



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Antimicrobial Resistance—Article

## 应对可转移多黏菌素耐药性——饲料添加剂来源的白屈菜红碱具有双重效应

宋黄威<sup>a,b,#</sup>, 王雪杨<sup>a,b,#</sup>, 张慕琛<sup>a,b</sup>, 邹之宇<sup>a,b</sup>, 杨思源<sup>a,b</sup>, 易甜<sup>a,b</sup>, 王建峰<sup>c</sup>, 刘德俊<sup>a,b</sup>, 沈应博<sup>a,b</sup>, 代重山<sup>a,b</sup>, 刘志海<sup>d</sup>, Timothy R. Walsh<sup>e</sup>, 沈建忠<sup>a,b</sup>, 吴聪明<sup>a,b,\*</sup>, 汪洋<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> National Key Laboratory of Veterinary Public Health Security, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

<sup>b</sup> Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China

<sup>c</sup> State Key Laboratory for Zoonotic Diseases, Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130015, China

<sup>d</sup> College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

<sup>e</sup> Ineos-Oxford Institute of Antimicrobial Research, Department of Biology, University of Oxford, Oxford OX1 3SZ, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 November 2022

Revised 6 April 2023

Accepted 15 June 2023

Available online 6 September 2023

#### 关键词

白屈菜红碱

抗生素佐剂

接合转移抑制剂

多黏菌素

*mcr-1*

双重作用

#### 摘要

可转移多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 及其变异体的出现、蔓延严重威胁了多黏菌素作为临床治疗多重耐药革兰阴性菌感染最后一道防线药物的药效。寻找抗生素佐剂是恢复多黏菌素对其耐药菌敏感性的有效策略。然而,鲜有研究探索抗生素佐剂对多黏菌素耐药基因传播的影响。本研究发现,来源于饲料添加剂博落回散中的白屈菜红碱( $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在体外抑菌试验能使多黏菌素对 *mcr-1* 阳性大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)降低16倍(由  $2.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  至  $0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),且在肠道感染模型中与对照组相比,能降低约  $10^4$  个菌落形成单位(CFU)的 *mcr-1* 阳性大肠杆菌菌载量。同时,白屈菜红碱在体外试验中能降低 *mcr-1* 阳性质粒的接合转移频率(超过100倍),且在体内肠道接合转移模型中能显著降低该质粒的接合转移频率(5倍)。机制研究发现,白屈菜红碱通过靶向细菌细胞膜上的磷脂成分,增大细胞膜的流动性,抑制了细菌呼吸作用,扰乱质子动势(proton motive force, PMF),产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),造成细菌胞内三磷酸腺苷(ATP)耗竭,下调了 *mcr-1* 及接合转移相关基因的转录水平,从而实现既能增强多黏菌素对抗耐药菌作用,又能抑制耐药质粒接合转移的双重作用。白屈菜红碱的双重作用拓展了抗生素佐剂的应用范围,并提供了应对多黏菌素耐药的新思路。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

抗生素的成功应用延长了人类寿命,促进了畜牧业的发展,对全球公共健康有重要影响。作为一种阳离子多肽类抗生素,多黏菌素是治疗碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌为数不多的有效药物。由于具备促生长效果,多黏菌素在

过去60多年里被大量用作饲料添加剂[1–2]。长期广泛的应用加速了多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 及其变异体的出现与传播[3–4]。MCR-1蛋白通过对革兰阴性菌脂多糖(LPS)中脂质A上的磷酸基团进行磷酸乙醇胺修饰,降低其所带负电荷,从而介导细菌对多黏菌素耐药[3,5–6]。此外,有研究发现多黏菌素能促进携带 *mcr-1* 基因质粒的水平传播

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [wucm@cau.edu.cn](mailto:wucm@cau.edu.cn) (C. Wu), [wangyang@cau.edu.cn](mailto:wangyang@cau.edu.cn) (Y. Wang).

# These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 32(1): 163–173

引用本文: Huangwei Song, Xueyang Wang, Muchen Zhang, Zhiyu Zou, Siyuan Yang, Tian Yi, Jianfeng Wang, Dejun Liu, Yingbo Shen, Chongshan Dai, Zhihai Liu, Timothy R. Walsh, Jianzhong Shen, Congming Wu, Yang Wang. Dual Effects of Feed-Additive-Derived Chelerythrine in Combating Mobile Colistin Resistance. *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.06.012>

[7], 进一步加速 *mcr-1* 基因在全球范围内流行[4]。携带 *mcr-1* 基因的病原菌在动物、食品以及环境中的传播最终将危害人类健康[8-9]。同时, 人肠道内 *mcr-1* 基因的高检出率严重威胁了多黏菌素的临床疗效[10]。因此, 亟需寻找应对携带 *mcr-1* 基因多黏菌素耐药菌的新策略。

抗菌药物化疗仍是治疗细菌感染的主要手段。然而, 传统的抗菌药物开发面临着耗时长、经济负担大等困境[11-12]。目前临床使用的大部分抗菌药物依旧是 1950—1980 年间发现的抗生素或是基于其骨架进行优化的抗菌药物[13]。由于新型抗菌药物研发的速度落后于耐药性产生和传播的速度, 最终造成了目前的耐药性危机。具有协同抗菌作用的药物联用可有效遏制耐药性的产生和传播[14-15]。但由于泛耐药菌的广泛流行, 传统抗菌药物的联用疗法存在失效的风险。受到抗生素佐剂概念和相关研究的启发[16-17], 研发具有新型作用靶点的抗菌药物佐剂是遏制耐药性进一步恶化的关键策略。

天然化合物是抗生素和抗生素佐剂的主要来源[18-19]。例如,  $\alpha$ -倒捻子素和紫檀芪分别通过靶向细菌细胞膜磷脂成分和 MCR-1 蛋白, 恢复了携带 *mcr-1* 基因大肠杆菌对多黏菌素的敏感性[20-21]。然而, 由质粒介导的 *mcr-1* 基因可持续地在病原菌间传播, 增大了治疗难度[22]。因此, 理想的抗生素佐剂不仅能增强抗菌药物的药效, 还能抑制耐药基因的传播。本研究通过高通量筛选具有双重作用的天然化合物, 发现来源于饲料添加剂博落回散中的关键活性成分白屈菜红碱不仅能增强多黏菌素的抗菌作用, 还能抑制携带 *mcr-1* 基因质粒的水平传播。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试剂与菌株

天然化合物库购自陶术生物科技有限公司(货号: L6000, 纯度高于 95%; 美国), 包含从植物、动物和微生物来源的 2592 种天然化合物。将携带 *mcr-1* 基因的 IncI2 质粒转化至大肠杆菌 BW25113 中 (BW25113::IncI2-*mcr-1*), 作为高通量筛选多黏菌素佐剂的受试菌以及质粒接合转移的供体菌。大肠杆菌 J53 作为质粒接合转移抑制剂筛选的受体菌。实验室保存的 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌 ZJ807 作为药敏试验以及机制研究的受试菌[10]。

### 2.2. 基于细胞水平的多黏菌素佐剂筛选

将  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的天然化合物与  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $1/4\times$  MIC) 的多黏菌素联合作用于大肠杆菌 BW25113::IncI2-*mcr-1*。筛选方案根据美国临床和实验室标准协会 (CL-

SI) 指南 (版本: M45-A2) 进行, 详情请见附录 A。

### 2.3. 部分抑菌浓度指数测定试验

部分抑菌浓度 (FIC) 指数根据 CLSI 指南 (版本: M45-A2) 采用棋盘法试验测定。将每种化合物在阳离子调节肉汤 CAMHB 中进行倍比稀释, 以形成最终体积为  $100 \mu\text{L}$  的  $8\times 8$  矩阵。将过夜培养的 *mcr* 阳性或阴性菌株  $1:100$  稀释至新鲜 Mueller-Hinton 肉汤中 (MHB), 并在  $37^\circ\text{C}$  下培养 4~6 h。将对数期菌液调整至 0.5 麦氏浊度, 随后用 CAMHB 稀释 100 倍。将  $100 \mu\text{L}$  稀释好的菌悬液添加至  $8\times 8$  矩阵的各个孔中, 在  $37^\circ\text{C}$  条件下孵育 18 h。使用 Infinite M200 酶标仪 (Tecan, 瑞士) 测定每个孔的  $\text{OD}_{600}$  值。每个组合至少重复两次。FIC 值根据下面公式计算得出:

$$\text{FIC index} = \text{MIC}_{\text{ab}}/\text{MIC}_{\text{a}} + \text{MIC}_{\text{ba}}/\text{MIC}_{\text{b}} = \text{FIC}_{\text{a}} + \text{FIC}_{\text{b}}$$

式中,  $\text{MIC}_{\text{ab}}$  是化合物 A/B 各自的 MIC;  $\text{MIC}_{\text{ab}}$  则是化合物 A 与化合物 B 联用时的 MIC;  $\text{MIC}_{\text{ba}}$  则是化合物 B 与化合物 A 联用时的 MIC。 $\text{FIC}_{\text{a/b}}$  是化合物 A/B 的 FIC。协同效应定义为 FIC 值  $\leq 0.5$ 。

### 2.4. 细菌三磷酸腺苷水平测定试验

使用增强型三磷酸腺苷 (ATP) 检测试剂盒 (货号: S0027; 碧云天生物技术股份有限公司, 中国) 测定大肠杆菌 ZJ807 的细胞内 ATP 水平。将过夜培养的 ZJ807 菌液在新鲜 Luria-Bertani (LB) 肉汤中以  $1:100$  比例进行稀释, 并在  $37^\circ\text{C}$  下培养 4~6 h。然后, 通过离心 ( $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 收集菌体, 并将其重悬于  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (PBS;  $\text{pH} = 7.4$ ) 中, 调整  $\text{OD}_{600}$  为 0.5。使用不同浓度 ( $0$ 、 $1\times$ 、 $2\times$  或  $4\times$  MIC) 的白屈菜红碱处理 30 min, 再离心 ( $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) 收集菌体。利用含  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶菌酶的 Tris-乙二胺四乙酸 (EDTA-TE) 缓冲液裂解菌体, 并再次离心, 其上清液用于测定细胞内 ATP 水平。将检测试剂添加至 96 孔板中, 在室温下孵育 5 min。然后将上清液加入检测液中并迅速混合, 用 Infinite M200 酶标仪测量各体系发光值。

### 2.5. 电子传递链活性测定试验

将过夜培养的大肠杆菌 ZJ807 在新鲜的 LB 肉汤中以  $1:100$  的比例稀释, 并在  $37^\circ\text{C}$  下培养 4~6 h, 以达到对数生长期。再清洗并重悬于 PBS ( $\text{pH} = 7.4$ ,  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 中使  $\text{OD}_{600}$  值到达 0.3 后, 将菌悬液置于冰上。在玻璃试管中, 将白屈菜红碱 ( $0$ 、 $1/2\times$ 、 $1\times$  或  $2\times$  MIC) 加入含有  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  碘硝基四氮唑氯化物 (INT) 的菌悬液中, 剧烈混合, 并在  $30^\circ\text{C}$  下孵育。利用酶标仪每隔 10 min 读取

体系在 490 nm 处的吸光值。

## 2.6. 质子动势测定试验

质子动势 (proton motive force, PMF) 由  $\Delta\text{pH}$  (pH 梯度) 和  $\Delta\Psi$  (膜电位) 组成。使用膜电位敏感的荧光染料 DiSC<sub>3</sub>(5) (货号: D131315; 阿拉丁生化科技股份有限公司, 中国) 测定白屈菜红碱对大肠杆菌 ZJ807 $\Delta\Psi$  的影响。使用另一种 pH 值敏感的荧光探针 BCECF-AM (货号: S1006; 碧云天生物技术股份有限公司, 中国) 测定 CHE 处理后 ZJ807  $\Delta\text{pH}$  的变化。详细方法见附录 A。

## 2.7. 膜流动性检测试验

参考相关研究[23], 利用荧光染料 Laurdan 测定白屈菜红碱对大肠杆菌 ZJ807 细胞质膜流动性的影响。首先, 制备 ZJ807 的原生质体[24]。将过夜培养的 ZJ807 菌液离心并清洗两次, 重悬于 CAMHB 中, 制备成 9 mL 含  $10^8$  个菌落形成单位 (CFU) 的 CAMHB 菌悬液。孵育 2 h 后, 将菌株离心、洗涤两次 (4 °C, 20 min, 3273g)。第一次将其重悬于 10 mL Tris 缓冲液 ( $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH = 8.0) 中, 第二次则重悬于含有 20% 蔗糖的 Tris 缓冲液 (pH = 8.0,  $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 中。然后分别加入 1 mL 溶菌酶 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 和 250  $\mu\text{L}$  乙二胺四乙酸 EDTA ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 分别去除细胞壁和外膜。将菌悬液在 30 °C 下孵育 1 h。然后加入 500  $\mu\text{L}$  胰蛋白酶 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 在 30 °C 下继续孵育 15 min。离心 (4 °C, 20 min, 2000g) 收集原生质体。然后加入终浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Laurdan, 室温下避光温和震荡孵育 10 min。随后, 用  $1/2\times$ 、 $1\times$  或  $2\times$  MIC 浓度的白屈菜红碱或苜蓿醇 (benzyl alcohol;  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 35 min。最后, 以 350 nm 波长为激发光, 分别测定各体系在 435 nm 和 490 nm 波长处发射光的荧光强度。Laurdan GP 使用以下公式计算:

$$\text{GP} = (\text{I435} - \text{I490}) / (\text{I435} + \text{I490})$$

所有试验均重复至少三次。

## 2.8. 不同脂质对白屈菜红碱抗菌活性的影响

为了评估不同脂质对白屈菜红碱抗菌活性的影响, 将白屈菜红碱 ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 分别与 25 mmol 的 LPS、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰甘油 (PG) 或心磷脂 (CL) 混合。将混合物在 37 °C 下孵育 30 min, 然后加入空白药敏纸片。干燥后, 将药敏纸片贴于含有大肠杆菌 25922 的 Mueller-Hinton 琼脂 (MHA) 平板上。在 37 °C 下培养 16~18 h 后, 测量各处理组抑菌圈的直径。

## 2.9. *mcr-1* 基因转录水平测定

使用 EASYspin Plus 试剂盒 (货号: RN0801; Aidlab, 中国) 提取细菌总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒 (货号: RR047A; Takara, 日本) 将 1  $\mu\text{g}$  RNA 进行反转录。通过使用 SYBR Premix Ex Taq qPCR 试剂盒 (货号: RR820A; TaKaRa, 日本) 测定 *mcr-1* 相对于对照基因 (16S 核糖体 RNA49) 的转录水平。反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 在 ABI QuantStudio 7 (Applied Biosystems, 美国) 上进行。基因表达的倍数变化使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法进行测定。

## 2.10. MCR-1 表达量测定

将 N 端带有  $6\times$  His 标记的大肠杆菌菌株 BL21(DE3)::pET28a-*mcr-1* 过夜培养, 并用新鲜 LB 肉汤进行 1:100 稀释, 在 37 °C 下培养 4 h。然后, 在菌液中分别加入不同终浓度 ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  或  $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的白屈菜红碱和  $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 继续培养 4 h。离心收集菌体, 加入  $6\times$  上样缓冲液并煮沸变性。每个样品取 10  $\mu\text{g}$  进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。然后转移到聚偏二氟乙烯膜上, 并用抗体 [His-Tag 兔单克隆抗体, 货号: 12698; Cell Signaling Technology, 美国; 针对 GAPDH 的鼠单克隆抗体 [GA1R], 货号: ab125247; Abcam, 英国; HRP 标记的山羊抗兔 IgG(H+L), 货号: A0208; Beyotime; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(H+L), 货号: A0216; Beyotime] 封闭和涂布。然后使用 Western 印迹示踪剂 (Tanon-5200; Bio-Tanon, 英国) 观察印迹。

## 2.11. 接合转移抑制试验

将供体菌 (携带 *mcr-1* 基因 IncI2 质粒的大肠杆菌 BW25113) 和受体菌 (大肠杆菌 J53) 在含有相应抗生素的脑心浸液 (BHI) 肉汤中, 于 37 °C、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下过夜培养 16 h。将过夜培养物稀释 10 倍至 2 mL BHI 无药肉汤中, 37 °C 继续培养 4 h。随后, 将供体和受体菌的  $\text{OD}_{600}$  调整至一致 (为  $10^8\sim 10^9 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。将供体和受体菌以 1:1 的比例混合, 并以  $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 收集菌体, 将其重悬于含有不同浓度化合物的 2 mL BHI 肉汤中, 以无药 BHI 肉汤组作为对照, 在 37 °C 下静置培养 16 h。随后, 将 100  $\mu\text{L}$  菌悬液分别涂布到含有叠氮化钠和多黏菌素的 HI 琼脂平板上, 继续培养 24 h。分别计算接合子和受体菌的数量。接合转移频率为接合子的数量除以受体菌的数量。所有的接合转移试验都至少进行了三次生物学重复。

### 2.12. 小鼠肠道感染模型治疗试验

为了破坏小鼠肠道菌群的定殖抗性使大肠杆菌 ZJ807 成功定殖, 所有小鼠 ( $n=28$ ) 每 24 h 灌胃给予氨苄青霉素 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、万古霉素 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、克林霉素 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和甲硝唑 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 连续处理三天。每只小鼠通过灌胃法攻毒  $6 \times 10^7$  个 CFU 的 ZJ807, 并将小鼠随机分配到 7 个处理组, 每组 4 只小鼠。攻毒 4 h 后, 分别给小鼠灌胃 PBS、多黏菌素 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  或  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、白屈菜红碱 ( $64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  或  $128 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 或多黏菌素+白屈菜红碱 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  或  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 128 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。收集小鼠粪便样本, 称重、均质化、稀释, 并用含  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  多黏菌素的中国蓝琼脂 (CBA, 货号: CM903; 陆桥技术股份有限公司, 中国) 检测 ZJ807 在粪便中的载量。

### 2.13. 肠道接合转移抑制试验

小鼠用四种抗生素进行预处理以消除定殖抗性, 包括氨苄青霉素 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、万古霉素 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、克林霉素 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和甲硝唑 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 连续处理三天。随后, 每组设置 6 只小鼠, 每只小鼠分别灌胃约  $10^8$  个 CFU 受体菌 J53, 24 h 后再灌胃约  $10^8$  个 CFU 供体菌 ZJ807。每天通过灌胃给药白屈菜红碱 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 或 PBS。收集小鼠粪便, 并用 1 mL PBS 重悬、稀释、涂板。在含有不同药物的 CBA 平板上分别测定接合子和受体菌的数量。用含多黏菌素 ( $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) +  $\text{NaN}_3$  ( $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 CBA 平板筛选接合子; 用含  $\text{NaN}_3$  ( $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 CBA 平板筛选受体菌。最终的接合转移频率为接合子数除以受体菌数。

### 2.14. 数据处理

本研究利用 GraphPad Prism 9 软件进行数据处理。所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差的形式呈现。对于体外研究, 使用 Dunnett 多重比较的单因素方差分析 (ANOVA) 计算  $P$  值。对于体内研究,  $n$  代表每组动物的数量, 并通过 Mann-Whitney  $U$  检验确定统计学显著性。 $P < 0.05$  的差异被认为具有显著性差异。

## 3. 结果

### 3.1. 白屈菜红碱在体内外对多黏菌素均具有协同抗菌作用

本研究高通量筛选了来源于植物、动物、微生物的 2592 种天然化合物与多黏菌素的联合抗菌效果 [图 1 (a)]。以 90% 生长抑制率为折点值, 本研究发现包括黄

酮类、生物碱类等 120 种天然化合物与多黏菌素具有协同抑菌效果 [见图 1 (b) 及附录 A 中的图 S1 (a)]。由于前期研究发现黄酮类化合物与多黏菌素具有协同抗菌效果 [20], 本研究专注于生物碱类与多黏菌素的联用效果。以大肠杆菌 ZJ807 (*mcr-1* 基因阳性)、肺炎克雷伯菌 91 (*mcr-8* 基因阳性) 以及鼠伤寒沙门菌 (*mcr-9* 基因阳性) 为受试菌株, 本研究发现白屈菜红碱与多黏菌素联用具有协同抗菌效果 [见图 1 (c) 及附录 A 中的图 S1 (b)、(c)], 且提示白屈菜红碱为 MCR-1 蛋白的非特异性抑制剂。此外, 白屈菜红碱与多黏菌素联用对不携带 *mcr* 基因的大肠杆菌工程菌株 BW25113 也具有协同抗菌作用 [见附录 A 中的图 S1 (d)], 说明白屈菜红碱对多黏菌素的增效作用机制不完全依赖于 *mcr* 基因。通过杀菌曲线, 单独使用白屈菜红碱或多黏菌素 24 h 后均无明显杀菌作用, 而白屈菜红碱与多黏菌素联用则能降低  $4\text{-log}_{10}$  的 CFU ZJ807 [图 1 (d)]。进一步通过肠道感染模型验证白屈菜红碱与多黏菌素的体内联用抗菌效果, 发现单独使用白屈菜红碱或多黏菌素组小鼠粪便中 *mcr-1* 阳性大肠杆菌的菌载量与未用药处理对照组无显著差异。而白屈菜红碱与多黏菌素联用组小鼠粪便中 *mcr-1* 阳性大肠杆菌的菌载量则低于检测限 ( $< 100$  CFU) [图 1 (f)]。以上结果证明白屈菜红碱在体内外均能增强多黏菌素的抗菌效果。

### 3.2. 白屈菜红碱通过干扰细菌能量代谢发挥抗菌效果

为阐明白屈菜红碱对多黏菌素的增效机制, 本研究首先对白屈菜红碱的抗菌机制进行了探索。经不同浓度的白屈菜红碱处理 30 min 后, ZJ807 胞内外 ATP 水平均呈浓度依赖性的下降 [见图 2 (a) 及附录 A 中的图 S2 (a)], 提示受试菌株胞内外 ATP 水平的下降不是因为白屈菜红碱增大了细胞膜的通透性。本研究利用荧光染料碘化丙锭 (PI) 进一步测定白屈菜红碱对细菌细胞膜通透性的影响, 发现白屈菜红碱能导致 PI 的荧光淬灭 [见附录 A 中的图 S2 (b)]。由于正常细菌胞外无  $\beta$ -半乳糖苷酶活性, 本研究测定了不同浓度白屈菜红碱处理后细菌胞外  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性, 发现不同浓度白屈菜红碱处理组细菌胞外的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性与空白对照组无显著差异 [见附录 A 中的图 S2 (c)], 证明白屈菜红碱导致细菌胞内 ATP 水平下降的原因不是其能增大细菌细胞膜通透性。由于 ATP 的合成主要依赖于 PMF, PMF 由  $\Delta\text{pH}$  和  $\Delta\Psi$  组成。本研究分别测定了白屈菜红碱对  $\Delta\text{pH}$  和  $\Delta\Psi$  的影响, 发现白屈菜红碱能呈浓度依赖性地降低  $\Delta\text{pH}$  [图 2 (b)], 并升高  $\Delta\Psi$  [图 2 (c)]。卡那霉素进入细菌胞内主要依赖  $\Delta\Psi$ , 而多西环素则依赖于  $\Delta\text{pH}$ 。本研究发现, 白屈菜红碱与卡那霉

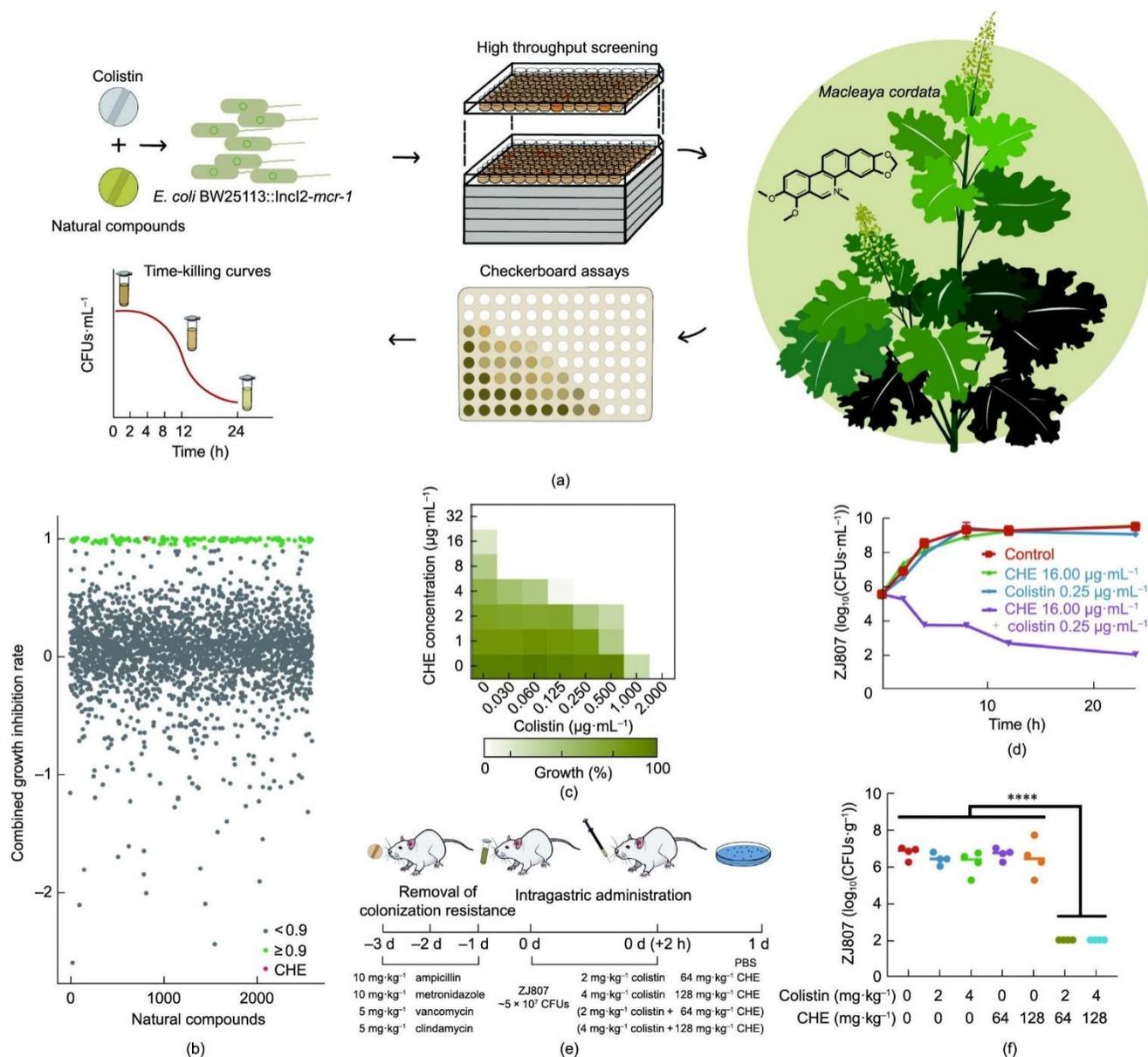


图1. 多黏菌素佐剂的筛选及白屈菜红碱与多黏菌素体内内外协同抗菌效果。(a) 筛选多黏菌素佐剂试验设计。(b) 2592个天然化合物分别与1/4×MIC多黏菌素联合作用于BW25113::Incl2-*mcr-1*的联合抑菌效率(两个生物学重复)。绿点代表与多黏菌素具有联合抑菌效果的自然化合物;灰点为无联合抑菌效果的自然化合物。(c) CHE与多黏菌素对大肠杆菌ZJ807的棋盘法药敏。FIC指数≤0.5为具有协同作用。(d) 单独使用CHE、多黏菌素或联合使用对ZJ807的杀菌曲线。(e) 小鼠肠道感染模型建立和治疗试验设计。(f) 不同处理组小鼠粪便中ZJ807菌载量。在(d)图中, *P*值通过两侧的Mann-Whitney *U*检验确定。\*\*\*\*代表 $P < 0.0001$ 。

素表现为协同作用,与多西环素则表现为拮抗作用[见附录A中的图S2(d)],进一步证明白屈菜红碱能扰乱细菌的PMF。

由于 $\Delta\text{pH}$ 由电子传递链产生,本研究利用碘硝基四唑紫测定了白屈菜红碱对细菌电子传递活性的影响[25],发现白屈菜红碱能呈浓度依赖性地降低细菌电子传递链的活性[图2(d)]。进一步,本研究发现经白屈菜红碱处理后, $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ 比值最高升高了三倍[图2(e)],进一步证实白屈菜红碱通过抑制电子传递链活性降低了细菌胞内ATP的水平[26]。与前人研究[27]类似,高 $\text{NADH}/$

$\text{NAD}^+$ 比值往往伴随着活性氧(ROS)的产生[图2(f)]。值得一提的是,ROS清除剂*N*-乙酰半胱氨酸(NAC,  $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )可显著抑制由白屈菜红碱造成的ATP水平下降[见附录A中的图S2(e)],说明产生ROS是造成ATP水平下降的因素之一。进一步,本研究发现ROS清除剂硫脲可部分抑制白屈菜红碱的杀菌能力[见附录A中的图S2(f)],说明产生ROS在白屈菜红碱的抗菌作用具有一定程度的贡献。上述结果证明,白屈菜红碱通过降低细菌电子传递链的活性,扰乱PMF,产生ROS,从而造成细菌胞内ATP水平耗竭。

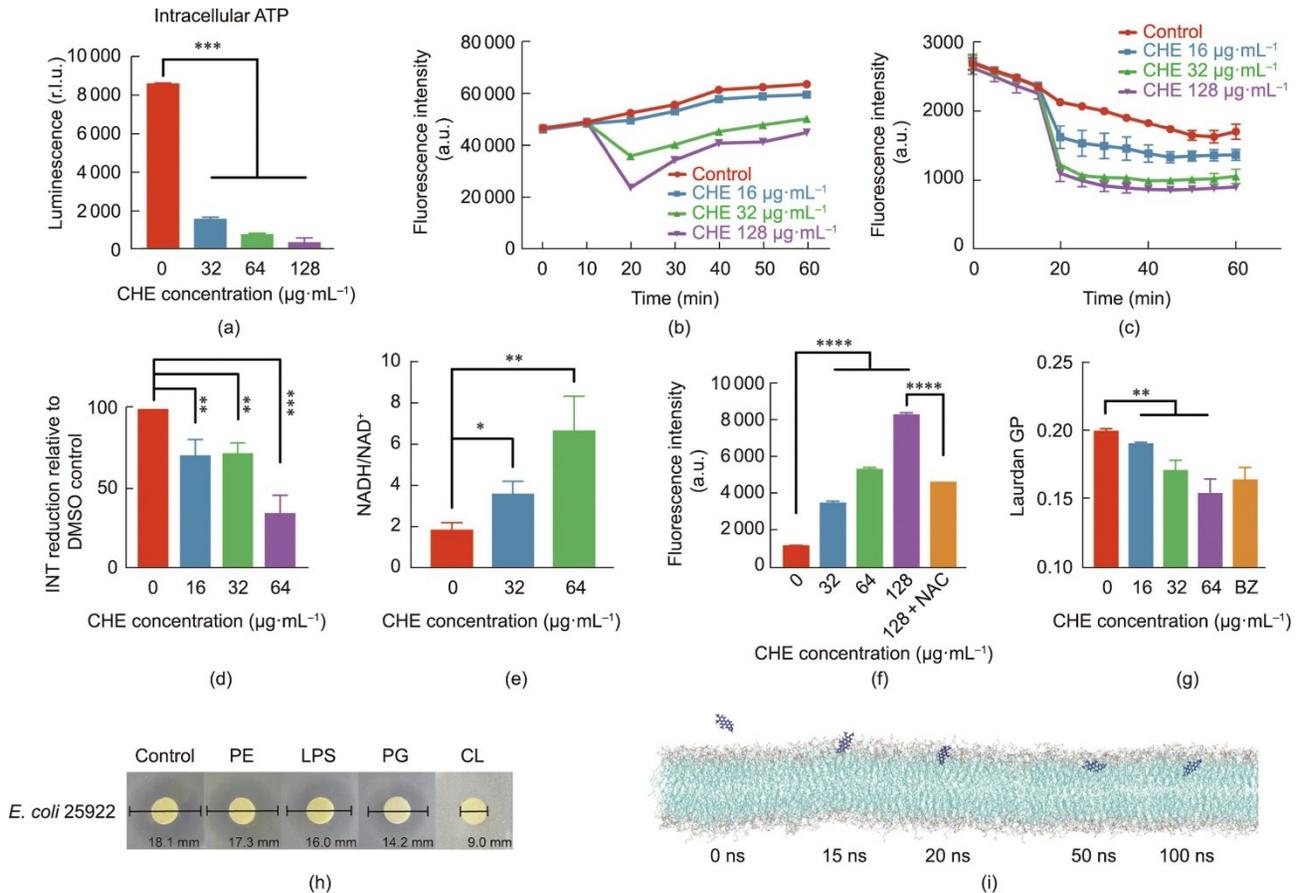


图2. 白屈菜红碱的抗菌机制。(a) CHE处理导致大肠杆菌ZJ807胞内ATP含量降低。(b)和(c)分别代表CHE处理后 $\Delta\text{pH}$ 和 $\Delta\Psi$ 的变化。(d) CHE处理后ZJ807呼吸水平的变化。(e) CHE处理后NADH与NAD<sup>+</sup>的比例增大。(f)不同浓度CHE处理后ZJ807中ROS含量的变化。(g) CHE处理后ZJ807细胞质膜流动性的变化; 10 mmol·L<sup>-1</sup>的苯甲醇 (benzyl alcohol) 作为阳性对照。(h) 外源添加PG和CL抑制CHE对大肠杆菌25922的抗菌效果。图为25 mmol·L<sup>-1</sup>的PC、PE、PG或CL对1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CHE作用于大肠杆菌25922抑菌圈大小的影响。(i) CHE与含75%:25%:5% PG/PE/CL的磷脂双分子层互作的动态模拟 (100 ns)。P值是通过单因素方差分析检测并使用Dunnett方法校正。\*、\*\*、\*\*\*和\*\*\*\*分别代表 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 。

### 3.3. 白屈菜靶向细菌内膜并增大膜的流动性

膜流动性的改变会造成位于膜上呼吸复合体的离域 (delocalization), 从而削弱电子传递链活性[23,28]。本研究利用荧光染料Laurdan测定不同浓度的白屈菜红碱对ZJ807细胞膜流动性的影响[29], 发现白屈菜红碱能呈浓度依赖性地增大膜的流动性[图2 (g)]。为验证细胞膜上的磷脂成分是否为白屈菜红碱的作用靶点, 本研究测定了不同的磷脂成分对白屈菜红碱抗菌作用的影响, 发现PG和CL能显著抑制白屈菜红碱的抗菌活性[图2 (h)]。进一步, 本研究对白屈菜红碱与细菌细胞膜磷脂双分子层的互作进行了分子动态模拟[23,30]。首先, 白屈菜红碱A环上的亚甲氧二基开始与磷脂亲水的头部进行接触; 约10 ns后, 白屈菜红碱开始以或垂直、或倾斜的角度进入膜的内部, 使白屈菜红碱非极性的苯环与磷脂疏水的尾部实现最大限度的接触; 在45 ns后, 白屈菜红碱完全进入脂质双分子内部[图2 (i)]。该模拟结果展示, 白屈菜红碱的亚甲二氧基基团和疏水的核心分子骨架环对细胞膜吸

附并进入细菌脂质双分子内部发挥了重要作用。

### 3.4. 白屈菜红碱通过抑制*mcr-1*以及外排泵的功能实现对多黏菌素的增效

由于外排泵和*mcr-1*及其变异体是介导细菌对多黏菌素耐药的主要因素[3,31–32], 又因白屈菜红碱能显著抑制细菌的能量代谢, 本研究猜测白屈菜红碱可能通过抑制上述耐药因子发挥功能从而实现了对多黏菌素的增效作用。首先, 本研究通过荧光染料溴化乙锭(EB)测定了白屈菜红碱对细菌外排泵功能的影响, 发现白屈菜红碱能呈浓度依赖性降低外排泵对EB的外排作用[图3 (a)]。然后, 本研究发现白屈菜红碱能呈浓度依赖性抑制*mcr-1*基因的转录和翻译过程[图3 (b)、(c)]。进一步, 白屈菜红碱处理能显著降低修饰/未修饰脂质A的比例[图3 (d)]。此外, 本研究发现白屈菜红碱能显著增加多黏菌素的胞内含量[图3 (e)]。上述结果证明, 白屈菜红碱通过抑制细菌LPS中脂质A的修饰以及外排泵的活性从而增大了细菌

胞内多黏菌素的药物含量，实现了对多黏菌素的增效效果。

### 3.5. 白屈菜红碱在体内外均能抑制携带 *mcr-1* 基因 IncI2 质粒的接合转移

本研究以携带 *mcr-1* 基因的 IncI2 质粒为研究对象，测定白屈菜红碱对其接合转移的影响。首先，本研究发现  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的白屈菜红碱对供/受体菌的生长均无显著影响[图 4 (a)]。因此，这些浓度可用于后续接合转移抑制试验。结果发现，与无药对照组相比，白屈菜红碱能呈浓度依赖性地降低携带 *mcr-1* 基因 IncI2 质粒的接合转移频率[图 4 (b)]。当白屈菜红碱为  $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，接合转移频率下降了超过 125 倍[图 4 (b)]。进一步，本研究利用小鼠肠道接合转移模型评估白屈菜红碱在体内对携带 *mcr-1* 基因的 IncI2 质粒接合转移的影响。结果发现，肠道内 IncI2 质粒的接合转移频率与体外接近 ( $10^{-3}\sim 10^{-1}$ )；而白屈菜红碱处理组的接合转移频率比空白对照组的低 5 倍[图 4 (d)]。尽管随后几天小鼠肠道中受体细菌和接合子的减少可能导致接合转移频率逐渐增加，

但整体上白屈菜红碱处理组的接合转移频率抑制效果大约是对照组的两倍[图 4 (d)]。

### 3.6. 白屈菜红碱限制细菌的能量代谢、抑制了接合转移相关基因的表达

接合转移是一个耗能的生物学过程，涉及 DNA 的复制和 IV 分泌系统的组装[33]。本研究测定了低剂量的白屈菜红碱对细菌 ATP 水平的影响，与对照组相比， $2\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的白屈菜红碱均能显著降低供体菌 (73%~88%)、受体菌 (52%~76%) 胞内的 ATP 水平[图 5 (a)]。转录组结果显示，供/受体菌中 ATP 合成相关基因发生了显著的下调[见图 5 (b) 及附录 A 中的图 S3 (a)、表 S1、表 S2]。由于能量受限会抑制质粒的接合转移[34]，因此本研究认为，由白屈菜红碱造成的 ATP 水平下降是其抑制质粒接合转移的重要因素。此外，DNA 转移和复制 (*nikB* 和 *traC*)、接合对形成 (*virB1-virB11*)、IncI2 质粒特有的 IV 菌毛等与接合转移相关基因的转录均发生了显著的下调[见图 5 (c) 及附录 A 中的表 S3]。同时，供体菌中与黏附相关的操纵子相关基因的转录水平也发生了显著的下调[见图 5 (d)]

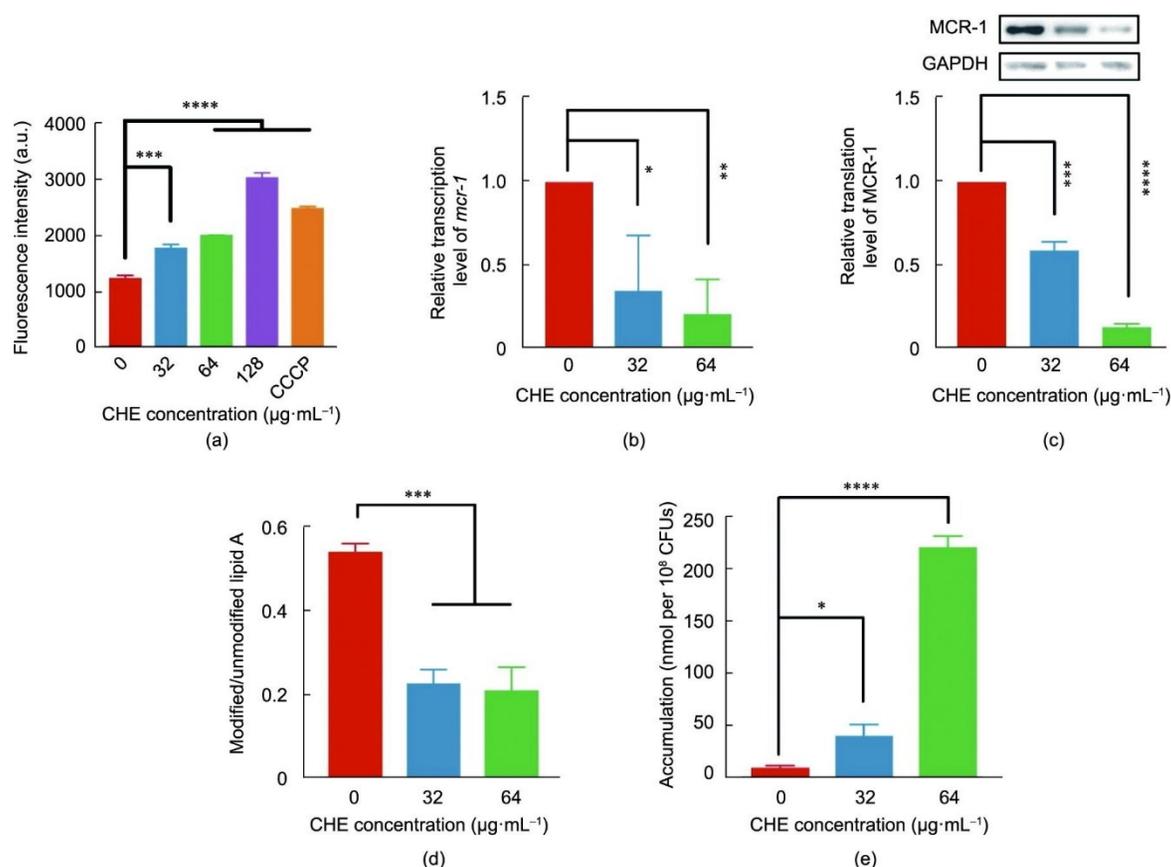


图 3. 白屈菜红碱与多黏菌素的协同抗菌机制。(a) 不同浓度 CHE 处理对 ZJ807 中外排泵活性的影响。10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 CCCP 作为阳性对照。(b) CHE 处理降低 ZJ807 中 *mcr-1* 基因转录水平。(c) CHE 处理降低大肠杆菌 BL21(DE3)::pET28a-*mcr-1* 中 MCR-1 的表达量。GAPDH 作为内参蛋白。(d) CHE 处理后 ZJ807 中经修饰脂质 A 与未修饰脂质 A 比例的变化。(e) CHE 处理后 ZJ807 胞内多黏菌素含量的变化。P 值是通过单因素方差分析检测并使用 Dunnett 方法校正。\*、\*\*、\*\*\*和\*\*\*\*分别代表  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$  和  $P < 0.0001$ 。

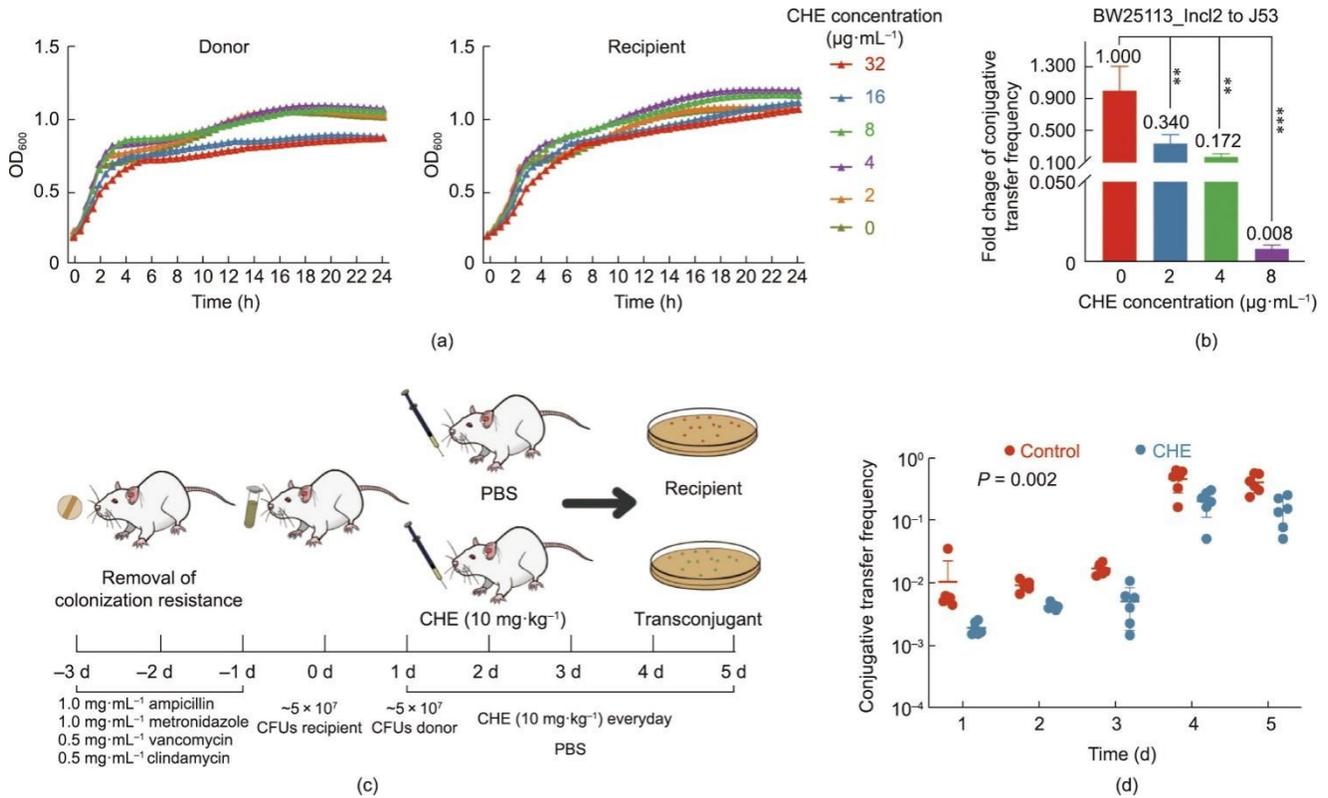


图4. 白屈菜红碱抑制携带 *mcr-1* 基因 IncI2 质粒体内外接合转移效果。(a) 不同浓度 CHE 处理下供体菌与受体菌的生长曲线。(b) CHE 处理后体外接合转移频率的变化倍数。(c) 体内接合转移试验设计。(d) CHE 对体内接合转移频率的影响 ( $n = 6$ )。P 值是通过单因素方差分析检测并使用 Dunnett 方法校正。\*、\*\*、\*\*\*和\*\*\*\*分别代表  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$  和  $P < 0.0001$ 。(d) 图中的 P 值通过双侧的 Mann-Whitney *U* 检验确定。

及附录 A 中的表 S4) ]。这些操纵子在接合转移过程中的细菌间接触时发挥着关键作用[35]。上述结果证明, 白屈菜红碱通过抑制菌毛形成和接合转移相关基因的表达从而抑制质粒的接合转移过程。

### 3.7. 白屈菜红碱不会引起 SOS 应激或增大细胞膜通透性

由氧化应激造成的 SOS 应激以及细菌细胞膜通透性增大均会促进接合转移[35–36]。虽然  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的白屈菜红碱可浓度依赖性地促进 ROS 的产生[图 5 (e)], 但在供/受体菌中与 ROS 产生以及 SOS 反应相关基因的转录情况均无显著变化[见图 5 (f) 及附录 A 中的表 S5] ]。该结果可能是因为白屈菜红碱降低了细菌胞内 ATP 水平, 从而限制了与 ROS 产生和 SOS 反应相关基因的表达[34]。此外,  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的白屈菜红碱对细菌细胞膜通透性均无显著改变[见附录 A 中的图 S2 (c)]。同时, 供/受体菌中与内外膜相关基因的表达均无显著变化[见图 5 (g) 及附录 A 中的图 S3 (c)、表 S7、表 S8]。因此, 白屈菜红碱抑制质粒接合转移的过程不受 ROS 产生、SOS 反应以及膜通透性改变的影响。上述结果证明, 低剂量的白屈菜红碱通过限制细菌的能量代谢, 抑制与接合转移相关基因的表达,

从而发挥抑制质粒接合转移的作用。

## 4. 讨论

*mcr-1* 基因自出现后迅速在全球范围内的广泛流行, 同时在人和动物肠道内的高定殖率给公共健康造成了巨大威胁[4]。本研究提出了利用植物源天然化合物白屈菜红碱在体内外展现出的双重作用机制应对可转移多黏菌素耐药性的概念。白屈菜红碱不仅能增强多黏菌素对 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的抗菌作用, 还能抑制携带 *mcr-1* 基因质粒的接合转移。除了具有抗炎[37]、抗肿瘤[38–39]、抗病毒[40]的生物活性, 本研究发现白屈菜红碱通过增大细菌细胞质膜流动性的方式, 抑制细菌电子传递链活性, 扰乱 PMF, 降低 ATP 水平, 从而限制了细菌外排泵的功能, 并抑制了 *mcr-1* 和与接合转移相关基因的表达, 最终实现了既能逆转 *mcr-1* 基因阳性菌株对多黏菌素的耐药性, 又能抑制携带 *mcr-1* 基因质粒接合转移的双重作用 (图 6)。白屈菜红碱的双重作用不仅能延长多黏菌素的使用寿命, 同时还具备实现人和动物肠道中 *mcr-1* 基因阳性菌株去定殖的潜力。

白屈菜红碱是从博落回中提取的主要活性成分之一,

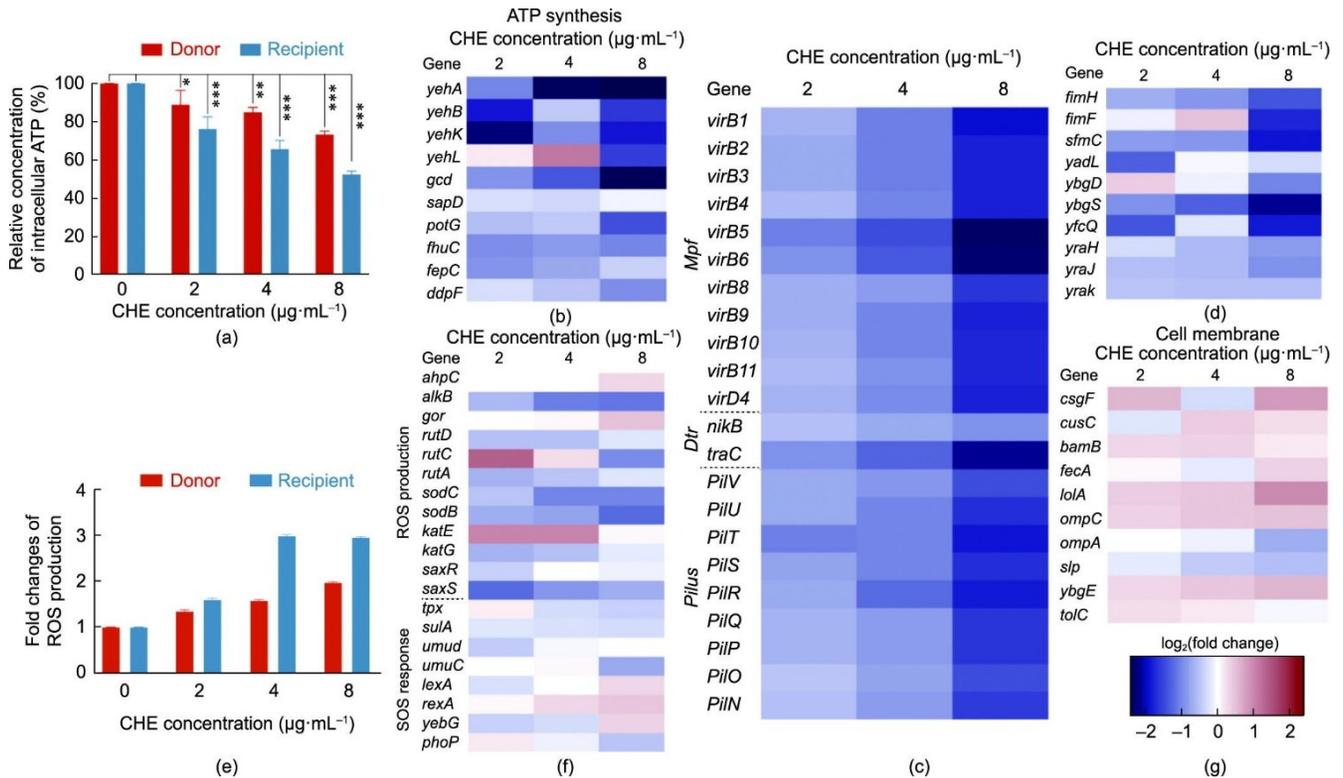


图5. 白屈菜红碱抑制质粒接合转移机制。(a) CHE处理后供体菌、受体菌胞内ATP含量的变化。(b) CHE处理后供体菌中参与ATP合成的关键基因转录水平的变化。(c) CHE处理后IncI2质粒上接合转移关键基因转录水平的变化。(d) CHE处理后供体菌中关键黏附性菌毛转录水平变化。(e) CHE处理对供体菌、受体菌胞内ROS含量影响。(f) CHE处理后供体菌中与ROS产生和SOS应激关键基因转录水平的变化。(g) CHE处理后供体菌中细胞膜关键基因转录水平的变化。 $P$ 值是通过单因素方差分析检测并使用Dunnett方法校正。\*、\*\*、\*\*\*和\*\*\*\*分别代表 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 。

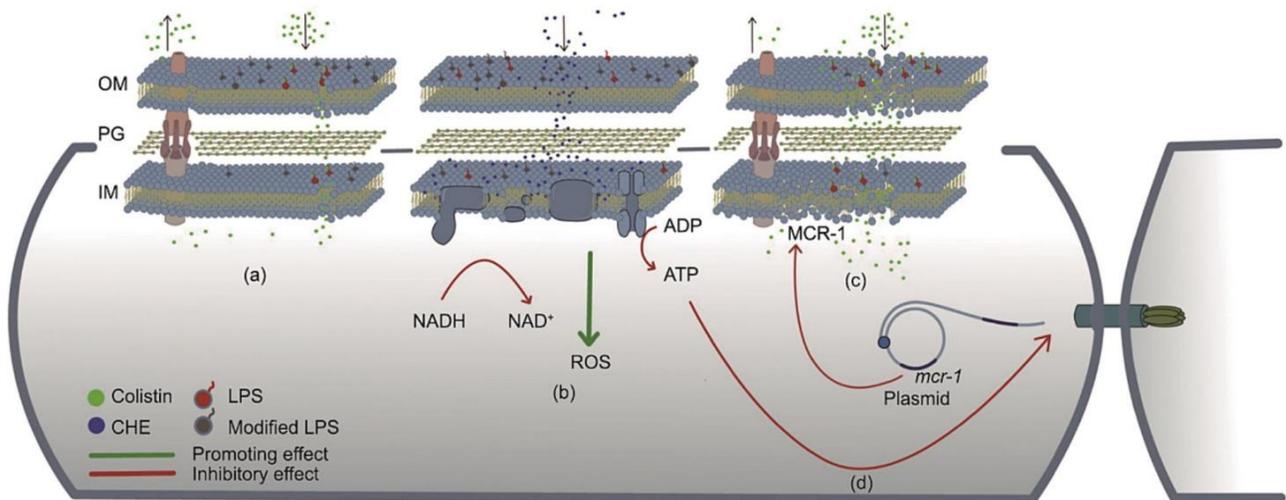


图6. 白屈菜红碱的双重作用机制。(a) 无CHE处理时, MCR-1修饰LPS, 同时外排泵可将多黏菌素排至胞外, 从而介导细菌耐药。(b) CHE可进入细菌细胞膜, 增大膜的流动性, 抑制细菌呼吸作用, 扰乱PMF, 并产生ROS, 造成胞内ATP耗竭。(c) 由于缺少ATP, MCR-1的表达量降低, 对LPS的修饰比例下降; 同时, 外排泵的功能也被抑制。(d) 此外, 参与接合转移的基因也被下调, 导致接合转移效率下降。

该成分最初被记载在16世纪出版的《本草纲目》中, 具有长期用于治疗百日咳和慢性支气管炎的历史[41]。近年来, 由于抗菌药物作为促生长剂的使用受到限制[2], 博落回提取物(Sangrovit)作为饲料添加剂在中国、美国和欧洲的畜禽养殖中广泛使用, 以促进牲畜的生长[42-44]。

自2017年以来, 国外市场上的Sangrovit销量逐年增加(每年高达2.41 t), 市场涵盖北美、南美、欧洲、日本、中东和非洲等地[45]。2017年至2022年, Sangrovit在中国的累计销量超过400 t, 其作用相当于2000多万吨复合饲料。白屈菜红碱在全球畜牧养殖业中的广泛应用可能会

增强多黏菌素在兽医临床治疗 *mcr-1* 基因阳性病原体引起的肠道感染的疗效。Sangrovit 使用量的不断增大会对细菌产生选择压力, 最终可能造成细菌对白屈菜红碱产生抗性, 以及白屈菜红碱抑制 *mcr-1* 基因水平转移能力的削弱。尽管白屈菜红碱对癌细胞具有更强的杀伤能力, 但高剂量的白屈菜红碱可能会对正常细胞造成组织特异性损伤[46–47], 因而限制其用于治疗全身性感染。然而, 白屈菜红碱通过口服给药的吸收率和生物利用度较低[48], 意味着白屈菜红碱可能是治疗肠道感染和消除肠道中泛耐药菌株的候选药物。值得注意的是, 作为动物饲料添加剂商业应用的白屈菜红碱剂量 ( $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 比本研究用于阻断体内质粒接合转移的剂量 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 低约 200 倍, 表明需要进行进一步的体内研究, 如对白屈菜红碱进行结构修饰或设计适当的剂型, 才能将其用于消除人类和动物肠道中定殖的携带 *mcr-1* 及其变异体的病原体。

细胞膜对细菌的生存和生长至关重要, 因而被认为是开发抗菌药物和佐剂的潜在靶标[20,49–50]。多黏菌素和 SLAP-S25 等膜破坏剂, 既可作为抗菌剂也可作为佐剂[15,49]。改变膜流动性的能力是抗菌药物发挥抗菌活性的一个关键因素[51–53]。细菌细胞质膜流动性的自稳态对许多细胞功能至关重要, 特别是 ATP 的产生[54]。本研究证实了白屈菜红碱能与 PG 和 CL 相互作用, 从而迅速增大细菌细胞质膜的流动性, 导致细菌的生理功能障碍, 如氧化应激和能量耗竭。由于稳定的 ATP 水平对生物合成、代谢调节和细胞维持起着至关重要的作用[55–56], 白屈菜红碱能通过降低细胞内 ATP 水平, 限制 MCR-1 等耐药蛋白的表达, 影响细菌的耐药表型。因此, 相较于 MCR-1 的特异性抑制剂[21,57], 白屈菜红碱具有增强多黏菌素对所有携带 *mcr-1* 及其变异体病原体抗菌效果的潜力。此外, 细胞内 ATP 水平的降低限制了质粒接合转移相关基因的转录, 从而降低了接合转移频率。研究发现, 一些非抗生素类药物, 如非甾体抗炎药布洛芬 (ibuprofen) 和降脂药吉非罗齐 (gemfibrozil), 已被证明可促进携带泛耐药基因质粒的接合转移[58]。然而, 关于接合转移抑制剂鲜有报道, 且多具有特异性。例如, 一些不饱和脂肪酸可以通过与质粒编码 T4SS 中的 TraE 结合以抑制接合转移[59]。虽然正常的 ATP 水平对细菌生长代谢至关重要, 但干扰细菌 ATP 合成却很少被列为抑制接合转移的潜在策略。本研究发现, 白屈菜红碱可以降低细菌 ATP 水平, 而不增加膜通透性, 也不显著改变 SOS 反应相关基因的表达。一般认为这些基因表达量的增加与促进接合转移有关。例如, 多黏菌素已被证明可通过增加膜通透性来促进耐药基因的水平转移[7]。本研究的结果表明, 增加细菌质膜流动性

以限制 ATP 产生但不破坏膜通透性是一种很有前景的对抗耐药性策略。

前有研究认为白屈菜红碱通过增大膜通透性, 从而降低细胞内 ATP 水平[60]。但本研究的结果显示白屈菜红碱对细菌细胞膜的通透性无显著破坏作用。这些相互矛盾的结论可能与药物处理后测量膜通透性的时间有关。为了探究白屈菜红碱的首要作用, 本研究在白屈菜红碱处理细菌后的 2 h 内测量了细菌的所有生理变化。而 Qian 等[60]在白屈菜红碱处理 8 h 后才测定细菌膜通透性的变化。由于白屈菜红碱具有抗菌作用, 因此 Qian 等测定膜通透性的体系中可能存在大量死细胞或膜受损的细胞, 因而认为白屈菜红碱能增大膜的通透性。此外, 本研究在白屈菜红碱处理 30 min 后观察到 ROS 的产生, 表明白屈菜红碱需要更多时间才能引起膜损伤[61]。因此, 本研究认为, 白屈菜红碱的抗菌机制为靶向细菌的 PG 和 CL、增加膜流动性和抑制电子传递链活性, 从而造成细菌能量耗竭和氧化应激。但白屈菜红碱增加膜流动性与降低细菌传递链活性之间具体的机理仍需进一步探索。

## 5. 结论

本研究发现了来源于饲料添加剂的植物源天然化合物白屈菜红碱通过抑制细菌能量代谢, 从而具有既能增强多黏菌素对 *mcr-1* 基因阳性病原体的抗菌作用, 又能抑制携带 *mcr-1* 基因质粒的接合转移的双重作用。研究结果可以为拓展已知抗菌药物遏制耐药性的其他效应提供指导, 并为今后抗菌药物和佐剂开发提供参考。

## 致谢

本研究得到岭南现代农业实验室科研项目 (NT2021006) 和国家自然科学基金 (81861138051、81991535) 的资助。

## Compliance with ethics guidelines

Huangwei Song, Xueyang Wang, Muchen Zhang, Zhiyu Zou, Siyuan Yang, Tian Yi, Jianfeng Wang, Dejun Liu, Yingbo Shen, Chongshan Dai, Zhihai Liu, Timothy R. Walsh, Jianzhong Shen, Congming Wu, and Yang Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online

<https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.06.012>.

## References

- [1] Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2006;6(9):589–601.
- [2] Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, et al. Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis* 2020;20(10):1161–71.
- [3] Liu Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16(2):161–8.
- [4] Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother* 2020;75(11):3087–95.
- [5] Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. *Microorganisms* 2020;8(11):1716.
- [6] Sun J, Zhang H, Liu Y, Feng Y. Towards understanding MCR-like colistin resistance. *Trends Microbiol* 2018;26(9):794–808.
- [7] Xiao X, Zeng F, Li R, Liu Y, Wang Z. Subinhibitory concentration of colistin promotes the conjugation frequencies of *mcr-1*- and *bla<sub>NDM-5</sub>*-positive plasmids. *Microbiol Spectr* 2022;10(2):e02160–21.
- [8] McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Microbiol Spectr* 2018;6(2):ARBA-0009–2017.
- [9] Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, Martínez JL. Defining and combating antibiotic resistance from one health and global health perspectives. *Nat Microbiol* 2019;4(9):1432–42.
- [10] Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 2017;17(4):390–9.
- [11] Outtersson K, Powers JH, Daniel GW, McClellan MB. Repairing the broken market for antibiotic innovation. *Health Aff* 2015;34(2):277–85.
- [12] Payne DJ, Miller LF, Findlay D, Anderson J, Marks L. Time for a change: addressing R&D and commercialization challenges for antibacterials. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015;370(1670):20140086.
- [13] Wright GD. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Nat Prod Rep* 2017;34(7):694–701.
- [14] Tyers M, Wright GD. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nat Rev Microbiol* 2019;17(3):141–55.
- [15] MacNair CR, Stokes JM, Carfrae LA, Fiebig-Comyn AA, Coombes BK, Mulvey MR, et al. Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nat Commun* 2018;9:458.
- [16] Liu Y, Li R, Xiao X, Wang Z. Antibiotic adjuvants: an alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2019;45(3):301–14.
- [17] Wright GD. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance. *Trends Microbiol* 2016;24(11):862–71.
- [18] Moloney MG. Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37(8):689–701.
- [19] Genilloud O. Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol* 2019;51:1–7.
- [20] Song M, Liu Y, Li T, Liu X, Hao Z, Ding S, et al. Plant natural flavonoids against multidrug resistant pathogens. *Adv Sci* 2021;8(15):e2100749.
- [21] Zhou Y, Liu S, Wang T, Li H, Tang S, Wang J, et al. Pterostilbene, a potential MCR-1 inhibitor that enhances the efficacy of polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(4):e02146–17.
- [22] Zhang R, Dong N, Huang Y, Zhou H, Xie M, Chan EWC, et al. Evolution of tigecycline- and colistin-resistant CRKP (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*) *in vivo* and its persistence in the GI tract. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:127.
- [23] Saeloh D, Tipmanee V, Jim KK, Dekker MP, Bitter W, Voravuthikunchai SP, et al. The novel antibiotic rhodomycinone traps membrane proteins in vesicles with increased fluidity. *PLoS Pathog* 2018;14(2):e1006876.
- [24] Sabnis A, Hagart KL, Klöckner A, Becce M, Evans LE, Furniss RCD, et al. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *eLife* 2021;10:e65836.
- [25] Altman FP. Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem* 1976;9(3):1–51.
- [26] Ansó E, Weinberg SE, Diebold LP, Thompson BJ, Malinge S, Schumacker PT, et al. The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function. *Nat Cell Biol* 2017;19(6):614–25.
- [27] Meylan S, Porter CBM, Yang JH, Belenky P, Gutierrez A, Lobritz MA, et al. Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control. *Cell Chem Biol* 2017;24(2):195–206.
- [28] Orazi G, Ruoff KL, O' Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* increases the sensitivity of biofilm-grown *Staphylococcus aureus* to membrane-targeting antiseptics and antibiotics. *MBio* 2019;10(4):e01501–19.
- [29] Parasassi T, Gratton E. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *J Fluoresc* 1995;5(1):59–69.
- [30] Fang G, Li W, Shen X, Perez-Aguilar JM, Chong Y, Gao X, et al. Differential Pd-nanocrystal facets demonstrate distinct antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nat Commun* 2018;9:129.
- [31] Baron SA, Rolain JM. Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(7):1862–71.
- [32] Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT. A putative RND-type efflux pump, H239\_3064, contributes to colistin resistance through CrrB in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(6):1509–16.
- [33] Cabezón E, Ripoll-Rozada J, Peña A, de la Cruz F, Arechaga I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev* 2015;39(1):81–95.
- [34] Huang H, Liao J, Zheng X, Chen Y, Ren H. Low-level free nitrous acid efficiently inhibits the conjugative transfer of antibiotic resistance by altering intracellular ions and disabling transfer apparatus. *Water Res* 2019;158:383–91.
- [35] Wang Y, Lu J, Mao L, Li J, Yuan Z, Bond PL, et al. Antiepileptic drug carbamazepine promotes horizontal transfer of plasmid-borne multi-antibiotic resistance genes within and across bacterial genera. *ISME J* 2019;13(2):509–22.
- [36] Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 2004;427(6969):72–4.
- [37] Pěničková K, Kollár P, Závalová VM, Táborská E, Urbanová J, Hošek J. Investigation of sanguinarine and chelerythrine effects on LPS-induced inflammatory gene expression in THP-1 cell line. *Phytomedicine* 2012;19(10):890–5.
- [38] Chmura SJ, Dolan ME, Cha A, Mauerci HJ, Kufe DW, Weichselbaum RR. *In vitro* and *in vivo* activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):737–42.
- [39] Platzbecker U, Ward JL, Deeg HJ. Chelerythrin activates caspase-8, downregulates FLIP long and short, and overcomes resistance to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in KG1a cells. *Br J Haematol* 2003;122(3):489–97.
- [40] Valipour M, Zarghi A, Ebrahimzadeh MA, Irannejad H. Therapeutic potential of chelerythrine as a multi-purpose adjuvant for the treatment of COVID-19. *Cell Cycle* 2021;20(22):2321–36.
- [41] Huang X, Yang M, Lei J. Research of Celandine in the treatment of cough and asthma. *Jilin J Chin Med* 2017;37(7):725–26.
- [42] Li B, Zhang JQ, Han XG, Wang ZL, Xu YY, Miao JF. *Macleaya cordata* helps improve the growth-promoting effect of chlortetracycline on broiler chickens. *J Zhejiang Univ Sci B* 2018;19(10):776–84.
- [43] Huang CY, Huang YJ, Zhang ZY, Liu YS, Liu ZY. Metabolism and tissue distribution of chelerythrine and effects of *Macleaya Cordata* extracts on liver NAD(P)H quinone oxidoreductase. *Front Vet Sci* 2021;8:659771.
- [44] Wang W, Dolan LC, von Alvensleben S, Morlacchini M, Fusconi G. Safety of standardized *Macleaya cordata* extract in an eighty-four-day dietary study in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2018;102(1):e61–8.
- [45] Anonymous. 2022. Research report on the global and Chinese *Macleaya cordata* extract industry and the 14th five-year plan analysis report. <https://www.qyresearch.com>.
- [46] Gao L, Schmitz HJ, Merz KH, Schrenk D. Characterization of the cytotoxicity of selected *Chelidonium alkaloids* in rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 2019;311:91–7.
- [47] Wang J, Song Y, Zhang N, Li N, Liu C, Wang B. Using liposomes to alleviate

- the toxicity of chelerythrine, a natural pkc inhibitor, in treating non-small cell lung cancer. *Front Oncol* 2021;11:658543.
- [48] Hu N, Chen M, Liu Y, Shi Q, Yang B, Zhang H, et al. Pharmacokinetics of sanguinarine, chelerythrine, and their metabolites in broiler chickens following oral and intravenous administration. *J Vet Pharmacol Ther* 2019;42(2):197–206.
- [49] Song M, Liu Y, Huang X, Ding S, Wang Y, Shen J, et al. A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Nat Microbiol* 2020;5(8):1040–50.
- [50] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003;55(1):27–55.
- [51] Müller A, Wenzel M, Strahl H, Grein F, Saaki TNV, Kohl B, et al. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(45):E7077–86.
- [52] Kim W, Zou G, Hari TPA, Wilt IK, Zhu W, Galle N, et al. A selective membrane-targeting repurposed antibiotic with activity against persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(33):16529–34.
- [53] Dombach JL, Quintana JLJ, Detweiler CS. Staphylococcal bacterial persister cells, biofilms, and intracellular infection are disrupted by JD1, a membrane-damaging small molecule. *MBio* 2021;12(5):e01801–21.
- [54] Mykyteczuk NCS, Trevors JT, Leduc LG, Ferroni GD. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;95(1–3):60–82.
- [55] Löffler M, Simen JD, Jäger G, Schäferhoff K, Freund A, Takors R. Engineering *E. coli* for large-scale production—strategies considering ATP expenses and transcriptional responses. *Metab Eng* 2016;38:73–85.
- [56] Yu T, Zhou YJ, Huang M, Liu Q, Pereira R, David F, et al. Reprogramming yeast metabolism from alcoholic fermentation to lipogenesis. *Cell* 2018;174(6):1549–58.e14.
- [57] Guo Y, Lv X, Wang Y, Zhou Y, Lu N, Deng X, et al. Honokiol restores polymyxin susceptibility to MCR-1-positive pathogens both *in vitro* and *in vivo*. *Appl Environ Microbiol* 2020;86(5):e02346–19.
- [58] Wang Y, Lu J, Zhang S, Li J, Mao L, Yuan Z, et al. Non-antibiotic pharmaceuticals promote the transmission of multidrug resistance plasmids through intra- and intergenera conjugation. *ISME J* 2021;15(9):2493–508.
- [59] Getino M, Sanabria-Ríos DJ, Fernández-López R, Campos-Gómez J, Sánchez-López JM, Fernández A, et al. Synthetic fatty acids prevent plasmid-mediated horizontal gene transfer. *MBio* 2015;6(5):e01032–e15.
- [60] Qian WD, Huang J, Zhang JN, Li XC, Kong Y, Wang T, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities and mechanism of action of chelerythrine against carbapenem-resistant *Serratia marcescens* *in vitro*. *Microb Drug Resist* 2021;27(8):1105–16.
- [61] Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators. *Int J Mol Sci* 2019;20(19):4968.