

文章编号: 1001-8689(2023)05-0554-09

奥替溴铵抑制革兰阳性菌生长与生物被膜形成的活性及机制研究

温泽文^{1,2} 陈程纯² 沈宗霖² 邓向斌^{1,2} 邓启文^{1,2} 余治健^{1,2,*}

(1 深圳大学医学部生物医学工程学院 广东省生物医学信息检测与超声成像重点实验室, 深圳 518073;

2 华中科技大学协和深圳医院 深圳市内源性感染重点实验室, 深圳 518052)

摘要: **目的** 探究奥替溴铵抑制革兰阳性菌生长及抑制生物被膜活性和作用机制。**方法** 采用肉汤稀释法测定奥替溴铵对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌和无乳链球菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 并通过生长曲线分析奥替溴铵对浮游菌生长的影响, 杀菌曲线评估奥替溴铵杀菌活性; 结晶紫染色生物被膜含量测定和激光共聚焦显微镜检测奥替溴铵的抗生物被膜活性; 定量蛋白质组学研究奥替溴铵对金黄色葡萄球菌的抗菌机制。**结果** 奥替溴铵对革兰阳性菌表现出广谱抗菌活性和杀菌活性, MIC₉₀ ≤ 12.5 μmol/L, 奥替溴铵在1/2×MIC浓度时对细菌生长有显著的抑制作用; 此外, 奥替溴铵能够以剂量依赖形式抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成, 同时可灭杀成熟生物被膜中的细菌; 蛋白质组分析显示奥替溴铵处理能够显著抑制细菌初级代谢过程, 诱导过氧化应激。**结论** 奥替溴铵对革兰阳性菌具有较佳的抗菌活性和抗生物被膜活性, 通过抑制细菌初级代谢和引发过氧化应激达到抑菌效果。

关键词: 老药新用; 奥替溴铵; 革兰阳性菌; 生物被膜; 抗菌活性

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Antibacterial and anti-biofilm activities of otilonium bromide and its antibacterial mechanism against Gram-positive bacteria

Wen Ze-wen^{1,2}, Chen Cheng-chun², Shen Zong-lin², Deng Xiang-bin^{1,2}, Deng Qi-wen^{1,2}, and Yu Zhi-jian^{1,2}

(1 Guangdong Key Laboratory for Biomedical Measurements and Ultrasound Imaging, School of Biomedical Engineering, Shenzhen University Health Science Center, Shenzhen 518073; 2 Department of Infectious Diseases and Shenzhen Key Laboratory for Endogenous Infections, Huazhong University of Science and Technology Union Shenzhen Hospital, Shenzhen 518052)

Abstract Objective This study aims to explore antibacterial and anti-biofilm activities of otilonium bromide and its antibacterial mechanism against Gram-positive bacteria. **Methods** The MIC of otilonium bromide against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Streptococcus agalactiae* was determined by the broth dilution method, and the inhibitory effect of otilonium bromide on the growth of planktonic cells was assessed by growth curve. Crystal violet staining and confocal laser scan microscopy were performed to evaluate the anti-biofilm activity of otilonium bromide. The antibacterial mechanism of otilonium bromide against *S. aureus* was studied by quantitative proteomics. **Results** The MIC₉₀ of otilonium bromide against all Gram-positive bacteria tested were all ≤ 12.5 μmol/L, otilonium bromide significantly inhibited the growth of

收稿日期: 2022-01-28

基金项目: 深圳市科技创新委课题资助(No. JCYJ20180302144340004和No. JCYJ20180302144345028); 南山区卫生科技项目(No. NS2021117)

作者简介: 温泽文, 男, 生于1987年, 博士, 主要从事抗菌化合物作用机制研究, E-mail: wenzw05@163.com

*通讯作者, E-mail: yuzhijiansmu@163.com

planktonic cells at subinhibitory concentration of $1/2 \times \text{MIC}$ concentration. In addition, otilonium bromide could inhibited the biofilm formation of *S. aureus* in a dose-dependent manner as well as killed bacteria embedded in mature biofilm. Proteomic analysis showed that otilonium bromide significantly inhibited the primary metabolic process and induced oxidative stress response. **Conclusion** Otilonium bromide exhibited antibacterial and anti-biofilm activities against Gram-positive bacteria, and the antibacterial mechanisms of otilonium bromide against otilonium bromide may be related to disrupting the primary metabolic process and inducing oxidative stress.

Key words Drug repurposing; Otilonium bromide; Gram-positive bacteria; Biofilm; Antibacterial activity

革兰阳性菌(包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌等)是社区感染和院内感染的常见病原菌^[1]。革兰阳性菌对抗生素表现出固有耐药和获得性耐药,随着抗菌药物的广泛使用,近年来革兰阳性菌对顶级抗生素(包括万古霉素、利奈唑胺、达托霉素等)耐药的相关报道逐渐增加,给临床抗感染治疗带来严峻挑战^[2-3]。如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的检出率不断上升,在世卫组织抗生素耐药“重点病原体”清单中处于高度优先地位^[4]。此外,常见革兰阳性细菌治疗另一难点问题是较高比例容易形成生物被膜,也是临床治疗革兰阳性菌感染效果不佳的重要原因之一^[5]。生物被膜的形成可降低对抗菌药物的敏感性,并逃避宿主免疫细胞的攻击和吞噬,当抗生素浓度下降时,细菌会增殖重新填充生物膜,并脱落到周围组织和血液中,导致复发,造成慢性感染和迁延不愈^[6]。因此,开发既能抑制细菌生长又能抑制生物被膜形成的新型抗金葡菌感染药物已经成为当前的研究热点方向之一^[7]。

鉴于全新抗菌药物研发面临周期长,投入大,风险高的挑战,近年来,筛选鉴定已批准临床药物的抑菌活性成为新型抗菌药物研发的一种新策略^[8]。通过这种老药新用的方法发现的药物因具有全面的毒理学和药理学信息,可以降低新药开发的成本和时间,加快其在临床治疗中的应用^[9]。

在对临床化合物库的抑菌活性筛选过程中,我们发现解痉类药物奥替溴铵(otilonium bromide)对多种革兰阳性菌表现出广谱的生长抑制作用。本文深入研究了奥替溴铵对多种革兰阳性菌的抗菌活性及抗生物被膜活性;通过奥替溴铵对浮游菌生长曲线、杀菌曲线和蛋白质组的影响,初步探讨奥替溴

铵对革兰阳性菌的作用机制,为奥替溴铵的老药新用和基于以奥替溴铵为先导结构的抗菌药物的开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本研究中共使用的40株金黄色葡萄球菌,包括20株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)和20株MRSA、20株表皮葡萄球菌、20株粪肠球菌、20株屎肠球菌和10株无乳链球菌临床株收集于2015年至2018年华中科技大学协和深圳医院不同住院患者。所有临床菌株都通过Phoenix 100自动微生物鉴定系统鉴定,继代培养后采用基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对所有菌株进行重新鉴定。质量控制菌株金黄色葡萄球菌ATCC29213和SA113均购自ATCC菌株库。

1.1.2 主要仪器和试剂

微量移液器(德国Eppendorf公司), Phoenix-100全自动细菌鉴定/药敏系统(美国BD公司), 全自动生物质谱检测系统IVD MALDI Biotyper(德国Bruker公司), 全自动生长曲线分析仪(芬兰Bioscreen公司), Q Exactive Plus液质联用仪(LC-MS/MS, 美国ThermoFisher Scientific公司), 激光扫描共聚焦显微镜FV3000(日本Olympus公司)。奥替溴铵(美国MedChemExpress公司), 结晶紫(北京索莱宝科技有限公司), 葡萄糖(北京索莱宝科技有限公司), RIPA裂解液(上海翌圣生物科技股份有限公司), Micro BCA 蛋白定量试剂盒(美国ThermoFisher Scientific公司), Complete protease inhibitor cocktail蛋白酶抑制剂(瑞士Roche公司), DTT(大连美仑生物有限公司), 破碎珠(美国Biospec公司, 货号: 11079101z)。

1.2 方法

1.2.1 微量肉汤稀释法检测最低抑菌浓度(MIC)

取过夜培养菌液调整至 1.5×10^8 CFU/mL, 用CAMHB培养基1:100稀释后加入96孔板, 每孔100 μ L, 同时利用CAMHB培养基对药物进行梯度稀释后添加100 μ L至96孔板。每孔最终含200 μ L CAMHB培养基, 其中药物终浓度设置10个梯度(分别为200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78和0.39 μ mol/L), 第11孔加入200 μ L上述菌液设为阳性对照, 第12孔加入200 μ L CAMHB培养基设为阴性对照。各抗菌药物的MIC值测定培养条件和时间按照CLSI指南进行, 37℃培养18 h后观察结果, 以肉眼不能看见菌液沉淀的药物浓度孔计算为MIC值。

1.2.2 杀菌曲线分析

对数期($A_{600}=0.5$)的菌液稀释100倍, 分别与1×MIC, 2×MIC和4×MIC奥替溴铵后置于摇床200 r/min孵育。随后, 分别在0、3、6和24 h采集样品利用无菌生理盐水进行连续梯度稀释, 并涂布在TSB平板上37℃孵育, 24 h后菌落计数。菌落数以CFU/mL表示。

1.2.3 亚抑菌浓度生长曲线分析

取过夜培养菌液用胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soybean broth, TSB)培养基稀释1000倍后加入96孔板, 添加不同浓度(1/8×MIC, 1/4×MIC, 1/2×MIC和1×MIC)奥替溴铵后置于全自动生长曲线分析仪中, 每间隔1 h测定600 nm波长吸光度(A_{600})吸光值用于代表浮游菌含量, 并绘制生长曲线。

1.2.4 结晶紫法测定生物被膜

采用结晶紫染色法检测生物被膜量的变化, 重复3次, 每次设3个复孔, 取平均值为最终检测结果。操作步骤简述如下, 取过夜菌液用含2%葡萄糖的TSB培养基稀释1000倍于96孔板中, 每组3个复孔, 添加不同亚抑菌浓度奥替溴铵, 以不添加菌液的空白培养基作为阴性对照, 溶剂DMSO为阳性对照。于37℃培养箱中孵育24 h后, 轻柔吸弃培养液, 用无菌PBS冲洗3次, 室温下晾干。甲醇固定15 min, 1%结晶紫染液染色15 min, 无菌水冲洗3次至对照孔为无色, 室温下晾干。每孔加入200 μ L无水乙醇溶解, 震荡1 min于酶标

仪测定570 nm吸光值。

1.2.5 激光共聚焦观察生物被膜中活菌数量的检测

采用玻璃平皿法构建生物被膜, 通过激光共聚焦显微镜观察生物被膜中的活菌变化, 步骤简述如下: 在底部镶嵌玻璃的培养碟中接种MRSA临床株YUSA145, 然后放入锡箔盒中包好静置于37℃培养24 h, 用无菌0.9% NaCl洗3次后, 加入含不同浓度奥替溴铵的TSBG培养基继续培养24 h, 无菌PBS洗涤后, 然后加入Live/Dead染液, 室温下静置染色30 min, 随后在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.6 蛋白质组样品制备

指数生长期(A_{600} 约为0.5)的MRSA临床株YUSA145加入奥替溴铵至最终浓度为6.25 μ mol/L (1/2×MIC), 对照组用相同体积的溶剂DMSO处理, 每组设置3个重复。然后将细菌在37℃培养箱200 r/min孵育2 h。之后菌液在4℃, 5000 r/min离心10 min收集菌体。用预冷PBS洗涤3次后, 将细菌悬浮在添加蛋白酶抑制剂Cocktail的RIPA裂解缓冲液(1% Triton X-100, 1%脱氧胆酸盐, 0.1% SDS)中。悬浮液用直径为0.1 mm的玻璃珠破壁3×1 min后, 在4℃, 12000 g离心20 min, 收集上清用BCA法进行蛋白浓度测定。取100 μ g蛋白质用10 mmol/L DTT在70℃下还原1 h, 然后在室温黑暗中用50 mmol/L碘乙酰胺烷基化15 min。接着用100 μ L 0.5 mol/L碳酸氢铵脱盐3次, 使用Amicon超离心过滤器(<10 kDa cut-off))。以总蛋白1:50的比例添加胰蛋白酶在37℃下消化过夜, 然后冻干保存在-80℃待质谱分析。

1.2.7 Nano LC-MS/MS定量蛋白质

已消化的蛋白样本重新溶解于30 μ L 0.1%的甲酸中, 取其中4 μ L注入到一个液相色谱(LC)系统, 液相色谱系统由UltiMate 3000 RSLC nano液相色谱, C₁₈柱(100 μ m×20 mm, 3 μ m)和C1分离柱(75 μ m×250 mm, 2 μ m)。流动相A和B分别由0.1%甲酸和含0.1%甲酸的80%乙腈组成。洗脱系统的流速为300 nL/min, 前5 min为5% B, 其后85 min从5%到38% B线性梯度增加, 在接下来的2 min从38%到95% B增加, 维持3 min 95% B。液相色谱系统与配备纳米喷雾电离(NSI)接口的Q Exactive Plus质谱联用。质谱1扫描的

质量范围为300~1500 m/z ，分辨率为70000，相应的质谱2分辨率为17500，最大采集时间为50 ms。所有的多电荷离子被用来触发MS-MS扫描，然后进行30 s的动态排除。排除了单电荷前驱离子和不确定带电状态的离子。

1.2.8 定量蛋白质组学的生物信息学分析

利用Proteome Discoverer 2.4和Sequest HT与金黄色葡萄球菌*Staphylococcus aureus* (Strain NCTC 8325/PS 47)的Uniprot蛋白组比对搜库进行蛋白鉴定和定量。在至少两个技术重复中，表达变化1.5倍 ($P<0.05$)以上确定上调和下调的蛋白。将差异表达蛋白上传到OMICSBEAN数据库(<http://www.omicsbean.com>)进行基因本体(Gene Ontology, GO)注释，包括生物过程、细胞成分、分子功能和KEGG通路分析。利用STING对蛋白质相互作用网络(protein protein interaction network, PPI network)进行了分析。

1.2.9 统计学处理

使用GraphPad Prism 8.0软件进行数据处理及绘制图像。 $P<0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 奥替溴铵对革兰阳性菌的抑菌活性

利用微量肉汤稀释法测定奥替溴铵对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌和无乳链球菌的MIC值结果显示，奥替溴铵对多种革兰阳性菌具有较佳的抑菌活性，MIC值主要分布在1.56 $\mu\text{mol/L}$ \approx 0.88 $\mu\text{g/mL}$ 到12.5 $\mu\text{mol/L}$ (\approx 7.0 $\mu\text{g/mL}$)之间(表1)。其中，对表皮葡萄球菌抑制效果极佳，MIC₉₀仅为3.13 $\mu\text{mol/L}$ 。生长曲线分析表明，在1/2×MIC浓度

表1 革兰阳性菌临床株对奥替溴铵的药物敏感性分析结果

Tab. 1 Drug sensitivity of clinical Gram-positive bacteria isolates against otilonium bromide

Species/Class	Isolates number	MIC ₅₀ /($\mu\text{mol/L}$)	MIC ₉₀ /($\mu\text{mol/L}$)
MRSA	20	6.25	12.5
MSSA	20	6.25	12.5
<i>E. faecalis</i>	20	12.5	12.5
<i>E. faecium</i>	20	6.25	12.5
<i>S. epidermidis</i>	20	1.56	3.13
<i>S. agalactiae</i>	10	6.25	12.5

下，奥替溴铵会显著抑制金黄色葡萄球菌浮游菌的生长，但不影响最大生长水平，而浓度达到1×MIC时，浮游菌的生长完全被抑制(图1)。这些结果初步表明奥替溴铵具有作为抗革兰阳性菌感染药物的潜力。

为了研究奥替溴铵对革兰阳性菌抗菌活性的时间和剂量依赖效应，并与抗生素利奈唑胺和万古霉素的活性进行比较，进行了杀菌曲线分析。如图2所示，奥替溴铵在2×MIC在观察到对金黄色葡萄球菌和粪肠球菌有较好的杀菌效果，在4×MIC浓度下对金黄色葡萄球菌临床株(包括MRSA临床株YUSA80和MRSA临床株YUSA145)和粪肠球菌临床株都表现出有较强的杀菌作用，在6 h内细菌计数降低到检测下限，杀菌效果强于4×MIC利奈唑胺和万古霉素。

2.2 奥替溴铵表现出抗生物被膜活性

以金黄色葡萄球菌(MSSA和MRSA各6株)为对象研究奥替溴铵的抗生物被膜活性，用结晶紫染色对生物被膜半定量分析，当奥替溴铵为1/4×MIC时，所有被检测的金黄色葡萄球菌株，无论是MSSA还是MRSA，形成的生物被膜生物量显著减少(图3a)。当奥替溴铵浓度在1/2×MIC时，所有MSSA的生物被膜

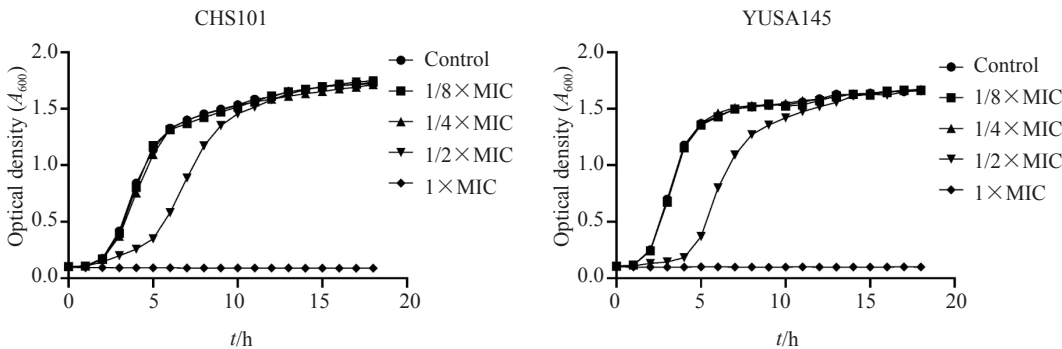


图1 奥替溴铵对金黄色葡萄球菌MSSA临床株(CHS101)和MRSA临床株(YUSA145)生长的影响
Fig. 1 Effects of otilonium bromide on the growth of clinical MSSA isolate (CHS101) and MRSA isolate (YUSA145)

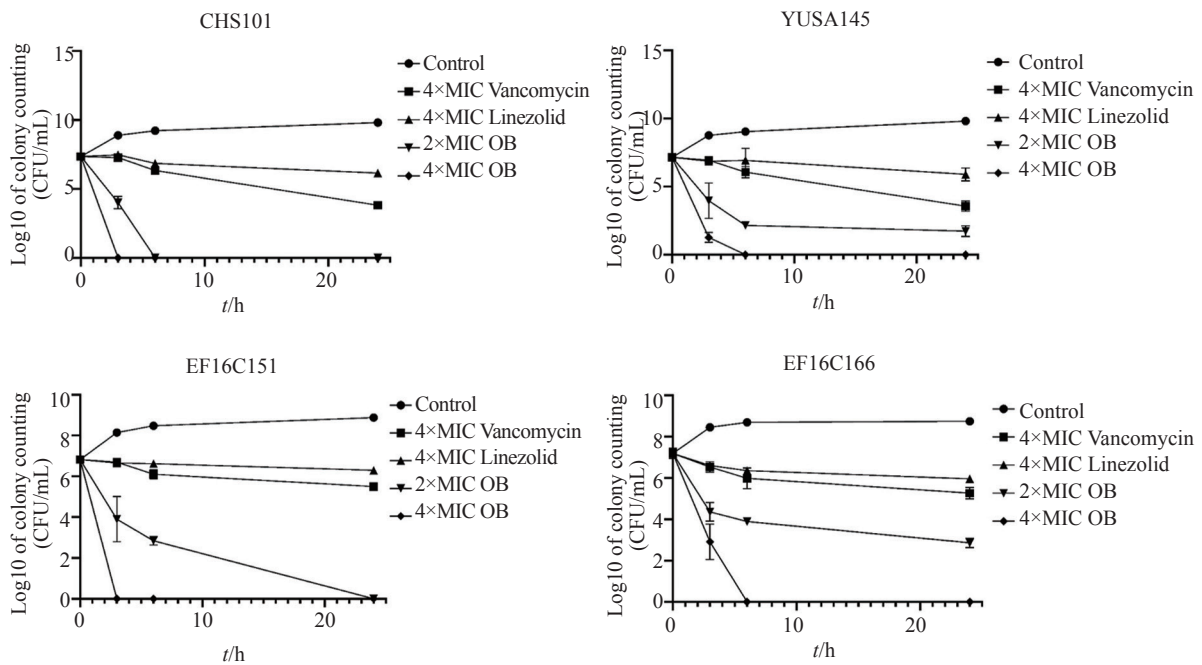
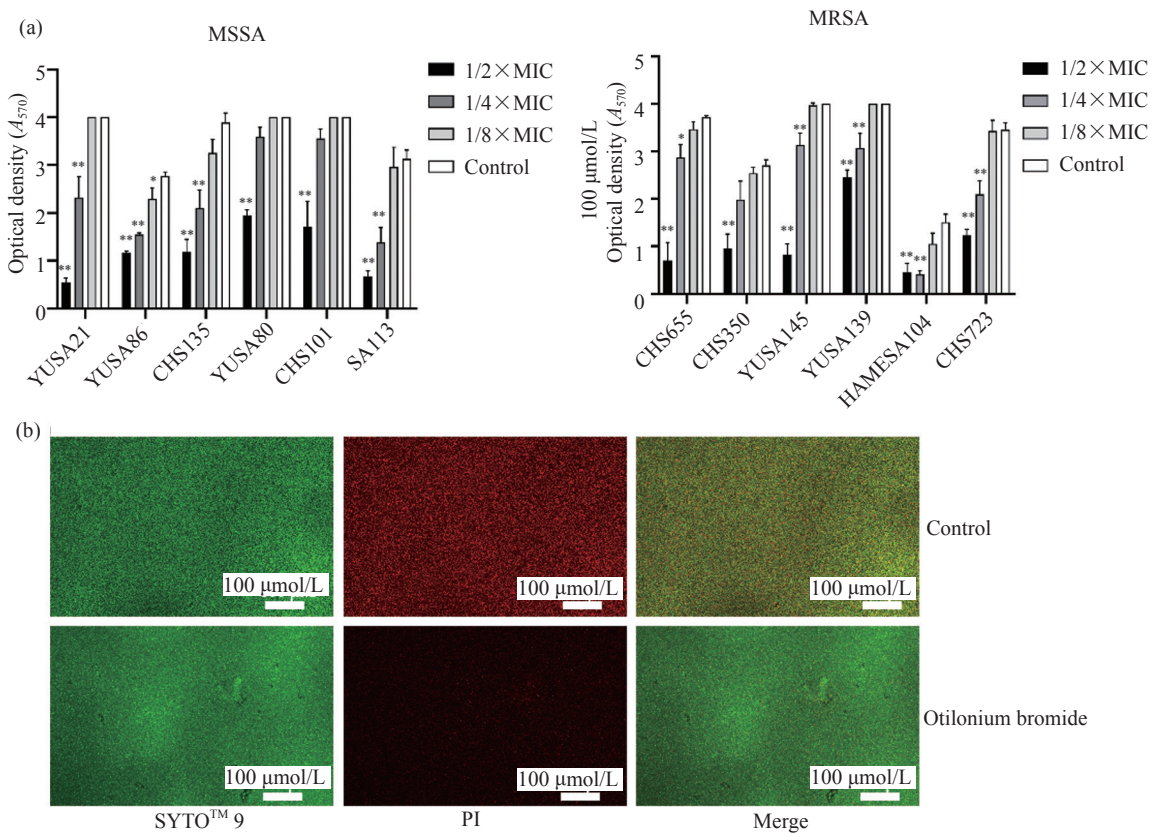


图2 奥替溴铵对金黄色葡萄球菌及粪肠球菌杀菌曲线分析

Fig. 2 Time-kill curves of otilonium bromide (OB) against clinical *S. aureus* and *E. faecalis* strains



(a)不同亚抑浓度的奥替溴铵对金黄色葡萄球菌生物被膜形成有显著抑制作用；(b)奥替溴铵可高效杀死成熟生物膜中的金黄色葡萄球菌

图3 奥替溴铵对金黄色葡萄球菌抗生物被膜活性分析

Fig. 3 Anti-biofilm activity of otilonium bromide against *S. aureus*

形成被抑制50%以上,表明奥替溴铵显著抑制了金黄色葡萄球菌生物膜的形成。用激光共聚焦显微镜进一步观察奥替溴铵对成熟生物膜的影响,SYTO9和PI分别可将活细胞和死细胞染为绿色和红色。当奥替溴铵浓度为4×MIC时,与对照组相比,死亡细胞的比例(红色)显著增加(图3b),说明奥替溴铵可减少成熟生物被膜中的细菌数量。综上所述,奥替溴铵具有较佳的抗生物被膜活性。

2.3 奥替溴铵对金黄色葡萄球菌的抗菌作用机制

为了分析奥替溴铵对金黄色葡萄球菌的抗菌作用机制,我们采用定量蛋白质组学分析金黄色葡萄球菌1/2×MIC浓度奥替溴铵胁迫下的蛋白质组差异。通过LC-MS/MS分析,总共鉴定出1315个蛋白(匹配肽段≥1, FDR<0.01)。我们将表达变化(FC)>1.5且P<0.05作为截断值确定显著差异表达蛋白,火山图

显示共有53个差异表达蛋白,其中25个表达上调,28个表达下调(图4a)。为了分析奥替溴铵对金黄色葡萄球菌生理功能及代谢通路的影响,我们使用Omicsbean数据库对差异蛋白进行了基因本体论(gene ontology, GO)注释分析,根据差异蛋白参与的生物过程对其进行分组,如图4b所示,对奥替溴铵做出响应的蛋白质类别和功能主要富集在有机物与有机酸代谢过程、蛋白折叠与代谢、氧化还原过程和酮酸代谢过程。KEGG分析显示差异蛋白参与的代谢通路富集于微生物代谢环境应激、氯烷烃与氯烯烃降解、丙酮酸代谢、脂肪酸合成与降解和萘降解途径。

利用STING数据库构建了差异表达蛋白的蛋白质相互作用网络。结果显示表达下调蛋白之间相互作用主要集中在乙醇脱氢酶、醛醇脱氢酶AdhE、乙醛脱氢酶、甲酸脱氢酶、硝酸还原酶、同化硝酸还原酶、4-羟

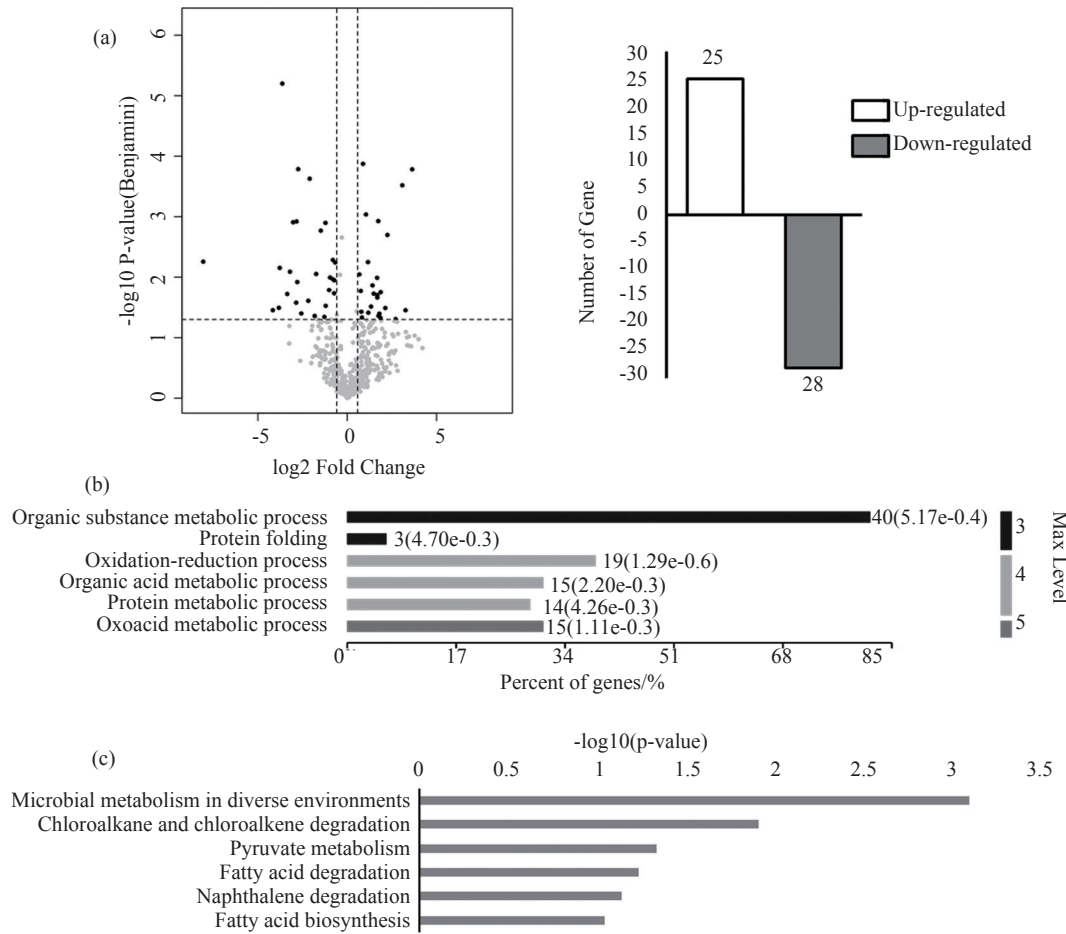


图4 奥替溴铵处理金黄色葡萄球菌后的差异表达蛋白(a)、差异表达蛋白GO(b)及KEGG分析(c)

Fig. 4 Differentially expressed protein (a), GO annotation (b) and KEGG analysis (C) of differentially expressed protein after *S. aureus* cells treated with otilonium bromide

基二吡啶酸合成酶、丙酮酸氧化酶和甲酸乙酰转移酶, 这些蛋白质主要参与的代谢路径为微生物环境应激、脂肪酸降解和丙酮酸代谢。表达上调蛋白富集于蛋白质生物合成过程, 包括核糖体组分蛋白如RplE、RpsH、RplR和RplN, Clp蛋白酶亚基ClpB和ClpC, 分子伴侣蛋

白DnaK和GroL, 精氨酸- tRNA连接酶, 核糖体成熟因子RbfA和折叠蛋白PrsA。初级代谢过程相关蛋白如6-磷酸葡萄糖脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶, 乙酰辅酶A羧化酶亚基AccD, 琥珀酸-辅酶A连接酶亚基SucD, 甘油激酶和天冬氨酸-半醛脱氢酶Asd(图5b)。

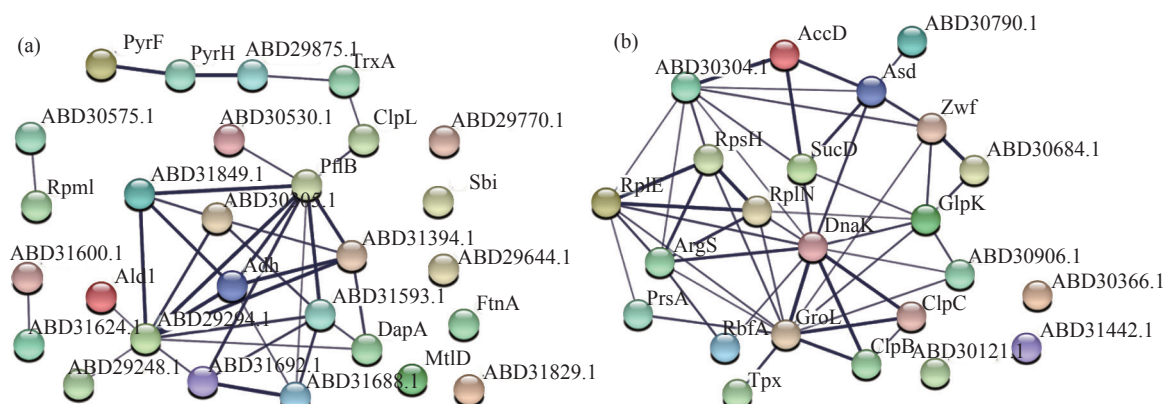


图5 奥替溴铵处理金黄色葡萄球菌下调表达蛋白(a)及上调表达蛋白(b)相互作用网络分析
Fig. 5 Protein-protein interaction network analysis of down-regulated protein (a) and up-regulated protein (b) after *S. aureus* cells treated with otilonium bromide

3 讨论

耐药革兰阳性菌的出现导致传统抗生素治疗失效, 给临床治疗革兰阳性菌感染带来严重的挑战。因此, 迫切需要探索具有新型抗菌机制、打破细菌耐药障碍的创新高效抗菌药物。因为不需要经过大量的药理学优化程序, “老药新用”即药物的重新利用已经成为一种有吸引力的新型抗菌药物开发新策略^[10]。为了筛选对革兰阳性菌具有抗菌活性的临床药物, 对FDA批准的临床药物文库进行了筛选, 发现奥替溴铵表现出抑菌活性并对此进行了进一步的鉴定。奥替溴铵是一种季铵盐衍生物, 具有解痉活性, 临床上广泛用于治疗肠易激综合征(IBS)患者^[11]。本文的结果表明, 奥替溴铵对临床分离的多种革兰阳性菌包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌和无乳链球菌具有较佳的抗菌活性, 特别是表皮葡萄球菌, MIC₉₀仅为3.13 μmol/L, 奥替溴铵对MRSA和利奈唑胺中介及耐药粪肠球菌等临床耐药菌表现出较强的抑制作用。与MSSA相比, MRSA的本质区别在于其通过基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT)方式获得了葡萄球菌染色体mec基因盒(*Staphylococcal cassette chromosome mec*, SCCmec), SCCmec编码的

*mecA*或*mecC*基因赋予其对甲氧西林耐药和β-内酰胺类抗生素耐药^[12]。此外, SCCmec通常还编码有其它抗性基因, 并可通过促进耐药基因的基因水平转移等机制, 使MRSA对氯霉素类、林可霉素类、氨基糖苷类、大环内酯类抗生素以及喹诺酮类抗生素都存在不同程度的耐药^[13]。奥替溴铵对MSSA和MRSA的MIC₅₀和MIC₉₀相同, 说明其抗菌作用机制可打破MRSA的耐药屏障。有研究显示在口服80 mg剂量的情况下, 奥替溴铵的最大血浆浓度可达4.37 μg/mL^[14]。此外, 在口服240 mg剂量奥替溴铵的情况下, 未观察到明显的毒副作用^[15], 意味着在安全剂量下, 奥替溴铵的血浆浓度可超过大部分革兰阳性菌株的MIC值, 具有较好的临床应用前景。小鼠腹腔感染模型也证实了奥替溴铵对金黄色葡萄球菌的体内抗菌活性^[16]。革兰阳性菌生物被膜的形成是导致慢性感染的重要毒力因素^[17], 传统抗生素中只有少数几个对生物被膜有效。奥替溴铵对金黄色葡萄球菌生物膜的形成有较强的抑制作用, 更重要的是, 奥替溴铵还可以穿透成熟生物膜, 杀死成熟生物膜中的细菌, 这些结果表明奥替溴铵在临床生物被膜相关革兰阳性菌抗感染治疗中具有潜在应用价值。最近, 有研究显示多种口服药物可被

肠道微生物代谢, 导致药物的生物利用率降低, 如粪肠球菌可将帕金森病的常用药物左旋多巴降解为多巴胺^[18]。因此, 通过口服奥替溴铵调节肠道微生物群, 改善药物治疗效果, 可进一步扩大奥替溴铵的临床应用场景。

阐明抗菌化合物的作用机制既有利于疗效改进的优良衍生物的改造, 又可为新型抗菌化合物的开发提供新的靶标。在本文中, 我们利用蛋白质组学技术初步研究了奥替溴铵的抗菌机制, 奥替溴铵对金黄色葡萄球菌多个代谢路径产生影响, 例如多种氧化应激相关蛋白包括乙醇脱氢酶、醇醛脱氢酶和乙醛脱氢酶的表达被抑制, 提示着奥替溴铵胁迫造成细菌生产的还原力下降, 氧化还原失衡。氧化应激能够促进6-磷酸葡萄糖进入磷酸戊糖途径和糖酵解途径的氧化分支, 磷酸戊糖途径产生5-磷酸核糖和NADPH, NADPH在维持细胞氧化还原稳态中起着关键作用, 因为它既提供了回收氧化谷胱甘肽的还原力, 又可为以蛋白质为基础的抗氧化系统提供能量^[19-20]。确实, 在奥替溴铵处理后我们观察到磷酸戊糖途径的关键酶6-磷酸葡萄糖脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶表达上调。同时, 抗氧化系统蛋白硫醇过氧化物酶和ClpP蛋白酶相关亚基表达也上升^[21]。硫醇过氧化物酶是一种细胞氧化还原稳态调节因子, 其作用是维持细胞中活性氧水平的稳定性。其表达上调说明奥替溴铵暴露使细菌处于过氧化应激状态, 有研究显示ROS的产生可能是抗生素发挥抗菌活性背后的一个机制^[22]。研究显示ClpP蛋白酶同样在氧化应激反应发挥着重要作用^[21]。无乳链球菌ClpP蛋白酶缺乏的突变体对氧化胁迫比野生型更敏感^[23]。此外, 蛋白质合成和分选系统相关蛋白表达被奥替溴铵激活上调, 可能是由于细菌初级代谢被抑制, 蛋白合成处于紧缺状态, 为了应对蛋白质合成受阻的状态, 细菌加速了核糖体的更新及周转, 保证维持生命活动基本蛋白质的生物合成。在奥替溴铵处理后, Clp蛋白酶clpB、clpC和分子伴侣蛋白DnaK表达上调, clpL表达下调, 说明奥替溴铵可能引起细菌蛋白酶系统紊乱, DnaK在多种细菌包括大肠埃希菌, 李斯特菌和艰难梭菌中都被证明影响

生物被膜形成^[24-26]; 另有多项研究结果显示金黄色葡萄球菌Clp ATP酶对生物被膜形成有重要影响^[27-29], 同时DnaK伴侣系统可与ClpB相互作用协同分解蛋白质聚集体, 影响细菌休眠、抗生素耐药、氧化应激和生物被膜形成^[30-32], 且蛋白质是葡萄球菌生物膜中的主要成分之一。因此, 奥替溴铵的抑制生物被膜形成活性可能与蛋白酶系统功能紊乱相关, 然而, 具体机制仍需进一步确认。

4 结论与展望

本文研究显示奥替溴铵对革兰阳性菌表现出广谱的抗菌活性, 能够显著抑制生物被膜的形成并有效杀死成熟生物被膜中的细菌。此外, 通过定量蛋白质组学分析了与奥替溴铵抑制金葡菌生长密切相关的差异表达蛋白及代谢路径, 这些结果提示奥替溴铵具备治疗革兰阳性菌感染的可能性。然而, 奥替溴铵的MIC相比临床常用抗生素仍然偏高, 可能限制其临床应用, 而在奥替溴铵的分子结构基础上进一步改造获得抗菌活性更佳的衍生物, 需要确认奥替溴铵的关键药效基团。因此, 进一步鉴定奥替溴铵发挥抗金黄色葡萄球菌活性的直接作用靶标, 对推动基于奥替溴铵的抗菌药物的发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2020年CHINET中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4): 377-387.
- [2] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74(3): 417-433.
- [3] Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger S D, *et al.* Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives[J]. *EMBO reports*, 2020, 21(12): e51034.
- [4] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3): 318-327.
- [5] Mohammed Y H E, Manukumar H M, Rakesh K P, *et al.* Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development[J]. *Microb Pathog*, 2018, 123: 339-347.
- [6] 刘明君, 张永利, 万献尧. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜研究进展[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(6): 473-476.
- [7] Xu L, She P, Chen L, *et al.* Repurposing candesartan

- cilexetil as antibacterial agent for MRSA infection[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 688772.
- [8] 盛苗苗, 蒋澄宇. 精确医学为老药新用及联合用药带来新契机[J]. *生命科学*, 2015, 27(3): 322-326.
- [9] Corsello S M, Bittker J A, Liu Z, *et al.* The drug repurposing hub: A next-generation drug library and information resource[J]. *Nature medicine*, 2017, 23(4): 405-408.
- [10] Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks?[J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 314-316.
- [11] Forte E, Pizzoferrato M, Lopetuso L, *et al.* The use of antispasmodics in the treatment of irritable bowel syndrome: focus on otilonium bromide[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16(1): 25-37.
- [12] Lee A S, De Lencastre H, Garau J, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18033.
- [13] Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(4): e00020-18.
- [14] Zhao Y R, Ding L, Fan H W, *et al.* Determination of the unstable drug otilonium bromide in human plasma by LC-ESI-MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(28): 2896-2900.
- [15] Sutton J A, Kilminster S G, Mould G P. The clinical pharmacology of single doses of otilonium bromide in healthy volunteers[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1997, 52(5): 365-369.
- [16] Zhou L, She P, Tan F, *et al.* Repurposing antispasmodic agent otilonium bromide for treatment of *Staphylococcus aureus* infections[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1720.
- [17] Schilcher K, Horswill A R. *Staphylococcal* biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2020, 84(3): e00026-19.
- [18] Maini Rekdal V, Bess E N, Bisanz J E, *et al.* Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism[J]. *Science*, 2019, 364(6445): eaau6323.
- [19] Mullarky E, Cantley L C. Diverting glycolysis to combat oxidative stress. In: Nakao K, Minato N, Uemoto S, editors. *Innovative medicine: basic research and development*[M]. Tokyo: Springer, 2015: 3-23.
- [20] Christodoulou D, Link H, Fuhrer T, *et al.* Reserve flux capacity in the pentose phosphate pathway enables *Escherichia coli*'s rapid response to oxidative stress[J]. *Cell systems*, 2018, 6(5): 569-578.e7.
- [21] Michel A, Agerer F, Hauck C R, *et al.* Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(16): 5783-5896.
- [22] Van Acker H, Coenye T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria[J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(6): 456-466.
- [23] Nair S, Poyart C, Beretti J L, *et al.* Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest[J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 2): 407-417.
- [24] Van Der Veen S, Abee T. HrcA and DnaK are important for static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance in *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 12): 3782-3790.
- [25] Arita-Morioka K, Yamanaka K, Mizunoe Y, *et al.* Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(1): 633-641.
- [26] Jain S, Smyth D, O'hagan B M G, *et al.* Inactivation of the dnaK gene in *Clostridium difficile* 630 Δ erm yields a temperature-sensitive phenotype and increases biofilm-forming ability[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 17522.
- [27] Frees D, Chastanet A, Qazi S, *et al.* Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*[J]. *Mol Microbiol*, 2004, 54(5): 1445-1462.
- [28] Liu Q, Wang X, Qin J, *et al.* The ATP-dependent protease ClpP inhibits biofilm formation by regulating Agr and cell wall hydrolase Sle1 in *Staphylococcus aureus*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 181.
- [29] Ju Y, An Q, Zhang Y, *et al.* Recent advances in Clp protease modulation to address virulence, resistance and persistence of MRSA infection[J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(9): 2190-2197.
- [30] Yamanaka T, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, *et al.* Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17[J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 11.
- [31] Pu Y, Li Y, Jin X, *et al.* ATP-dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance[J]. *Molecular Cell*, 2019, 73(1): 143-156.e4.
- [32] Peyrusson F, Nguyen T K, Najdovski T, *et al.* Host cell oxidative stress induces dormant *Staphylococcus aureus* persists[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(1): e0231321.