

# 头孢曲松耐药菌通过调整能量代谢相关蛋白产生耐药性

潘建义<sup>1), 2)</sup>\*, 陈萍<sup>2)</sup>, 王三英<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018; (<sup>2)</sup>厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

**摘要** 随着抗生素药物的开发与利用, 细菌在对抗药物过程中逐渐发展出各种不同的耐药机制. 近年来高通量的蛋白质组学技术已逐渐用于细菌耐药性机理研究, 但主要集中在对细菌外膜蛋白的作用进行分析. 本文采用 2-D native/SDS PAGE 方法从蛋白质复合物角度分析接近生理条件的胞浆蛋白在头孢曲松耐药性中的作用. 结果发现 8 个耐药性相关蛋白质, 通过对蛋白质功能分析, 揭示了细菌通过调整能量代谢相关蛋白产生耐药性的新机制. 进一步对相关菌株的次抑菌浓度和生存率分析, 提示 MalP 和 SucC 等关键蛋白质可作为设计和开发新型抗菌分子的作用靶点.

**关键词** 耐药性; 头孢曲松; 能量代谢; 2-D native/SDS PAGE; 生存率

**中图分类号** Q939.9

## Modification of Energy Metabolism-related Proteins is Responsible for Ceftriaxone-resistance

PAN Jian-Yi<sup>1), 2)</sup>\*, CHEN Ping<sup>2)</sup>, WANG San-Ying<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup> School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

(<sup>2)</sup> School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Outer membrane proteins of bacteria have been investigated systematically in response to antibiotic resistance by high-throughput proteomic techniques in recent years, but the data of the cytoplasmic proteins analyzed on a proteome scale are not available yet. In this study, 2-D native/SDS-PAGE was first applied for characterization in cytoplasmic proteins responding to ceftriaxone-resistance in *Escherichia coli*. Eight proteins involved in modification of energy production and conversion were identified responsible for ceftriaxone-resistance. Among these proteins, down-regulated MalP and up-regulated SucC were found to play critical roles in response to resistance according to the MIC and survival ability analysis, and the two proteins may be candidate targets for development of novel antimicrobial drugs.

**Key words** antibiotic resistance; ceftriaxone; energy metabolic system; 2-D native/SDS PAGE; survival ability

随着对抗生素的广泛和频繁使用, 细菌对抗生素的耐药性也随之产生, 而且存在交叉耐药和多重耐药现象, 因而给细菌感染性疾病的治疗带来了严重的困难. 因此, 人类需要在阐明细菌产生耐药性机理的基础上不断开发出各种新的抗生素, 以对抗由细菌或其他病原微生物引起的疾病. 目前, 抗生素耐药性的产生机制已逐渐被揭开, 它是“达尔文自然选择 (Darwinian selection)”的结果<sup>[1]</sup>. 细菌耐药性可来自细菌自身基因的改变或通过从外界获取相关基因等获得耐药机制来达到耐药目的, 也可以是不需要基因改变的自身耐药<sup>[2-4]</sup>.

近几年, 随着蛋白质组学技术的兴起和发展,

2-DE 和 LC-MS/MS 等高通量的蛋白质组学技术也逐渐用于细菌的耐药性研究, 因而多种抗

收稿日期: 2009-09-16; 接受日期: 2009-11-16

浙江省自然科学基金项目 (No. Y2090396) 和浙江理工大学科研启动基金项目 (No. 11615432610862)

\* 联系人 Tel: 0571-86843566; E-mail: panjy@zjut.edu.cn

Received: September 16, 2009; Accepted: November 16, 2009

Supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. Y2090396) and Science Foundation of Zhejiang Sci-Tech University (No. 11615432610862)

\* Corresponding author Tel: 0571-86843566;

E-mail: panjy@zjut.edu.cn

生素的耐药机制已从蛋白质组角度进行了阐述。目前,相关研究主要集中在细菌的膜蛋白或外膜蛋白方面,如肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)对红霉素的耐药性<sup>[5]</sup>,铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)对氨基青霉素、卡那霉素和四环素的耐药性<sup>[6]</sup>,幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)对 metronidazole 的耐药性<sup>[7]</sup>,大肠杆菌 (*Escherichia coli*)对氯霉素<sup>[8]</sup>、氨基青霉素和四环素<sup>[9]</sup>、萘啶酮酸的耐药性<sup>[10]</sup>,以及临床分离的沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)<sup>[11]</sup>和淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)对多种药物的交叉耐药性<sup>[12]</sup>等。这些研究为全面揭开细菌耐药性提供了部分研究基础。但对位于细菌胞浆的可溶性蛋白质的蛋白质组学分析未见报道。

本文采用 2-D native/SDS-PAGE 的方法分析与耐药性相关的胞浆蛋白,并通过对相应蛋白质的基因敲除菌株的功能分析来进一步阐述这些蛋白质在细菌产生耐药性中的作用机制。此外,该方法还可从蛋白质复合物的角度来探讨细菌对抗不利条件并适应新环境的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及抗体

大肠杆菌 K-12 (*E. coli* K-12)购自中国科学院微生物研究所,实验中所用大肠杆菌基因敲除菌株均获赠于日本 Keio collection,各蛋白质的抗体(兔抗)由本实验室制备保存。

### 1.2 头孢曲松耐药菌株的筛选

用倍比稀释法检测 *E. coli* K-12 原代株 ( $C_0$ )对头孢曲松的最小抑菌浓度 ( $MIC_0$ ),然后在次抑菌浓度 ( $1/2 MIC_0$ )条件下对 *E. coli* K-12 进行传代培养,每隔 12 h 传代 1 次,共传代 10 次,同时将  $C_0$  在不加抗生素条件下同步培养 10 代 ( $C_{10}$ )作为对照组。将第 10 代 *E. coli* K-12 转入无药物 LB 固体培养基培养,挑单个菌落在 LB 培养基中培养至  $A_{600}$  为 0.6,在 MH 培养基测定它们的  $MIC$  值 ( $MIC_{10}$ )。如果  $MIC_{10}/MIC_0 > 4$ ,则认为 *E. coli* K-12 对该抗生素表现出耐药性<sup>[13]</sup>。

### 1.3 胞浆蛋白的提取

挑取单菌落接种于培养基中培养过夜作为种子菌。按 1:100 (V/V) 的比例接种于另外一批培养基中,振荡培养至  $A_{600}$  为 0.6,4 5 000 g 离心 5 min,收集菌体,以 0.85% NaCl 洗涤菌体 2 次。称菌体湿重,按 1:3 (W/V) 的比例加入破碎缓冲液 (50

mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5% 甘油,并加入 PMSF 至终浓度 1 mmol/L) 悬浮菌体,加溶菌酶至终浓度 10  $\mu$ g/ml,4 轻微摇动 30 min 冰浴中超声破碎。破碎后的菌液 12 000 g,4 离心 15 min,取上清液 100 000 g,4 离心 40 min 收集上清,并加入 PMSF 至终浓度为 1 mmol/L。样品分装, -80 保存备用。

### 1.4 二维 native /SDS 凝胶电泳

第一向电泳 (1-D native-PAGE) 采用 7.5% 的非变性分离胶,电泳在 4 下进行,电泳结束后,对胶进行咪唑 锌负染<sup>[14, 15]</sup>,根据染色的条带切取非变性胶条,并置于平衡液 (0.06 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 10% 甘油) 中平衡至少 30 min。第二向电泳为 10% SDS-PAGE,电泳结束后采用胶体考染法 (colloidal Coomassie staining)<sup>[16]</sup>染色。采用 Melanie 5.0 软件分析图谱。

### 1.5 质谱鉴定分析

蛋白质点的肽指纹图 (PMF) 采用 MALDI-TOF 质谱仪 (BRUKER 公司的 ReFlex<sup>TM</sup>) 进行分析,反射模式,离子源加速电压 1 为 20 kV,加速电压 2 为 23 kV,  $N_2$  激光波长 337 nm,脉冲宽度为 3 ns,离子延迟提取 2000 ns,真空度  $1.4 \times 10^{-7}$  Torr,质谱信号单次扫描累加 50 次,并用标准 Make 峰作为外标校正质谱峰,正离子谱测定<sup>[17]</sup>。肽指纹图谱匹配通过 Mascot 程序查询。

### 1.6 Western 印迹分析

SDS-PAGE 或 2-D native/SDS-PAGE 结束后,采用半干法将胶上蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上,用丽春红染液进行染色,扫描图谱以便于后续的免疫条带或点的确定。然后加封闭液封闭,4 孵育过夜;加入相应一抗室温轻摇孵育 1 h;洗膜后加入酶标二抗,并室温轻摇孵育 1 h;洗膜后 DAB 显色。

### 1.7 敲除菌的生存率测定<sup>[18]</sup>

生存率 (survival ability) 定义为在相应的  $1/2 MIC$  下各敲除菌与正常 *E. coli* K-12 的  $A_{600}$  值的比率。挑取单菌落培养至  $A_{600}$  为 0.5,用 LB 培养基稀释菌液;取约  $5 \times 10^5$  CFU/ml 菌至含  $1/2 MIC$  浓度的抗生素的 3 ml LB 培养基中,37 培养 8 h 取 300  $\mu$ l 到 96 孔酶标板中,酶标仪测定  $A_{600}$  值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 头孢曲松耐药菌株的筛选

原代 *E. coli* K-12 ( $C_0$ ) 对头孢曲松的  $MIC$  值 ( $MIC_0$ ) 为 0.048  $\mu$ g/ml,原代菌在  $1/2 MIC_0$  抗生素

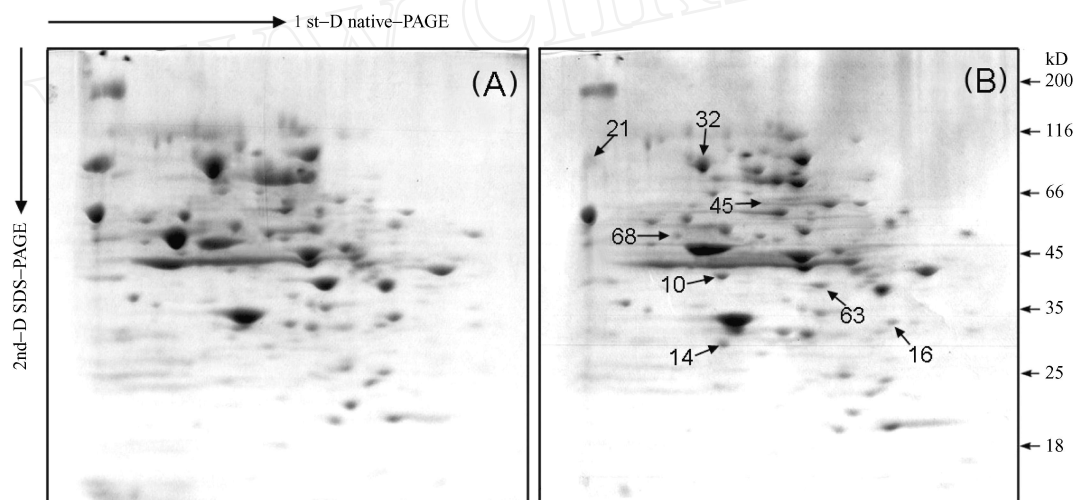
浓度下传代 10 次后对头孢曲松的  $MIC$  值 ( $MIC_{10}$ ) 为  $0.384 \mu\text{g/ml}$ ,  $MIC$  结果见 Table 1. 传代 10 次以后的菌株对头孢曲松的  $MIC_{10}/MIC_0$  为 8, 表明经头孢曲松诱导后的菌株具有明显的耐药性. 耐药菌株命名为头孢曲松耐药菌 (ceftriaxone-resistance, CRO-R).

**Table 1** MICs of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant of *E. coli* K-12

Antibiotic	$MIC_0$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$MIC_{10}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$MIC_{10}/MIC_0$ (fold)
Ceftriaxone	0.048	0.384	8

## 2.2 胞浆蛋白的 2-D native/SDS-PAGE 及差异蛋白质点的鉴定分析

获得的 CRO-R 菌在  $1/2 MIC_{10}$  抗生素下进行培



**Fig 1** 2-D native/SDS PAGE analysis of cytoplasmic protein between normal strains (A) and ceftriaxone-resistant strains (B) of *E. coli* K-12. Cytoplasmic proteins from normal strains and ceftriaxone-resistant strains were electrophoresed in first-dimensional discontinuous native polyacrylamide slab gels (7.5% for resolving gel and 4% for stacking gel) at 4°C. Gel strips containing protein bands visualized by indazole-zinc sulfate reverse staining were excised from native gels and then soaked in equilibration buffer on a gentle shaker for 30 min. The treated gel strips were then switched to second-dimensional SDS-PAGE which carried out in discontinued polyacrylamide slab gels (10% for running gel and 4% for stacking gel).

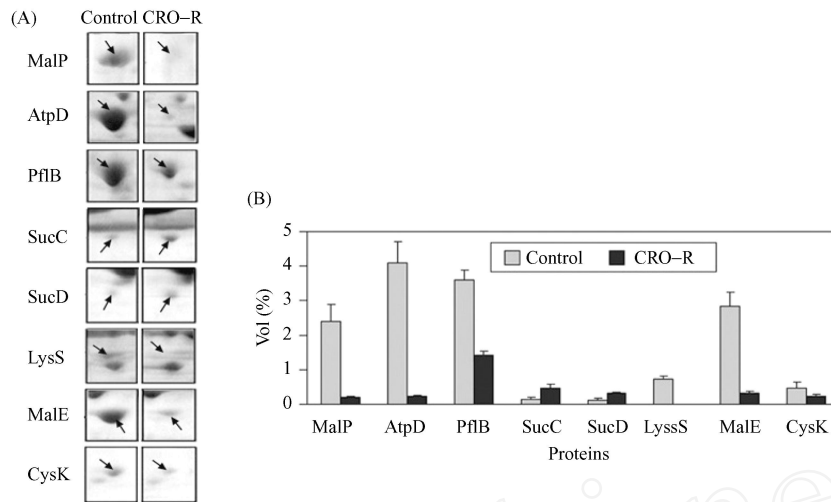
## 2.3 差异蛋白质及其相互作用蛋白质的 $MIC$ 和生存率分析

差异蛋白质及位于同一竖线上的鉴定为复合物的蛋白质如 Fig. 3 所示, PfB 与 TnaA, MaIE 和 TaB, CysK 和 SodB 分别形成复合物, SucC 和 SucD 为酶的两个亚基. 为了探讨差异蛋白质及与其形成复合物的蛋白质在头孢曲松耐药中的作用, 对这些蛋白质相应的基因敲出菌株的  $MIC$  和生存率进行分析, 以检测这些蛋白质是否在耐药作用中起重要作用.

养, 对照菌株  $C_0$  (原代 *E. coli* K-12) 与  $C_{10}$  (在正常培养基中平行传代 10 次的菌株) 在正常培养基中培养, 至  $A_{600}$  为 0.6 左右收集菌体, 提取胞浆蛋白, 并进行 2-D Native/SDS-PAGE 分析, 结果如 Fig 1 所示 (因  $C_{10}$  和  $C_0$  两者外膜蛋白图谱基本一致, 故只列出  $C_{10}$  的图作为对照). 采用 Melanie 5.0 分析软件对所获 2-DE 图谱进行分析, 得到 8 个明显差异的蛋白质点 (Fig 1 B 中箭头所示), 经质谱鉴定分别为: MalP (21), AtpD (68), PfB (32), SucC (10), SucD (14), LysS (45), MaIE (63) 和 CysK (16) (质谱结果见 Table 2). 各蛋白质的变化情况如 Fig 2 所示, 在这些差异表达的蛋白质中, 只有 SucC 和 SucD 的表达量增加, 其他 6 个蛋白质的表达量均减少, 其中以 MalP, AtpD 和 LysS 变化最为明显.

各菌株  $MIC$  见 Fig 4, 在这些菌株中, 只有 *malP*, *sudD* 和 *sucC* 的  $MIC$  值有明显改变, 其中 *malP* 和 *sudD* 的  $MIC$  下降, 分别为正常对照的  $1/4$  和  $1/2$ , 而 *sucC* 的  $MIC$  值比对照菌增加了一倍, 这意味着这 3 个蛋白质在头孢曲松抗性中的作用更为重要.

因各菌株的  $MIC$  值变化并不明显, 不能提供更多有用信息, 为此进一步测定比  $MIC$  值更加敏感的各菌株的生存率来分析各蛋白质的重要性. 在预实



**Fig 2 Analysis of representative enlarged partial two-dimensional gels** (A) The enlarged partial 2-DE gels showing altered expression spots between control and CRO-R strains; (B) Histograms display the changes in spot intensity of altered proteins. Bars represent spot intensity with relative volume (%) divided by the total volume over the whole image, according to description of Melanie 5.0 software

**Table 2 Identification of altered protein spots and other spots aligned in the same line by MALDI-TOF mass spectrometry**

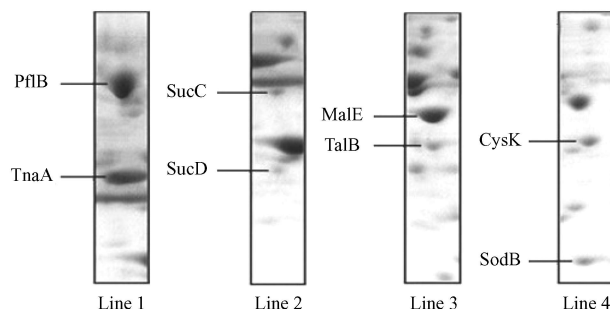
Line	Spot No	Protein	Gene name	NCBI No	Protein score	Pred $M_r$	Peptides matched
—	21	Maltodextrin phosphorylase	<i>m alP</i>	gi 7246004	114	90 322	15
—	68	ATP synthase subunit B	<i>atpD</i>	gi 15804332	105	50294	8
1	32	Pyruvate-formate lyase	<i>pfB</i>	gi 16128870	173	85303	12
—	—	Tryptophanase ( <i>L</i> -tryptophan indole-lyase) (TNase)	<i>maA</i>	gi 41018359	125	52 768	12
2	10	Succinyl-CoA synthetase, beta subunit	<i>sucC</i>	gi 6980728	131	41 052	11
	14	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	<i>sudD</i>	gi 6980727	63	29 646	6
—	45	Lysine tRNA synthetase, constitutive	<i>lysS</i>	gi 16130792	60	57 567	6
3	63	Maltodextrin-binding protein (maltose-binding protein) mutant	<i>m alE</i>	gi 809263	82	39 897	7
—	—	Transaldolase B	<i>taB</i>	gi 14277926	70	35 022	7
4	16	Cysteine synthase A, <i>O</i> -acetylserine sulphydrolase A subunit	<i>cysK</i>	gi 1788754	174	34 358	12
—	—	Iron-containing superoxide dismutase	<i>sodB</i>	gi 56159892	48	21 121	4

验基础上,选取 6 个不同抗生素浓度进行测定,分别为 0.002、0.004、0.008、0.01、0.015 和 0.02  $\mu\text{g/ml}$  各菌株生存率结果如图 5 所示,在 0.015  $\mu\text{g/ml}$  浓度下,所有菌株生存率均有变化,其中 *m alP*, *sudD*, *lysS* 和 *sodB* 生存率降低,而 *atpD* 和 *sucC* 生存率增加。*m alP* 在抗生素浓度从 0.002  $\mu\text{g/ml}$  增加到 0.015  $\mu\text{g/ml}$  过程中,其生存率逐渐下降,而 *lysS* 从 0.004  $\mu\text{g/ml}$  到 0.015  $\mu\text{g/ml}$  范围内逐渐降低, *sudD* 也从 0.008 到 0.015  $\mu\text{g/ml}$  范围内逐渐降低, *sodB* 和 *atpD* 只在 0.015  $\mu\text{g/ml}$  浓度时

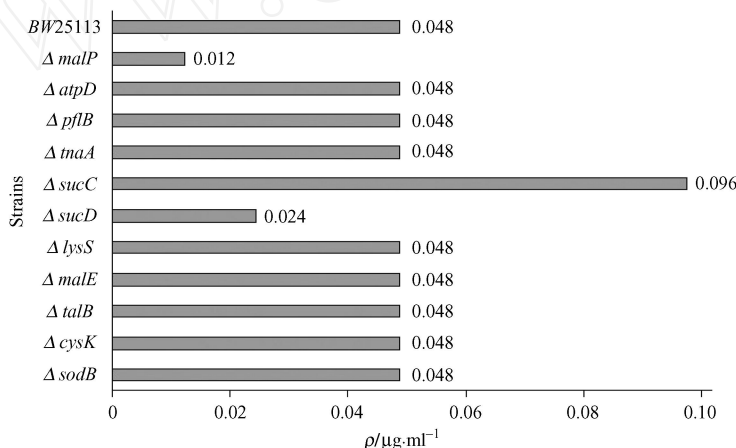
下降,而 *sucC* 则在 0.015  $\mu\text{g/ml}$  和 0.02  $\mu\text{g/ml}$  两个浓度下降低。在这些变化中,以 *sucC* 和 *m alP* 最为显著。无论是 MIC 还是生存率的结果均表明, *SucC* 和 *MalP* 两个蛋白质在头孢曲松抗性中的作用更为重要。

#### 2.4 差异蛋白质及其复合物蛋白质的功能和分类

根据美国国立卫生研究院生物信息学中心 (NCBI) 数据库对这些蛋白质功能的注释和分类,除了 *LysS* 为信息存储和加工类外,其它蛋白质均属于能量代谢相关蛋白,它们的功能主要涉及到能量生



**Fig 3 The enlarged partial 2-DE lines showing protein complexes which consist of altered spots and other spots aligned in the same line**  
Each component of a protein complex should be comigrated in the first dimensional native-PAGE, and aligned consequently with a vertical line in the second dimensional SDS-PAGE. According to the criterion, PfIB-TnaA (Line 1), SucC-SucD (Line 2), MalE-TaB (Line 3) and CysK-SodB (Line 4) were all identified as complex.



**Fig 4 Histogram displays of MIC of 2-DE altered proteins and their related proteins gene-deletion strains** The MIC of deletion strains were determined with the standard serial dilution method in broth medium.

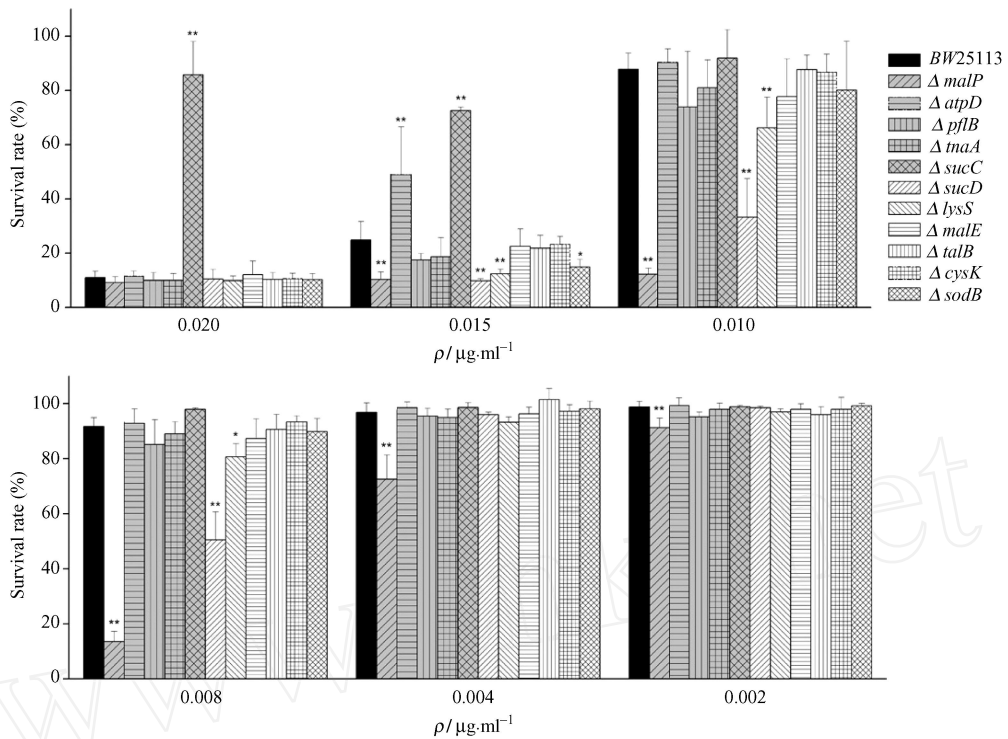
成、转化、糖运输和氨基酸代谢等方面。各蛋白质的功能分类见 Table 3。

**Table 3 Functional categories of differential proteins annotated in NCBI database**

Functional categories	Proteins
<b>Information storage and processing</b>	
Translation, ribosomal structure and biogenesis	LysS
<b>Metabolism</b>	
Energy production and conversion	SucC, SucD, AtpD, PfIB
Carbohydrate transport and metabolism	MalP, MalE, TalB
Amino acid metabolism	TnaA, CysK
Inorganic ion transport and metabolism	SodB

## 2.5 差异蛋白质与头孢曲松耐药性的相关性分析

在 CRO-R 菌的 8 个差异蛋白质中, AtpD, LysS 和 CysK 曾报道与细菌的耐药性相关。Humbert 等<sup>[19]</sup>发现 2 个 GC 碱基对插入导致 ATP 酶的 亚基生物合成提前终止, 由正常时的 286 个氨基酸残基变为 247 个, 亚基缺陷导致大肠杆菌对新霉素和链霉素等氨基糖苷类抗生素产生了耐药性。除细菌中 ATP 酶与耐药性有关外, 在人结肠癌细胞中也发现线粒体 ATP 酶的 亚基表达下调导致细胞对化疗试剂 5 氟尿嘧啶产生耐药性<sup>[20]</sup>。也有报道称, II 型糖尿病 (Type 2 Diabetes) 是由于骨骼肌细胞中 ATP 酶的 亚基被磷酸化导致其对胰岛素产生耐受, 从而致病<sup>[21]</sup>。这表明 ATP 酶, 尤其是其催化亚



**Fig 5 Testing for survival ability of gene-deletion strains of the 2-DE altered proteins and their related proteins** The survival ability is defined as the  $A_{600}$  ratio of the bacteria growth with ceftriaxone and normal LB medium.  $5 \times 10^5$  CFU/ml of bacteria were cultured in 3 ml LB medium separately containing 0.002, 0.004, 0.008, 0.01, 0.015, 0.02  $\mu\text{g/ml}$  ceftriaxone, and an identical control group was set up without any antibiotic. These tubes were incubated at 37 for 8 hours. Bacterial growth was determined by measurement of the  $A_{600}$  of the cultures.

基在细胞耐药性中起重要作用,这可能与细胞需进行能量调整以适应不利环境有关。本文中,ATP酶的催化亚基( $A_{pD}$ )表达下调与细菌在头孢曲松环境中能量代谢减弱有关。 $atpD$ 的敲除菌在该抗生素中的生存率与正常对照相比呈上升的趋势,即在一定范围内随着抗生素浓度增加,缺乏 $A_{pD}$ 的菌更容易生长,这进一步表明细菌通过降低 $A_{pD}$ 的表达来减少能量代谢,从而适应头孢曲松环境。

氨基酰-tRNA合成酶将含特定反密码子的tRNA氨基酰化生成相应的氨基酰-tRNA,它将遗传信息和生物合成连接起来,由于该类酶具有立体异构专一性,只催化特定构象的tRNA和氨基酸,这对维持生物合成的准确性有重要作用,因而是细胞内非常重要的一类酶。其中,赖氨酰-tRNA合成酶(LysRS)由于其具有两种功能类型而引起研究人员的极大兴趣,而且它也是该类酶中研究最为详尽的酶。II型LysRS主要存在于真核生物和多数细菌体内,而I型LysRS则主要存在于古细菌及部分细菌中<sup>[22]</sup>。大肠杆菌细胞内的LysRS为II型,且该酶有

两种基因形式,一种为持家基因 $lysS$ 编码,另一基因 $lysU$ 则在热休克等应激条件及培养基中含亮氨酸、二肽(dipeptides)<sup>[23, 24]</sup>等条件下表达。研究发现, $lysS$ 序列与基因 $herC$ 完全一致,而 $herC$ 为 $prB$ - $herC$ 操纵子的一部分<sup>[25]</sup>。Aatide等<sup>[26]</sup>在研究LysS对一种赖氨酸类似物S-(2-aminoethyl)-L-cysteine(AEC)的耐药性时发现,5  $\mu\text{mol/L}$  AEC即可抑制野生菌生长,而LysS的突变株却具有较强的耐受性,在1 mmol/L AEC中仍能生长。进一步研究则表明,LysS是AEC抑制细菌生长的主要靶点,而其对AEC抗性的获得则是通过与天冬氨酸激酶基因 $lysC$ 表达的调节区L box riboswitch有关<sup>[26-28]</sup>。本文中,头孢曲松耐药菌几乎完全抑制LysS的表达,说明LysS也可能是头孢曲松抗生素的一个抑制其生长的靶点,因为细菌通过降低表达或不表达抗生素靶点蛋白质,抗生素分子就不能很好地发挥其抑制作用。但敲除LysS基因后,其在头孢曲松中的生存率却低于对照组,这看起来似乎相互矛盾,令人费解。其实不然,上面提到 $lysS$ 基因与 $prB$ - $herC$ 操纵

子中的 *herC* 序列一致,因而 *lysS* 的基因不仅表达 *LysS*,还参与调节作用,而这很可能与促使菌获得抗性的基因 *lysC* 有关。正因为这样的关系才导致敲除 *lysS* 基因后其生存率不但不增加,反而降低。细菌的这种将抑制生长的靶位和获得抗性位点分开的全新作用机制,为今后开发有效的抗生素提供了一个新的方向,该抗生素分子必须能同时作用于 *LysS* 和 *L box* 调节区才会有效。

本文中的 *CysK* (半胱氨酸合成酶 A) 的表达降低,但由于其降低的幅度并不大,而且其 *MIC* 和生存率与对照组相比无明显差异,因而该蛋白在头孢类抗生素抗性中可能只起调节作用,并不直接参与抗生素的耐药性。后续分析表明,细菌可能通过降低 *CysK* 的表达来避免促发不必要的 *PfB* 酶的催化作用。与 *CysK* 结合的 *SocB* 为含铁的超氧化物歧化酶,该酶与清除 *CysK* 的产物——半胱氨酸自由基有关。

除上述 3 种蛋白质外,本文还首次发现 *MalP*、*MalE*、*SucC*、*SucD* 和 *PfB* 5 种蛋白质与细菌耐药性有关。

*MalE* (麦芽糖糊精结合蛋白) 和 *MalP* (麦芽糖糊精磷酸化酶) 均与麦芽糖糊精的运输和代谢有关。*MalE* 与两个内膜蛋白 *MalF/G* 及位于胞浆的 ATP 结合蛋白 *MalK* 共同组成 *MalEFGK* 麦芽糖转运复合物,负责转运麦芽糖/麦芽糖糊精等能源物质<sup>[29]</sup>。此外,与 *MalE* 结合的 *TaB* 也与糖代谢相关。*MalP* 为磷酸化酶,它将转运来的麦芽糖糊精磷酸形成葡萄糖-1 磷酸和少一个葡萄糖分子的麦芽糖糊精<sup>[29,30]</sup>。本文中这两个蛋白质均下调表达,尤其是 *MalP*,其表达被完全抑制。由于这两个蛋白质的表达量降低,对麦芽糖糊精的运输和利用就受到影响,那么必然会导致细胞内葡萄糖-1 磷酸的产量降低。因此,细胞的有氧代谢就会受到影响,同时合成细胞壁所必须的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸的产量也必然降低,最终的结果是细胞壁的合成受阻,而头孢类抗生素的抗菌机制就是抑制细菌细胞壁的合成。由于胞内的能源物质葡萄糖的量降低,糖酵解和三羧酸循环会受影响,ATP 的产量降低,这与上述结果 *A<sub>pd</sub>* 表达量降低的结果完全一致。这表明细菌在细胞壁合成受阻后,会通过调整一系列与能量代谢相关酶的表达来适应抗生素环境,从而达到耐药目的。

尽管 *MalE* 和 *MalP* 的表达量都降低,但 *MalP* 的作用可能更为重要。不仅是因为 *MalP* 降低的幅度比 *MalE* 的大,而且 *MalP* 的敲除菌株的 *MIC* 和生存

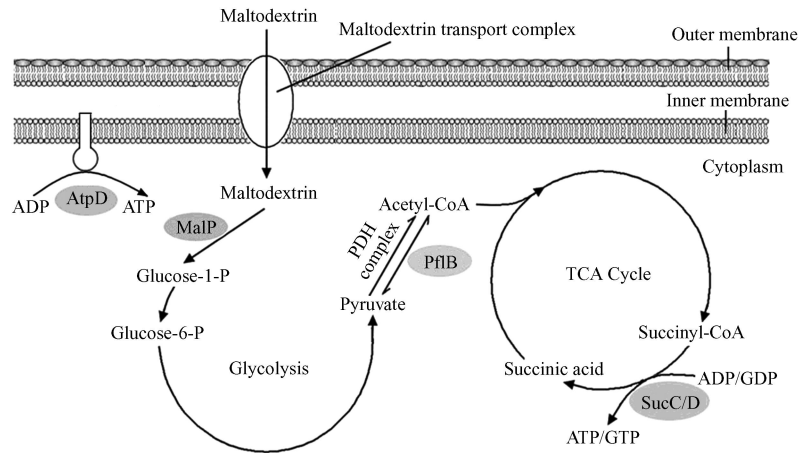
率均明显降低。实际上,*malP* 的 *MIC* 和生存率在所有相关的菌株中均为最低,而且在低浓度抗生素下,其生存率就显著降低,可见 *MalP* 对头孢曲松最为敏感。

*PfB* (丙酮酸 甲酸裂合酶 1) 在厌氧和兼性生长的细菌代谢中起关键作用,它以非氧化的基于自由基的裂解机制将丙酮酸裂解为甲酸和乙酰-CoA<sup>[31,32]</sup>。在头孢曲松环境中,胞内葡萄糖的产量降低,糖酵解产物丙酮酸的量也随之降低,在这种情形之下,*PfB* 的量也被下调表达来适应其底物的下降。这与本文 2-DE 和 2-D Western 印迹分析中 *PfB* 的变化一致。值得一提的是,半胱氨酸自由基可通过攻击丙酮酸中的羰基而引发 *PfB* 裂解丙酮酸,细菌为避免不必要的裂解反应,必须降低 *CysK* 的表达。由此可见,*CysK* 的作用并不是与抗生素的抗性直接相关,而只是调节蛋白。

琥珀酰-CoA 合成酶 (*SucC/D*) 为三羧酸循环中的一个关键酶,它催化琥珀酰-CoA 生成琥珀酸的同时,伴随着将 GDP/ADP 磷酸化成 GTP/ATP,这是一个底物水平的磷酸化过程<sup>[33]</sup>。该酶是本文中唯一表达上调的酶,其表达量增加表明底物磷酸化水平增加。在上述分析中已经表明有氧呼吸和厌氧下产能的相关蛋白质的表达均下降,即细胞内的 ATP 在抗生素的作用下大大降低,在这种情况下细菌必须通过加强底物水平磷酸化来提高 ATP 的量供其生长和繁殖<sup>[34]</sup>。当了解了这些能量代谢相关的蛋白质间的关系后,不难解释 Wu 等<sup>[35]</sup> 和 Donnelly 等<sup>[36]</sup> 曾发现的当将 *E. coli* 的 *pfB* 基因缺陷菌株在厌氧下培养时能提高琥珀酸产量这一现象。

尽管 *SucC* 和 *SucD* 是仅有的两个表达增加的蛋白质,但根据 *MIC* 和生存率结果表明,二者在耐药机制中的作用并不完全一致。*sucD* 的 *MIC* 和生存率都比 *sucC* 的低,意味着 *SucD* 对该抗生素更加敏感,它所起的作用更加重要。这种功能差异可能是由于这两个亚基在催化反应中的作用不同造成的。*SucD* (亚基) 为催化亚基,而 *SucC* (亚基) 仅作为琥珀酸的附着位点<sup>[37,38]</sup>。

总之,在这些差异蛋白质中,*MalP*、*A<sub>pd</sub>* 和 *PfB* 的下降表达,*SucC/D* 的上调表达,在头孢曲松抗性中起了关键作用,而这些蛋白质均与能量代谢有关,即细菌可通过调整自身的能量代谢体系来对抗抗生素的作用,从而产生耐药性。这些蛋白质各自参与的代谢路径如 Fig 6 所示。



**Fig 6 The energy metabolic pathway for the key enzymes in respond to cetraxone resistance in *E. coli***

These proteins were highlighted by gray oval which involved in ATP synthesis, maltodextrin transport and phosphorylation, anaerobic homolysis and substrate level of phosphorylation Maltodextrin transport complex, MalEFGK<sub>2</sub>; PDH complex, pyruvate dehydrogenase complex

## 2.6 小结

细菌耐药性的产生对利用抗生素治疗细菌性感染疾病是一个严峻挑战,在对细菌耐药机制进行全面深入研究的基础上开发出新型有效的抗生素分子是解决这一问题的关键之所在。虽然细菌耐药性的产生是一个多成分参与的复杂过程,但随着蛋白质组学技术的产生和飞速发展及更多的细菌基因组序列的测定完成,为细菌耐药性产生机制的研究提供了一种新的、高通量的研究方法。

本文通过比较抗生素头孢曲松处理后大肠杆菌的胞浆蛋白及其复合物的变化来分析这些蛋白质在细菌耐药性产生过程中的作用,以期对大肠杆菌胞浆蛋白与其耐药性的关系进行较为全面的研究分析。头孢曲松为新型头孢霉素,该类抗生素通过与细菌膜上的一种或多种青霉素结合蛋白的结合,抑制转肽酶的转肽作用,使得细菌细胞壁肽聚糖的生物合成受阻,致使细菌膨胀、变形,在自溶酶影响下,细菌破裂溶解而死亡。目前,人们已经了解的耐药机制可能包括 3 个方面:产生 内酰胺酶使抗生素分子失活;改变青霉素结合蛋白靶位使抗生素分子的抑制作用减弱;膜蛋白对抗生素分子的通透性的减小以及主动外排系统加强。本文通过对头孢曲松耐药菌株的胞浆蛋白进行蛋白质组分析,首次揭示细菌还通过改变能量代谢来产生耐药性。细菌细胞壁合成受阻,通过降低麦芽糖苷转运系统和麦芽糖苷磷酸化酶等关键蛋白质的表达以减少对磷酸葡萄糖的利用。葡萄糖减少,导致其糖酵解产物丙酮酸

的量减少,这不仅造成有氧呼吸产能系统三羧酸循环受到影响,而且厌氧下丙酮酸甲酸裂合酶产能也受到影响。最终,细菌通过提高底物水平磷酸化来补充能量。由此可见,细菌通过增加或降低表达一些关键蛋白质对代谢过程进行调整,从而适应抗生素环境。与氨基酸和蛋白质合成有关的蛋白质 CysK 和 LysS 虽不直接参与能量代谢,但 LysS 为抗生素分子的靶位点, CysK 的下降则与能量代谢蛋白质 PflB 的降低有关,二者均为调节蛋白。此外,通过测定 MIC 和生存率进一步分析, MalP 和 SucC 的作用更为重要,因而它们可作为开发新型抗生素分子的蛋白质靶位。

## 参考文献 (References)

- [1] Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes[J]. *Science*, 1994, **264**(5157): 375-382
- [2] Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance[J]. *Cell*, 2007, **128**(6): 1037-1050
- [3] Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, *et al* A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci[J]. *Science*, 2001, **291**(5510): 1962-1965
- [4] Al-Haruni M, Skaug N, Bakken V, *et al* Proteomic analysis of ampicillin-resistant oral *Fusobacterium nucleatum* [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2008, **23**(1): 36-42
- [5] Cash P, Argo E, Ford L, *et al* A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Electrophoresis*, 1999, **20**(11): 2259-2268
- [6] Peng X, Xu C, Ren H, *et al* Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline



- resistance[J]. *J Proteome Res*, 2005, **4**(6): 2257-2265
- [ 7 ] McAtee CP, Hoffman PS, Berg DE Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques [ J ]. *Proteomics*, 2001, **1**(4): 516-521
- [ 8 ] Li H, Lin XM, Wang SY, *et al* Identification and antibody-therapeutic targeting of chloramphenicol-resistant outer membrane proteins in *Escherichia coli*[J]. *J Proteome Res*, 2007, **6**(9): 3628-3636
- [ 9 ] Xu C, Lin X, Ren H, *et al* Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline[J]. *Proteomics*, 2006, **6**(2): 462-473
- [10] Lin XM, Li H, Wang C, *et al* Proteomic Analysis of Nalidixic Acid Resistance in *Escherichia coli*: Identification and Functional Characterization of OM Proteins[J]. *J Proteome Res*, 2008, **7**(6): 2399-2405
- [11] Coldham NG, Woodward MJ. Characterization of the *Salmonella typhimurium* proteome by semi-automated two dimensional HPLC-mass spectrometry: detection of proteins implicated in multiple antibiotic resistance [ J ]. *J Proteome Res*, 2004, **3**(3): 595-603
- [12] Yoo JS, Seong WK, Kim TS, *et al* Comparative proteome analysis of the outer membrane proteins of in vitro-induced multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae* [ J ]. *Microbiol Immunol*, 2007, **51**(12): 1171-1177
- [13] Loughlin MF, Jones MV, Lambert PA. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics [ J ]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, **49**(4): 631-639
- [14] Gillespie AS, Elliott E. Comparative advantages of imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc reverse staining in polyacrylamide gels[J]. *Anal Biochem*, 2005, **345**(1): 158-160
- [15] Castellanos-Serra L, Hardy E. Detection of biomolecules in electrophoresis gels with salts of imidazole and zinc II: a decade of research[J]. *Electrophoresis*, 2001, **22**(5): 864-873
- [16] Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [ J ]. *Electrophoresis*, 2004, **25**(9): 1327-1333
- [17] Zhang GL, Wang GZ, Wang SY, *et al* Applying proteomic methodologies to analyze the effect of hexamethylene bisacetamide (HMBA) on proliferation and differentiation of human gastric carcinoma BGC-823 cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**(8): 1613-1623
- [18] Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M, *et al* Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(6): 2302-2307
- [19] Humbert R, Altendorf K. Defective gamma subunit of ATP synthase (F1F0) from *Escherichia coli* leads to resistance to aminoglycoside antibiotics [ J ]. *J Bacteriol*, 1989, **171**(3): 1435-1444
- [20] Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, *et al* Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance [ J ]. *Cancer Res*, 2005, **65**(8): 3162-3170
- [21] Højlund K, Wrzesinski K, Larsen PM, *et al* Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes [ J ]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(12): 10436-10442
- [22] Levengood J, Ataide SF, Roy H, *et al* Divergence in noncognate amino acid recognition between class I and class II lysyl-tRNA synthetases [ J ]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(17): 17707-17714
- [23] Buklad NE, Sanbon D, Hirshfield N. Particular influence of leucine peptides on lysyl-transfer ribonucleic acid ligase formation in a mutant of *Escherichia coli* K-12[J]. *J Bacteriol*, 1973, **116**(3): 1477-1478
- [24] Hirshfield N, Yeh FM. An *in vivo* effect of the metabolites L-alanine and glycyl-L-leucine on the properties of the lysyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* K-12. II. Kinetic evidence [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **435**(3): 306-314
- [25] L'Écuyer F, Plateau P, Dessen P, *et al* Homology of lysS and lysU, the two *Escherichia coli* genes encoding distinct lysyl-tRNA synthetase species [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(2): 305-312
- [26] Ataide SF, Wilson SN, Dang S, *et al* Mechanisms of resistance to an amino acid antibiotic that targets translation [ J ]. *ACS Chem Biol*, 2007, **2**(12): 819-827
- [27] Levengood J, Ataide SF, Roy H, *et al* Divergence in noncognate amino acid recognition between class I and class II lysyl-tRNA synthetases [ J ]. *J Biol Chem*, 2004, **279**(17): 17707-17714
- [28] Ataide SF, Iba M. Small molecules: big players in the evolution of protein synthesis [ J ]. *ACS Chem Biol*, 2006, **1**(5): 285-297
- [29] Xavier KB, Peist R, Kossmann M, *et al* Maltose metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: purification and characterization of key enzymes [ J ]. *J Bacteriol*, 1999, **181**(11): 3358-3367
- [30] Watson KA, Schinzel R, Palm D, *et al* The crystal structure of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase provides an explanation for the activity without control in this basic archetype of a phosphorylase [ J ]. *EMBO J*, 1997, **16**(1): 1-14
- [31] Atteia A, van Lis R, Gelius-Dietrich G, *et al* Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas mitochondria* [ J ]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(15): 9909-9918
- [32] Wagner AF, Frey M, Neugebauer FA, *et al* The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734 [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(3): 996-1000
- [33] Fraser ME, James MN, Bridger WA, *et al* A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase [ J ]. *J Mol Biol*, 1999, **285**(4): 1633-1653
- [34] Hasona A, Kim Y, Healy FG, *et al* Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia*

- coli on xylose[J]. J Bacteriol, 2004, **186** (22): 7593-7600
- [35] Wu H, Li ZM, Zhou L, *et al* Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli* pfb ldhA double mutant as a result of enhanced anaerobic activities in the preceding aerobic culture [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, **73** (24): 7837-7843
- [36] Donnelly MI, Millard CS, Clark DP, *et al* A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1998, **70-72** (1): 187-198
- [37] Bridger WA, Wolodko WT, Henning W, *et al* The subunits of succinyl-coenzyme A synthetase--function and assembly [J]. Biochem Soc Symp, 1987, **54**: 103-111
- [38] Fraser ME, James MN, Bridger WA, *et al* A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase [J]. J Mol Biol, 1999, **285** (4): 1633-1653

www.cnki.net