROS level in the tissue of Hepatocellular Carcinoma. *Hereditas (Beijing)*, 2005, 27(1): 14–20.
黄学文, 赵琪, 陈道楨, 张丽珊. 肝癌组织中线粒体 DNA D-Loop 区碱基变异与 ROS 水平. *遗传*, 2005, 27(1): 14–20.
- [14] Sakai A, Nakanishi M, Yoshiyama K, Maki H. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 2006, 11(7): 767–778.
- [15] Dwyer DJ, Kohanski MA, Collins JJ. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(5): 482–489.
- [16] Korshunov S, Imlay JA. Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2006, 188(17): 6326–6334.
- [17] Seaver LC, Imlay JA. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48742–48750.
- [18] Lobritz MA, Belenky P, Porter CBM, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, Dwyer DJ, Khalil AS, Collins JJ. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(27): 8173–8180.
- [19] Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(3): 949–954.
- [20] Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3): 1119–1122.
- [21] Seaver LC, Imlay JA. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, 183(24): 7173–7181.
- [22] Belenky P, Ye JD, Porter CBD, Cohen NR, Lobritz MA, Ferrante T, Jain S, Korry BJ, Schwarz EG, Walker GC, Collins JJ. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell Rep*, 2015, 13(5): 968–980.
- [23] Xie LX, Yu ZX, Guo SY, Li P, Abdalla AE, Xie JP. The roles of epigenetics and protein post-translational modifications in bacterial antibiotic resistance. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(8): 793–800.
谢龙祥, 于召箫, 郭思瑶, 李萍, Abdalla AE, 谢建平. 表观遗传和蛋白质翻译后修饰在细菌耐药中的作用. *遗传*, 2015, 37(8): 793–800.
- [24] Cattoir V. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol (Paris)*, 2004, 52(10): 607–616.
- [25] Webber MA, Piddock LJV. Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(5): 1550–1552.
- [26] Rosner JL, Martin RG. An excretory function for the *Escherichia coli* outer membrane pore TolC: upregulation of *marA* and *soxS* transcription and Rob activity due to metabolites accumulated in *tolC* mutants. *J Bacteriol*, 2009, 191(16): 5283–5292.
- [27] Greenberg JT, Chou JH, Monach PA, Demple B. Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, 173(14): 4433–4439.
- [28] Wu J, Weiss B. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1991, 173(9): 2864–2871.
- [29] Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol*, 2000, 182(12): 3467–3474.
- [30] Ruiz C, Levy SB. Many chromosomal genes modulate MarA-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 2125–2134.
- [31] Blanchard JL, Wholey WY, Conlon EM, Pomposiello PJ. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS One*, 2007, 2(11): e1186.
- [32] Mosel M, Li LP, Drlica K, Zhao XL. Superoxide-mediated protection of *Escherichia coli* from *Antimicrobials*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5755–5759.
- [33] Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, 2012, 336(6079): 315–319.
- [34] Liu YL, Zhou JA, Qu YL, Yang XG, Shi GJ, Wang XH, Hong YZ, Drlica K, Zhao XL. Resveratrol antagonizes antimicrobial lethality and stimulates recovery of bacterial mutants. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153023.

- [35] Wise EM Jr, Park JT. Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1965, 54(1): 75–81.
- [36] Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1965, 54(4): 1133–1141.
- [37] Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(6): 423–435.
- [38] Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao XL. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(2): 385–392.
- [39] Malik M, Hussain S, Drlica K. Effect of anaerobic growth on quinolone lethality with *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(1): 28–34.
- [40] Lewin CS, Morrissey I, Smith JT. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991, 10(4): 240–248.
- [41] Wang XH, Zhao XL. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(4): 1395–1402.
- [42] Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 2008, 135(4): 679–690.
- [43] Davies BW, Kohanski MA, Simmons LA, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, 2009, 36(5): 845–860.
- [44] Dorsey-Oresto A, Lu T, Mosel M, Wang XH, Salz T, Drlica K, Zhao XL. YihE kinase is a central regulator of programmed cell death in bacteria. *Cell Rep*, 2013, 3(2): 528–537.
- [45] Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*, 2009, 325(5946): 1380–1384.
- [46] Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 2011, 334(6058): 986–990.
- [47] Becerra MC, Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(4): 1003–1007.
- [48] Albesa I, Becerra MC, Battán PC, Páez PL. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(2): 605–609.
- [49] Becerra MC, Páez PL, Laróvere LE, Albesa I. Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Mol Cell Biochem*, 2006, 285(1–2): 29–34.
- [50] Zhao XL, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 21: 1–6.
- [51] Wang XH, Zhao XL, Malik M, Drlica K. Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(3): 520–524.
- [52] Liu YY, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*, 2013, 339(6124): 1210–1213.
- [53] Keren I, Wu YX, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 2013, 339(6124): 1213–1216.
- [54] Ezraty B, Vergnes A, Banzhaf M, Duverger Y, Huguenot A, Brochado AR, Su SY, Espinosa L, Loiseau L, Py B, Typas A, Barras F. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science*, 2013, 340(6140): 1583–1587.
- [55] Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64(1): 357–372.
- [56] Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(1–2): 146–159.
- [57] Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, Chan CT, Lobritz MA, Braff D, Schwarz EG, Ye JD, Pati M, Vercruyse M, Ralifo PS, Allison KR, Khalil AS, Ting AY, Walker GC, Collins JJ. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(20): E2100–E2109.
- [58] Zhao XL, Hong YZ, Drlica K. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(3): 639–642.
- [59] Outten FW. Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(4): 206–207.
- [60] Miller HK, Auerbuch V. Bacterial iron-sulfur cluster sensors in mammalian pathogens. *Metallomics*, 2015, 7(6): 943–956.
- [61] Blanchard JL, Wholey WY, Conlon EM, Pomposiello PJ. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS One*, 2007, 2(11): e1186.

(责任编辑: 谢建平)