

中图分类号: R966; R978.1⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)04-0043-08

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.04.010



HL-J6 抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因转录组学研究^{*}

段浩¹, 刘婧怡², 曹宇¹, 张珊珊¹, 李海波², 马雷^{3,4△}

(1. 佳木斯大学临床医学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 中国人民解放军陆军军医大学药学与检验医学系微生物与生化药学教研室, 重庆 400038; 3. 重庆市沙坪坝区陈家桥医院检验科, 重庆 400038; 4. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:目的 探讨新型吡啶苯醌类化合物 HL-J6 抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)生长的机制。方法 采用微量肉汤稀释法测定 HL-J6 对 MRSA 的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC), 并采用基因转录组测序(RNA-seq)分析 HL-J6 对 MRSA 基因表达的影响, 并通过实时逆转录聚合酶链反应(real-time RT-PCR)进行验证。结果 HL-J6 对 MRSA252 的 MIC 和 MBC 分别为 2 μg/mL 和 8 μg/mL。基因 RNA-seq 结果提示, HL-J6 可能通过影响 *MurA*, *MurD*, *MurG*, *MraY* 等肽聚糖合成相关基因、*dfbB* 等叶酸生物合成相关基因、*pgsA* 等甘油磷脂代谢相关基因、*MntC* 等 ABC 转运相关基因、*SecA* 等细菌分泌系统相关基因以及 *rpsD* 等核糖体相关基因来抑制 MRSA 的生长, real-time RT-PCR 结果证实 HL-J6 下调了 *MurA* 和 *MurD* 的表达。结论 HL-J6 可抑制 MRSA 的生长, 其作用机制可能为抑制肽聚糖、叶酸的生物合成, 甘油磷脂代谢、ABC 转运、细菌分泌系统以及核糖体等相关途径。

关键词: HL-J6; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 基因测序; 转录组学

Gene Transcriptomics Study of HL-J6 Against Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*

DUAN Hao¹, LIU Jingyi², CAO Yu¹, ZHANG Shanshan¹, LI Haibo², MA Lei^{3,4}

(1. School of Clinical Medicine, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, China 154007; 2. Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, Army Medical University, Chongqing, China 400038; 3. Department of Laboratory, Chenjiaqiao Hospital of Shapingba District, Chongqing, China 400038; 4. The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, China 154007)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of the inhibition of the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by a novel indole-benzoquinone compound HL-J6. **Methods** The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal

^{*}基金项目: 国家自然科学基金[31670936]; 重庆市自然科学基金[cstc2020jcyj-zdxmX0027]。

第一作者: 段浩, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为微生物与生化药学, (电子信箱)625231187@qq.com。

[△]通信作者: 马雷, 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为肿瘤生化与分子诊断学, (电子信箱)maleijms@163.com。

量测定方法, 最终以大黄素和大黄酚为指标, 对枳术便秘通丸中大黄质量进行控制。

综上所述, 枳术便秘通丸成型工艺合理, 所建标准可用于制剂的质量控制。

参考文献

- [1] 雷艳群. 便秘的原因与危害[J]. 大健康, 2020(7):52.
- [2] 曹纪伟. “便秘通”对防治恶性肿瘤患者化疗中便秘的临床研究[D]. 泸州: 泸州医学院, 2011.
- [3] WANG PM, HSU CW, LIU CT, et al. Effect of acupressure on constipation in patients with advanced cancer[J]. Support Care Cancer, 2019, 27(9):3473-3478.
- [4] DAVIES A, LEACH C, CAPONERO R, et al. MASCC recommendations on the management of constipation in patients with advanced cancer[J]. Support Care Cancer, 2020, 28(1):23-33.
- [5] FORD AC, BRENNER DM, SCHOENFELD PS. Efficacy of pharmacological therapies for the treatment of opioid-induced constipation: systematic review and meta-analysis[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(10):1566-1575.
- [6] LEMBO AJ, SCHNEIER HA, SHIFF SJ, et al. Two randomized

trials of linaclotide for chronic constipation[J]. N Engl J Med, 2011, 365(6):527-536.

- [7] 陈泽刚, 赵春妮. “便秘通”治疗化疗相关便秘的临床研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(68):167-168.
- [8] 王银, 李跃辉, 蔡萍, 等. 二至丸成型工艺优化[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(5):650-653.
- [9] 马新换, 肖正国, 马琴国, 等. 正交试验优选杞菊地黄丸的干燥工艺[J]. 中医研究, 2012, 25(2):59-61.
- [10] 詹文强, 王炯, 尚佳, 等. 杜仲腰痛浓缩丸制备工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5):71-73.
- [11] 张宪, 李岳. 高效液相色谱法同时测定麻仁丸中大黄素、大黄酚、大黄酸及厚朴酚含量[J]. 国际中医中药杂志, 2019, 41(10):1107-1110.
- [12] 李燕, 邓昭君, 焦宝元. HPLC法同时测定乌金止痛丸中5种成分[J]. 中成药, 2018, 40(12):2681-2684.
- [13] 于文萃, 高毓涛. HPLC法同时测定牛黄清胃丸中四种成分的含量[J]. 吉林化工学院学报, 2020, 37(1):16-19.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:61.

(收稿日期: 2022-04-01; 修回日期: 2022-08-20)

bactericidal concentration (MBC) of HL-J6 against MRSA were determined by the broth microdilution method. The effect of HL-J6 on MRSA gene expression was analyzed by RNA transcriptome sequencing (RNA-seq) and verified by the real-time RT-PCR.

Results The MIC and MBC of HL-J6 against MRSA252 were 2 $\mu\text{g/mL}$ and 8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of gene RNA-seq analysis suggested that HL-J6 might inhibit the growth of MRSA by affecting the peptidoglycan synthesis-related genes such as *MurA*, *MurD*, *MurG*, *MraY*, folic acid biosynthesis-related genes such as *dfiB*, glycerol phospholipid metabolism-related genes such as *pgsA*, ABC transport-related genes such as *MntC*, bacteria secretion system-related genes such as *SecA*, and ribosome-related genes such as *rpsD*. The result of real-time RT-PCR confirmed that HL-J6 down-regulated the expression of *MurA* and *MurD*.

Conclusion HL-J6 can inhibit the growth of MRSA, and its mechanism may be inhibiting peptidoglycan and folic acid biosynthesis, glycerophospholipid metabolism, ABC transport, bacterial secretion system and ribosome-related pathways.

Key words: HL-J6; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; RNA-seq; transcriptomics

金黄色葡萄球菌为葡萄串状的革兰阳性菌,败血症、脓毒血症、坏死性筋膜炎等多种临床疾病都可能由金黄色葡萄球菌感染所致^[1]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是临床常见的耐药菌,其造成的感染已成为世界三大难治感染性疾病之一^[2]。近年来,抗生素滥用导致其对金黄色葡萄球菌的疗效逐渐变差,耐药问题变得十分严重^[3]。万古霉素治疗MRSA不仅会产生耐药性,还会导致低血压、中性粒细胞减少等不良反应,剂量不足和治疗时间延长还会升高最低抑菌浓度(MIC),从而导致疗效欠佳或治疗失败等情况^[4],故常与利福平联用,然而耐利福平金黄色葡萄球菌分离株出现的频率逐年升高,有研究发现,金黄色葡萄球菌对利福平产生耐药性可能与*rpoB*基因的突变相关^[5]。通过基因转录组测序(RNA-seq)技术可了解化合物作用于金黄色葡萄球菌后发生了相应变化的基因,再通过基因本体论(GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析可了解其功能,从而揭示特定生物学过程及疾病发生过程的分子机理。与其他技术相比,RNA-seq有灵敏度高、高通量、高分辨率、成本相对较低等显著优势^[6]。近年来,新型吡啶苯醌类药物HL-J6被认为具备高MRSA抑制性能。该药物对MRSA有抗菌活性,具备一定的临床应用价值,有望为临床防治MRSA提供新思路、新途径。但其抗菌的具体机制尚未明晰。因此,本研究中采用RNA-seq技术对经药物处理和未经处理MRSA菌株的基因转录组水平进行分析后,根据NCBI,UniProt等网站的功能注释,对表达产生变化的基因进行研究,从而探讨HL-J6抑制MRSA可能的机制。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂与菌株

仪器:HFSAFE-1500型生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司);ZWY-211C型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);CFX96 Touch型荧光定量聚合酶链反应仪(伯乐科技有限公司)。

试剂:苯唑西林(北京索莱宝生物科技有限公司,

批号为O8350);头孢唑林(上海吉至生化科技有限公司,批号为C29510);氨苄西林(上海生工生物工程股份有限公司,批号为A610028-0025);万古霉素(上海易恩化学技术有限公司,批号为1404-93-9);利奈唑胺(批号为L830356)、莫匹罗星(批号为M812891),均购自上海麦克林生化科技有限公司;HL-J6(四川大学华西药学院何菱教授团队合成);MHB培养基(北京索莱宝科技有限公司,批号为M8556)。

菌株:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌MRSA252;甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)标准菌株ATCC25923,均购于美国菌种保藏中心(ATCC)。

1.2 方法

菌株培养:从-80℃冰箱中取出甘油保种冻存的MRSA252和ATCC25923,分别接种至MHB固体培养基中,37℃培养24h,随后挑取单菌落接种至MHB液体培养基中,37℃培养过夜,取200 μL 菌液至20 mL培养基中,37℃摇动培养5~6h(此时细菌活力最强),备用。

MIC和最低杀菌浓度(MBC)测定:采用微量肉汤稀释法检测苯唑西林、头孢唑林、氨苄西林、万古霉素、莫匹罗星、利奈唑胺、HL-J6对上述2种菌株的MIC。将2种菌株菌液稀释至 10^5 cfu/mL ,取196 μL 于96孔板中,随后加入4 μL 上述各药液稀释,使其最终质量浓度为128.0,64.0,32.0,16.0,8.0,4.0,2.0,1.0,0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。37℃培养24h后,肉眼观察MHB培养基的浑浊度,无浑浊时的药液最低质量浓度即为该药物的MIC^[7]。吸取肉眼观察无细菌生长的96孔板中的液体100 μL ,接种至MHB培养皿中,培养过夜,观察培养皿上的菌落数^[7],以无细菌生长固体培养基对应的药液质量浓度为MBC。

细菌样本制备及RNA-seq:首先,挑取三段划线法接种的MRSA252单菌落,接种至MHB液体培养基中活化后,取200 μL 菌液加入20 mL培养基中,37℃振荡培养5~6h。随后分别取4 mL菌液,各依次加入0.5,0.625,0.75,0.875,1倍MIC的HL-J6,37℃振荡培养3h,由于0.75倍MIC是不抑制细菌生长的最高药物

质量浓度,故取加入0.75倍MIC的菌液2 mL作为实验组放入保种管中急冻,并与对照组(未经任何药物处理的菌液)一起交由诺禾致源公司进行RNA-seq。为保证分析数据质量,首先筛选数据,即过滤原始数据中低质量的读数,使clean reads所占比例不低于80%。测定并计算鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)含量以检测有无A(腺嘌呤)和T(胸腺嘧啶)、GC分离现象(该现象可能由测序或建库造成,且会影响后续的定量分析),GC含量>65%或<35%时均会增加测序难度。测序错误率可反映数据质量,通常Q20>90%,Q30>85%为正常情况。

富集分析:包括GO富集和KEGG通路富集分析。其中GO富集分析包括生物过程、细胞组成、分子功能3个部分。通过对差异基因的分析,可了解经HL-J6处理的MRSA在遗传水平上的变化;通过KEGG通路富集分析可了解经HL-J6处理后差异基因所富集的通路,根据通路中各基因表达的变化从而推测出该药物对MRSA产生的影响以及药物对MRSA作用的方式。

实时逆转录聚合酶链反应(real-time RT-PCR):该方法对基因的相对表达量进行评估以验证RNA-seq数据。首先用RNAprep pure Cell / bacteria Kit RNA-prep pure来提取MRSA252的总RNA,再用TaKaRa primeScript™ RT Reagent Kit将RNA反转录成cDNA,最后,使用TaKaRa SYBR Premix Ex Taq进行real-time RT-PCR。所用基因及引物见表1。

表1 基因及引物

Tab. 1 Gene and primer sequences

基因	引物序列
<i>MurA</i> F	5'-TGTGCACCTTGCAATTGACT-3'
<i>MurA</i> R	5'-CCGTTTATGTCATGTTGCAG-3'
<i>MurD</i> F	5'-AGCCTACAGATTATTTAGTTACAGACT-3'
<i>MurD</i> R	5'-TAAATGTTAGTAATTATAGCAATGTGTG-3'
<i>16sRNA</i> F	5'-GGGACCCGCACAAGCGGTGG-3'
<i>16sRNA</i> R	5'-GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA-3'

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件分析,Graphpad Prism 9.0软件作图。两组间比较行t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIC和MBC

前述7种药物对ATCC25923的MIC分别为2,2,32,1,0.5,1,4 $\mu\text{g/mL}$,MBC分别为4,4,32,2,0.5,1,8 $\mu\text{g/mL}$;对MRSA252的MIC分别为>128,>128,128,0.5,1,0.5,2 $\mu\text{g/mL}$,MBC分别为>128,>128,128,1,1,1,

8 $\mu\text{g/mL}$ 。说明HL-J6不仅可抑制MSSA,还可抑制MRSA的生长,虽然其MIC高于万古霉素、利奈唑胺等临床一线药物,但仍有较强的抑菌效果。

2.2 转录组谱的一般特征

本研究中,对照组(样本编号a,b,c)和实验组(样本编号d,e,f)的cDNA文库中分别得到了24,150,404和24,70,982个clean reads。

2.3 GC含量和测序错误率情况

结果见表2。

表2 测序数据质量情况

Tab. 2 Quality of sequencing data

样本编号	Raw reads	Clean reads	Clean bases	Error rate(%)	Q20(%)	Q30(%)	GC含量(%)
a	7888946	7823918	1.2G	0.03	96.82	91.38	37.58
b	7993450	7943700	1.2G	0.03	96.81	91.05	36.52
c	8343636	8303364	1.2G	0.03	96.65	90.69	35.51
d	7628034	7591164	1.1G	0.03	96.96	91.35	35.47
e	7815416	7776890	1.2G	0.03	96.45	90.27	35.73
f	8842844	8782350	1.3G	0.03	96.56	90.59	35.57

2.4 MRSA中的差异表达基因

为明确HL-J6处理前后MRSA252中基因表达的变化, $|\log_2(\text{fold change})| > 0.264$ (即 $|\text{fold change}| > 1.208$)且 $P < 0.05$ 为有差异的基因。结果差异基因共630个,其中包括288个表达上调基因,342个下调基因。在差异表达的基因中, $|\log_2(\text{fold change})| > 2$ 的差异基因共25个,其中14个表达显著上调,11个显著下调,见图1A。

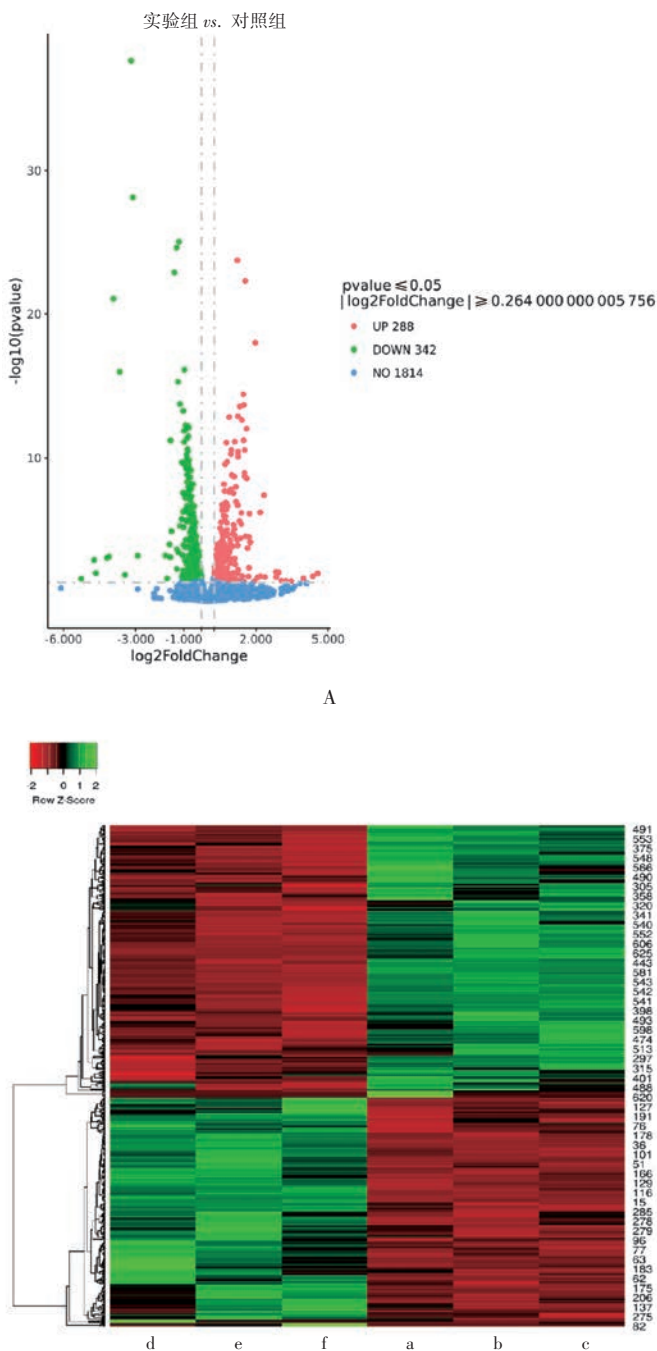
2.5 差异基因聚类分析

聚类分析用以衡量基因或样本之间表达是否有相似性,分析结果见图1B,表达模式相近的基因或样本会被聚在一起,这些基因可能参与了共同的信号通路,也可能有相同功能。在聚类图中,横坐标代表样本的聚类,每列都代表1个样本,样本中基因表达越相似,则会越靠近。纵坐标代表基因聚类,每行代表1个基因,同样,表达越相似,越靠近。

2.6 富集分析

差异基因GO富集分析结果见图2A(图中展示了较显著的30个条目)。KEGG通路富集中,实验组共富集到62条通路,其中较显著的20条通路见图2B。与MRSA生长有关的通路如下。

HL-J6影响肽聚糖生物合成相关通路:结果见图3。金黄色葡萄球菌的细胞壁是由肽聚糖和磷壁酸组成的,某些抗生素,例如磷霉素可通过干扰肽聚糖的生物合成来抑制MRSA的生长。在经过HL-J6处理后,发现肽聚糖生物合成相关基因发生了变化。其中,UDP-N-乙酰氨基葡萄糖烯醇式丙酮酸转移酶(*MurA*)下调1.77倍,



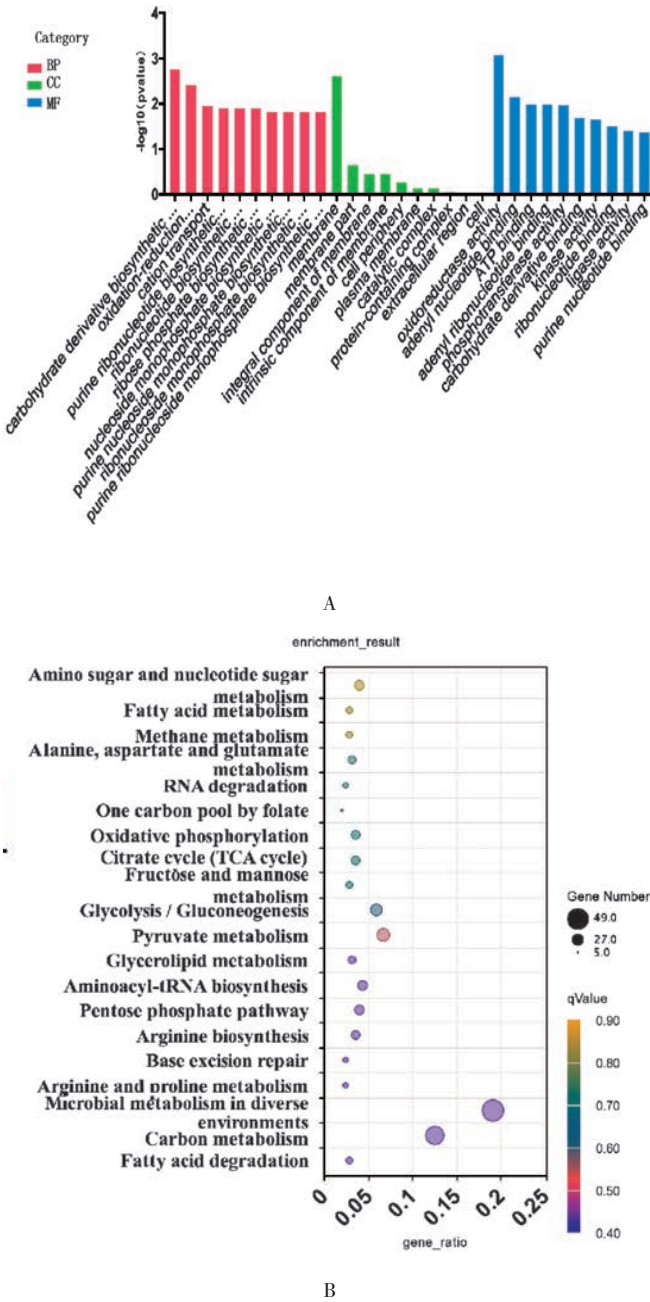
A. 火山图 B. 聚类图
图 1 差异基因的特征

A. Volcano map B. Cluster map

Fig. 1 Characteristics of differential genes

MurD 下调 1.28 倍, *MraY* 和 *MurG* 分别下调 1.27 倍和 1.35 倍。说明 HL-J6 可能通过干扰细胞壁合成而抑制 MRSA 的生长。

HL-J6 影响叶酸生物合成途径: 叶酸在合成代谢中起到了不可或缺的作用, 其可为核苷酸和氨基酸的生物合成提供不同氧化水平的单碳单位^[8]。其中, 二氢



A. GO 富集 B. KEGG 通路富集
图 2 差异基因富集分析

A. GO enrichment B. KEGG pathway enrichment

Fig. 2 Enrichment analysis of differential genes

叶酸还原酶 (DHFR) 是一种催化二氢叶酸 (DHF) 为四氢叶酸 (THF) 的酶, 它在叶酸合成和 DNA 复制中是必需的, 也是常见的抗生素靶点^[9]。如图 4A 所示, *dhfrB* 编码 DHFR, 该基因与对照组相比表达下调 1.70 倍, 由此推断, HL-J6 可能通过抑制 DHFR 从而抑制叶酸的合成, 进而对 MRSA 产生杀伤作用。

HL-J6 影响甘油磷脂代谢: 磷脂酰甘油 (PG) 是存在于细菌以及动植物中的关键阴离子, 在金黄色葡萄球菌中的含量十分丰富, 同样也是金黄色葡萄球菌细

PEPTIDOGLYCAN BIOSYNTHESIS

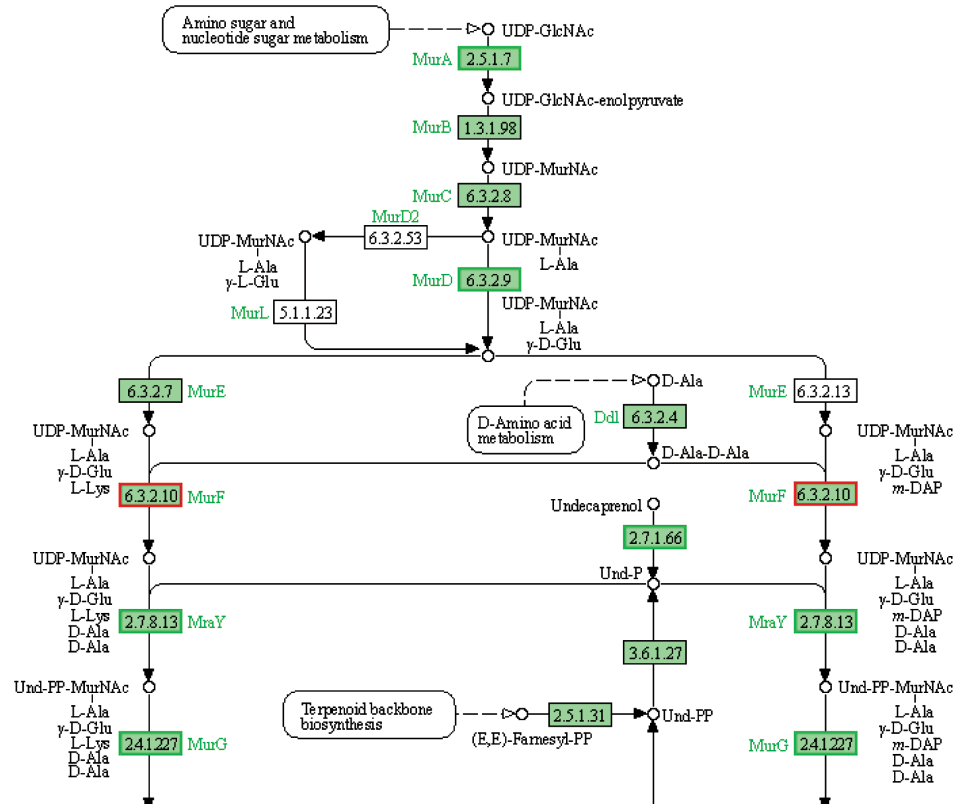
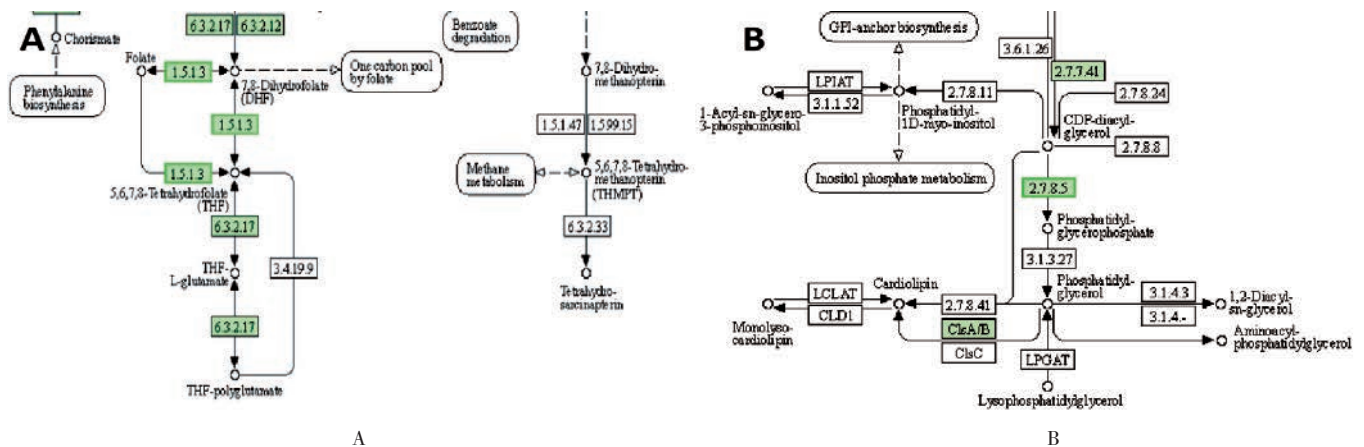


图 3 HL - J6 影响的肽聚糖生物合成相关通路

Fig. 3 Peptidoglycan biosynthesis - related pathways affected by HL - J6



A. 叶酸生物合成途径 B. 甘油磷脂代谢

图 4 HL - J6 影响的 KEGG 通路

A. Folic acid biosynthesis pathway B. Glycerol lipid metabolism

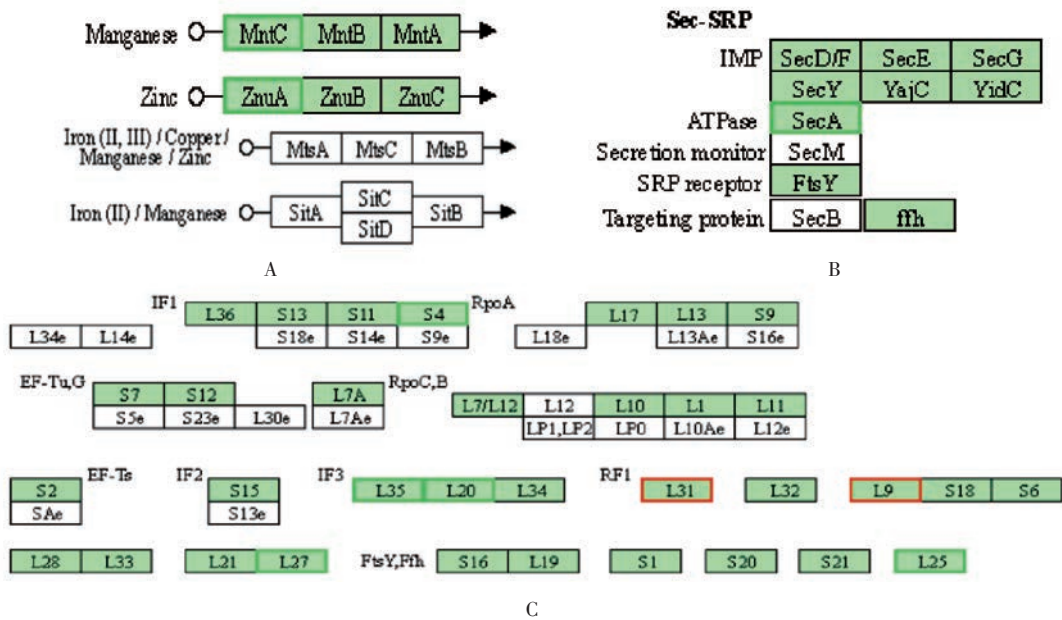
Fig. 4 KEGG pathway affected by HL - J6

胞膜的主要成分。磷脂酰甘油磷酸合酶(*pgsA*)定位于细胞膜上,是 PG 合成的关键酶,从图 4B 中可知,*pgsA* 表达下调 1.33 倍。

HL - J6 影响 ABC 转运途径:ABC 家族几乎存在于所有生物中,参与细胞内外物质的转运,各种各样的 ABC 转运蛋白有助于细菌运输对自己有利的物质而排出对自己不利的物质^[10]。*MntC* 为金属结合蛋白,与细

菌必需的金属离子 Mn^{2+} 相结合。由图 5A 可知,与对照组相比 *MntC* 表达下调 1.48 倍。同时,*SAOUHSC_01991*、*SAOUHSC_01990* 分别下调 8.69、9.09 倍。

HL - J6 影响细菌分泌系统:Sec 依赖性蛋白转位酶由 *SecYEG* 和 *SecDF*•*YajC* 作为膜蛋白的寡聚体复合物组成,而 *SecA* 作为 ATP 酶发挥作用,它是一种定位于细胞质和细胞膜上的可溶性蛋白质^[11],为 Sec 依赖



A. ABC转运途径 B. 细菌分泌系统 C. 核糖体途径

图5 HL-J6影响的KEGG通路

A. ABC transport route B. Bacterial secretory system C. Ribosomal pathway

Fig. 5 KEGG pathway affected by HL-J6

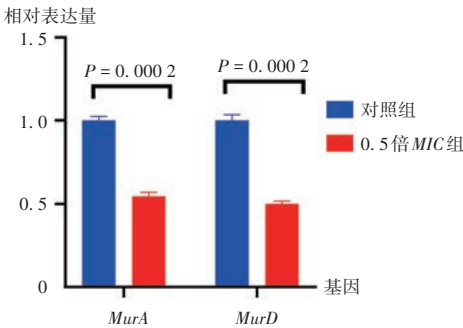


图6 *MurA*、*MurD*的相对表达量

Fig. 6 Relative expression quantity of *MurA* and *MurD*

性蛋白转位提供能量^[12-13]。结果见图5B,其中*SecA*表达下调1.62倍。

HL-J6影响核糖体途径:核糖体在细菌中负责蛋白质合成,它由亚基50S和30S组成,其中50S亚基为大亚基,由23s和5sRNA以及其他蛋白质组成;而30S亚基为小亚基,由16sRNA和另外20个蛋白质组成。假如细菌蛋白质的合成过程被打断,其生长就会受到相应影响,所以细菌的核糖体就显得尤为重要。经研究发现,实验组核糖体合成相关基因*rpsD*、*rplM*、*rplT*等分别下调1.23、1.68、1.64倍,提示HL-J6可能通过作用于细菌蛋白质合成相关的基因来杀灭细菌,如图5C所示。

2.7 real-time RT-PCR 验证

经验证后,0.5倍MIC组与对照组相比,细胞壁相关基因*MurA*和*MurD*表达均显著下调,说明化合物HL-J6可通过抑制MRSA细胞壁的生长而抑制该细菌活力。详

见图6。

3 讨论

金黄色葡萄球菌严重危害人类健康^[14],可定殖于人体各部位,且对多药具有耐药性,这也是目前其感染后久治不愈的原因,故被称为“超级细菌”。目前,公认对其疗效较好的药物为万古霉素,但近年来耐万古霉素的菌株不断出现,传统抗生素或已不能满足临床治疗需求。

本研究中发现,HL-J6对MRSA的确存在良好的抑菌效果,验证实验结果表明,与对照组相比,0.5倍MIC组的*MurA*、*MurD*基因表达下调,与RNA-seq结果一致。并重点讨论了差异基因经KEGG富集分析所得通路。

细菌细胞壁的主要成分为肽聚糖^[15],是由短肽聚合而成的多层网状结构,又称球囊。球囊既可参与细菌的生长和分裂,又可保护细菌形态的完整性;且有研究发现,肽聚糖的生物合成途径可作为抗生素的靶点之一。*MurA*是肽聚糖进行生物合成第一步反应的催化酶,它可催化UDP-N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)与磷酸烯醇丙酮酸(PEP)反应生成UDP-N-乙酰氨基葡萄糖烯醇丙酮酸盐^[16]。CHABÁN等^[17]研究发现化合物鼠尾草酚、鼠尾草酸20-甲基、鼠尾草酸-γ-内酯对金黄色葡萄球菌的抗菌作用与*MurA*有关,因此*MurA*可能成为研发新型抗生素的一个良好药物靶点。在本研究中,HL-J6作用于MRSA后,*MurA*表达也呈

下调趋势,说明HL-J6有可能通过抑制 *MurA* 来阻断MRSA的生长。另外,*MraY*通过催化磷酸-MurNAc-五肽从UDP-MurNAc-五肽转移和附着到脂质载体十一碳烯磷酸酯上,从而形成UMP和十一碳二烯二磷酸-MurNAc-五肽,说明在肽聚糖的生物合成过程中,*MraY*对细菌生存也存在重要影响,是目前抗菌药物的候选靶点之一^[18]。KWAK等通过制备基于环戊烷的莫雷霉素类似物发现类似物20(JH-MR-23)可有效抑制*MraY*,对金黄色葡萄球菌有抑制作用。该研究通过对类似物的SAR分析表明,亲脂性侧链对于抑制*MraY*和抗菌有十分重要的作用^[19]。根据RNA-seq的结果,MRSA生存相关肽聚糖合成基因*MraY*与对照组相比下调达1.27倍。因此HL-J6很可能通过干扰细胞壁的合成从而影响MRSA生存。但具体是何结构导致了*MraY*,*MurA*的下调,将在后续实验中进一步探讨。

除细胞壁合成相关基因外,叶酸合成相关基因也有所下调。叶酸是所有细菌生长所必需的一种重要物质,因此参与细菌叶酸合成的关键酶可能成为抗菌药物作用的靶点之一^[20]。已有研究发现,甲氧苄啶(TMP)和磺胺甲噁唑均可抑制细菌叶酸合成,然而,ZANDER等^[21]发现,上述抗生素对叶酸的抑制可因细菌对胸苷的利用而产生拮抗作用,从而导致治疗失败。只有与核苷类似物联用并在胸苷存在的情况下,才有杀菌活性。根据NCBI可知*dhfrB*编码DHFR,该基因在本次实验中下调1.70倍。在后续实验中,将会继续探究胸苷在本药物抑制叶酸中是否存在影响,若产生了影响,则会考虑与其他药物联用以克服这种影响。

腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ABC转运蛋白)是一组跨膜糖蛋白,在许多生理生化过程中扮演重要角色^[22]。*MntC*即为ABC转运蛋白系统成分之一,由309个氨基酸组成,分子质量为34.7 kDa,是一种表面蛋白,具有锰转运蛋白和黏附素活性^[23]。HANDKE等^[24]通过测定甲基紫精(一种可产生胞内超氧自由基的化合物)的MIC来评估*MntC*对金黄色葡萄球菌氧化应激的抵抗力,该实验表明,*MntC*的失活导致两种金黄色葡萄球菌株对甲基紫精的敏感性增加,而*MntC*未失活的菌株都表现出对甲基紫精的抵抗性。AHUJA等^[25]利用工程抗体片段抑制*MntC*的活性,发现金黄色葡萄球菌对氧化应激的敏感性同样有所增加,这更加说明HL-J6可能通过ABC转运途径阻碍金黄色葡萄球菌生长。

金黄色葡萄球菌细胞膜由PG、赖氨酸磷脂酰甘油以及心磷脂等多种脂质组成^[26]。虽然未发现赖氨酸磷脂酰甘油、心磷脂相关基因的变化,但PG相关基因*PgsA*发生了下调。其中,*pgsA*位于细菌的细胞膜上,是PG合

成的关键酶,位于胞膜和胞质之间,可将胞苷二磷酸-二酰基甘油(CDP-DAG)转化为磷脂酰甘油磷酸(PGP),PGP被磷酸酶去磷酸化,去除末端磷酸基团从而产生PG^[27]。LU等^[28]通过蛋白质谱、转录谱发现己苯乙酸(CSA)类似物化合物5b正是以*pgsA*为靶点,对细菌膜产生影响从而产生抗菌活性。因此,*pgsA*可能为HL-J6的靶点。

除上述基因的下调外,本研究中还发现*SecA*也有一定的下调。*SecA*负责分泌一些重要的蛋白质,在细菌中高度保守,对细菌的生长有重要影响^[29]。CUI等^[30]的研究表明,孟加拉玫瑰红或二碘曙红(RB)类似物是*SecA*的抑制剂,对N315, Mu3, Mu50 3种金黄色葡萄球菌株均有良好的抑菌作用。而另一种*SecA*抑制剂SCA-50的MIC为4 μg/mL,也有良好的抑菌作用。因此,*SecA*是非常有效的MRSA抗菌靶点。在我们的研究中,*SecA*同样有所下调,说明HL-J6可能为*SecA*的抑制剂。

此外,负责核糖体合成的相关基因*rpsD*,*rpmI*,*rplT*也发生了下调,说明本次药物的作用靶点还可能有*rpsD*,*rpmI*,*rplT*。细菌的细胞内存在许多核糖体,它们负责细菌蛋白质的生物合成^[31],在细菌中,50S和30S亚基一起组成了70S核糖体,30S亚基结合mRNA并促进解码,而50S亚基的作用为催化肽基转移中心(PTC)处的肽键形成^[32]。有研究表明,利奈唑胺是针对金黄色葡萄球菌的有效药物,该药物的靶点即为50S和30S亚基,它可通过影响氨酰-tRNA与50S亚基的结合来杀灭金黄色葡萄球菌^[33]。因此,HL-J6对MRSA的抑制作用可能与核糖体合成的相关基因*rpsD*,*rpmI*,*rplT*的下调有关。

另外,在本研究中还发现了上调基因SAOUHSC_00202及SAOUHSC_02258,下调基因SAOUHSC_02925, SAOUHSC_02426, SAOUHSC_00718, SAOUHSC_01292等基因编码假设蛋白。其功能目前尚未确定,它们在HL-J6抑制金黄色葡萄球菌过程中所起的作用还有待深入研究。

综上所述,新型唑啉苯醌类药物HL-J6可以较低质量浓度对金黄色葡萄球菌产生杀伤作用。推测该药物的机制可能是通过干扰细胞壁的合成、影响DHFR的合成、影响蛋白质的合成和影响细菌细胞膜重要组分的合成来抑制MRSA生长。

参考文献

- [1] JENUL C, HORSWILL AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(2): 669-686.
- [2] 李曼,谢宁,沈毅,等. 万古霉素与利奈唑胺治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肺部感染的成本-效果分析[J]. 中国

- 药业, 2022, 31(16): 107 – 109.
- [3] 屠银芳, 付燕, 朱燕, 等. 妇幼感染中金黄色葡萄球菌的耐药性与抗菌药物相关性分析[J]. 中国药业, 2020, 29(4): 53 – 56.
- [4] BRUNIERA FR, FERREIRA FM, SAVIOLLI LR, et al. The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: a review[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(4): 694 – 700.
- [5] ZHOU WJ, SHAN WL, MA XL, et al. Molecular characterization of rifampicin – resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a Chinese teaching hospital from Anhui, China[J]. BMC Microbiol, 2012, 12: 240.
- [6] 杜智慧. 基于 RNA – Seq 筛选抗绵羊肺炎支原体差异表达基因[D]. 石河子: 石河子大学, 2018.
- [7] WANG X, SHEN Y, THAKUR K, et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Molecules, 2020, 25(17): 3955.
- [8] BRYANT AE, GOMI S, KATAHIRA E, et al. The effects of iclaprim on exotoxin production in methicillin – resistant and vancomycin – intermediate *Staphylococcus aureus* [J]. J Med Microbiol, 2019, 68(3): 456 – 466.
- [9] LADE H, KIM JS. Bacterial Targets of Antibiotics in Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(4): 398.
- [10] 王龙. 染料木素影响 MRSA 蛋白表达的差异性分析及相关耐药蛋白介导细菌耐药的机制[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2019.
- [11] CABELLI RJ, DOLAN KM, QIAN LP, et al. Characterization of membrane – associated and soluble states of SecA protein from wild – type and SecA51(TS) mutant strains of *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 1991, 266(36): 24420 – 24427.
- [12] MORI H, ITO K. The Sec protein – translocation pathway[J]. Trends Microbiol, 2001, 9(10): 494 – 500.
- [13] CHAUDHARY AS, CHEN W, JIN J, et al. SecA: a potential antimicrobial target[J]. Future Med Chem, 2015, 7(8): 989 – 1007.
- [14] 王路路, 权春善, 许永斌, 等. 金黄色葡萄球菌 arl 双组分信号转导系统受体蛋白 ArlS_(CA) 的表达、纯化及活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(11): 52 – 58.
- [15] MONTEIRO JM, COVAS G, RAUSCH D, et al. The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5010.
- [16] SILVER LL. Fosfomycin: Mechanism and Resistance [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7(2): a025262.
- [17] CHABÁN MF, HRAST M, FRLAN R, et al. Inhibition of MurA Enzyme from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Diterpenes from *Lepechinia meyenii* and Their Synthetic Analogs[J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(12): 1535.
- [18] CHUNG BC, ZHAO J, GILLESPIE RA, et al. Crystal structure of MraY, an essential membrane enzyme for bacterial cell wall synthesis[J]. Science, 2013, 341(6149): 1012 – 1016.
- [19] KWAK SH, LIM WY, HAO A, et al. Synthesis and evaluation of cyclopentane – based muraymycin analogs targeting MraY[J]. Eur J Med Chem, 2021, 215: 113272.
- [20] FERNÁNDEZ – VILLA D, AGUILAR MR, ROJO L. Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 4996.
- [21] ZANDER J, BESIER S, ACKERMANN H, et al. Synergistic antimicrobial activities of folic acid antagonists and nucleoside analogs[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(3): 1226 – 1231.
- [22] THEODOULOU FL, KERR ID. ABC transporter research: going strong 40 years on[J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43(5): 1033 – 1040.
- [23] SALAZAR N, CASTIBLANCO – VALENCIA MM, DA SILVA LB, et al. *Staphylococcus aureus* manganese transport protein C (MntC) is an extracellular matrix – and plasminogen – binding protein[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112730.
- [24] HANDKE LD, GRIBENKO AV, TIMOFEYEVA Y, et al. MntC – Dependent Manganese Transport Is Essential for *Staphylococcus aureus* Oxidative Stress Resistance and Virulence[J]. MSphere, 2018, 3(4): e00336 – 18.
- [25] AHUJA S, ROUGÉ L, SWEM DL, et al. Structural analysis of bacterial ABC transporter inhibition by an antibody fragment[J]. Structure, 2015, 23(4): 713 – 723.
- [26] KUHN S, SLAVETINSKY CJ, PESCHEL A. Synthesis and function of phospholipids in *Staphylococcus aureus* [J]. Int J Med Microbiol, 2015, 305(2): 196 – 202.
- [27] YANG B, YAO H, LI D, et al. The phosphatidylglycerol phosphate synthase PgsA utilizes a trifurcated amphipathic cavity for catalysis at the membrane – cytosol interface [J]. Curr Res Struct Biol, 2021, 3: 312 – 323.
- [28] LU K, HOU W, XU XF, et al. Biological evaluation and chemoproteomics reveal potential antibacterial targets of a cajanin stilbene – acid analogue[J]. Eur J Med Chem, 2020, 188: 112026.
- [29] NATALE P, BRÜSER T, DRIESSEN AJ. Sec – and Tat – mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane — distinct translocases and mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(9): 1735 – 1756.
- [30] CUI J, JIN J, CHAUDHARY AS, et al. Design, Synthesis and Evaluation of Triazole – Pyrimidine Analogues as SecA Inhibitors[J]. Chem Med Chem, 2016, 11(1): 43 – 56.
- [31] 华欣. 绵马酚抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性及机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [32] LIU Q, FREDRICK K. Intersubunit Bridges of the Bacterial Ribosome[J]. J Mol Biol, 2016, 428(10 Pt B): 2146 – 2164.
- [33] HASHEMIAN SMR, FARHADI T, GANJPARVAR M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 1759 – 1767.

(收稿日期: 2022 – 09 – 01; 修回日期: 2022 – 12 – 13)