



叶志滨,王晓明,吕茜,等. NDM-5-C208A 突变大肠埃希菌的构建及大蒜辣素与 NDM-5 相互作用位点分析[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):61-68.

YE Zhibin, WANG Xiaoming, LÜ Xi, et al. Construction of NDM-5-C208A mutant *Escherichia coli* as well as the analysis of interaction between allicin and NDM-5[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 61-68.

NDM-5-C208A 突变大肠埃希菌的构建及大蒜辣素与 NDM-5 相互作用位点分析

叶志滨,王晓明,吕茜,刘雨桐,金季曠晓,朱馨艺,黄金虎,王丽平*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要: [目的]产新德里金属 β -内酰胺酶 5 (NDM-5) 的革兰阴性耐药菌对人畜健康产生巨大威胁。本文旨在初步探究大蒜辣素对 NDM-5 的抑制作用及其相关作用位点,为临床开发新型 β -内酰胺酶抑制剂提供理论支持。 [方法]通过 AutoDock 模拟分子对接,预测大蒜辣素与 NDM-5 的结合位点;构建突变型载体 pET21a-NDM-5-C208A,测序验证无误后转入感受态大肠埃希菌 BL21 (DE3),通过药敏试验进行突变表型确认;采用微量肉汤棋盘法和时间杀菌曲线测定大蒜辣素与美罗培南对 NDM-5 突变型细菌的联合抑菌效果。通过体外表达突变蛋白 NDM-5-C208A,建立酶活性测定体系,比较大蒜辣素对 C208 突变型 NDM-5 和野生型 NDM-5 酶活性的抑制效果。 [结果]经测序证实 NDM-5 的 C208A 突变株 BL21 (DE3) pET21a-NDM-5-C208A 构建成功,C208A 突变株恢复了对头孢类和碳青霉烯类抗生素的敏感性,且大蒜辣素与美罗培南联用的联合抑菌指数由 0.375 增加至 2,联用表现为独立作用而非协同作用;体外酶活测定结果显示 NDM-5-C208A 突变不仅使酶活性下降约 85%,而且该位点突变导致大蒜辣素对 NDM-5 失去抑制作用。 [结论] Cys208 位点是维持 NDM-5 水解酶活性的关键位点,且大蒜辣素可通过与该位点结合发挥抑制酶活性的作用。该结果为大蒜辣素作为新型 β -内酰胺酶抑制剂的开发和应用提供试验依据。

关键词: 大蒜辣素;NDM-5;美罗培南;酶抑制剂

中图分类号:S852.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0061-08

Construction of NDM-5-C208A mutant *Escherichia coli* as well as the analysis of interaction between allicin and NDM-5

YE Zhibin, WANG Xiaoming, LÜ Xi, LIU Yutong, JINJI Zexiao, ZHU Xinyi, HUANG Jinhu, WANG Liping*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objectives] Gram-negative resistant bacteria producing New Delhi metallo- β -lactamase-5 (NDM-5) pose great threat to the health of human and domestic animals. The study aimed to explore the inhibitory action and the involved mechanism of allicin on NDM-5, which could provide theoretical support for the development of novel β -lactamase inhibitors. [Methods] The binding site of allicin and NDM-5 was predicted by molecular docking with AutoDock. Mutant vector pET21a-NDM-5-C208A was constructed and transferred into *E. coli* BL21 (DE3) competent cell after sequencing. Sensitive test was performed to verify the phenotype of mutant strain. Checkerboard method and time-kill curves assay were performed to assess the combination effect of allicin and meropenem against NDM-5 mutant strain. Enzyme activity assay was established to compare the inhibitory effect of allicin on the activities of C208 mutant NDM-5 and wild-type NDM-5 by expressing the mutant protein NDM-5-C208A *in vitro*. [Results] The C208A mutant strain BL21 (DE3) pET21a-NDM-5-C208A was successfully constructed confirmed by sequencing. The C208A mutant strain regained susceptibility to cephalosporins and carbapenems, and the combination of allicin and meropenem showed independent effect, but not synergistic effect (FICI increased from 0.375 to 2). Enzyme activity assay showed that C208A mutation of NDM-5 caused the decrease of enzyme activity by 85% *in vitro* and the mutation resulted in the loss of inhibitory effect of allicin on NDM-5. [Conclusions] The Cys208 is a key site for maintaining the enzymatic hydrolysis activity of NDM-5, and allicin can exert an inhibitory effect on the enzyme activity by binding to this site. The results provide a strong support for developing and applying of allicin as a novel β -lactamase inhibitor.

Keywords: allicin; NDM-5; meropenem; enzyme inhibitor

收稿日期:2022-10-19

基金项目:江苏省自主创新项目(CX[22]3039)

*通信作者:王丽平,教授,博导,研究方向为细菌耐药机制,E-mail:wlp71@163.com。

由于抗生素长期在临床治疗和畜禽养殖上的不规范使用,各类细菌的耐药性日益严重,尤其对碳青霉烯类抗生素耐药的肠杆菌(carbapenems resistance enterobacteria, CRE)严重威胁公共卫生安全,已被世界卫生组织(WHO)列为对人类健康威胁最大的超级细菌以及急需开发新型抗生素的极为重要病原体之一^[1-2]。CRE菌株可产生水解 β -内酰胺类抗生素的碳青霉烯酶,其中最常见的是新德里金属- β -内酰胺酶(New Delhi metallo- β -lactamase, NDM),其活性中心有2个锌离子,能广泛水解除氨曲南之外的 β -内酰胺类抗生素,是临床 β -内酰胺类抗生素的头号威胁^[3-4]。NDM自2009年首次在印度新德里发现之后便在全球广泛流行,极大地限制了碳青霉烯类及其他 β -内酰胺类药物的使用,致使“超级细菌”的威胁日益严重^[5-7]。迄今为止,NDM已产生了三十多种变体,在人群、动物和环境分布较为广泛的是NDM-5^[8]。研究证实经典的 β -内酰胺酶抑制剂如克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦等对NDM均无效。开发新型抗耐药菌药物难度大、成本高、周期长,因此,筛选NDM酶特异性抑制剂以遏制其对现有抗生素的灭活成为抗碳青霉烯耐药菌药物研发的首选方案。

大蒜是药食两用植物,已有数千年的应用历史。研究发现大蒜中的活性成分大蒜辣素(allicin,化学名为二丙烯基硫代亚磺酸酯)具有显著的抗菌活性^[9]。本课题组前期研究发现,大蒜辣素不仅具有直接的抗菌活性,而且大蒜辣素能通过有效抑制NDM活性,恢复碳青霉烯类抗生素对产NDM大肠埃希菌的抑菌活性,但其与NDM酶的互作位点及具体抑制机制尚未阐明。因此,本研究基于分子对接的预测结果,进一步通过定点突变方法研究了NDM-5的Cys208位点对NDM-5活性的影响,以及大蒜辣素联用美罗培南对NDM野生型和Cys208突变菌株的抑菌作用差异,初步探讨大蒜辣素的抑酶活性以及与NDM-5的互作位点,以期开发和应用于大蒜辣素作为金属- β -内酰胺酶抑制剂提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 携带NDM-5酶表达基因的工程菌株大肠埃希菌BL21(DE3)pET21a-NDM-5由本实验室构建并保存,大肠埃希菌ATCC-25922购于中国兽医药品监察所。

1.1.2 仪器与试剂 PCR仪、核酸电泳槽、蛋白电泳槽和凝胶成像系统均购于美国Bio-Rad公司;Ni-NTA镍柱购于上海生工生物公司;细胞超声波破碎仪购于宁波新芝生物科技有限公司;Synergy H1酶标仪购于美国伯腾仪器有限公司;定点突变试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;LB肉汤、LB琼脂、MH肉汤均购于青岛海博生物技术有限公司;蒜粉(潜在大蒜辣素含量为1.603%)由新疆医科大学提供;阿莫西林($\geq 98\%$)、氨苄西林($\geq 98\%$)、头孢呋辛($\geq 98\%$)、头孢他啶($\geq 98\%$)、头孢噻肟($\geq 99.5\%$)、美罗培南($\geq 98\%$)购自上海阿拉丁生化科技有限公司;咪唑、苯甲基磺酰氟(PMSF)和异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司;SDS-PAGE快速配胶试剂盒购于雅酶生物公司。

1.2 方法

1.2.1 分子对接 选择蛋白数据库中的NDM-5(PDB:6MGY)作为受体,ZINC数据库中的大蒜辣素(ZINC:1530846)作为配体。在AutoDock中对NDM-5进行去水、加氢处理,对大蒜辣素加氢后进行分析。在软件中将处理后的NDM-5与大蒜辣素执行刚性蛋白质和柔性配体的标准对接程序,对软件给出的结合位点进行筛选。

1.2.2 NDM-5突变体工程菌株的构建 采用点突变试剂盒对本实验室前期构建的质粒pET21a-NDM-5进行点突变,具体方法参照说明书。根据碱基变动尽量少的原则设计突变引物,将NDM-5第208位活性位点半胱氨酸(Cys, C)突变为惰性氨基酸丙氨酸(Ala, A)。上游引物设计为NDM-5-C208A-F: 5'-TTTGTTGGCGCCCTGATCAAGGACAGCAAGGCC-3',下游引物设计为NDM-5-C208A-R: 5'-ATCAGGGCGC-CACCAAAGCGATGTCGGTGCC-3',下划线处为突变位置。参考说明书优化扩增体系和反应程序,扩增体系包括:25 μ L 2 \times Max Buffer、1 μ L dNTP Mix、10 ng DNA、2 μ L上游引物、2 μ L下游引物、1 μ L DNA Polymerase,加ddH₂O至50 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 6 min,共18个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。使用Dpn I酶特异性识别并消化反应产物中原始的甲基化模板质粒,防止原始质粒干扰形成假阳性克隆。用Exnase II酶催化扩增消化产物,将突变位点进行高效重组,实现线性DNA的体外环化。将产物转入感受态大肠埃希菌BL21(DE3),在氨苄青霉素抗性的LB平板上涂布后于37 $^{\circ}$ C静置过夜培养。次日挑取阳性克隆转接至氨苄抗性LB肉汤,37 $^{\circ}$ C振荡培养8 h后菌液送南京生工生物公司测序。

将测序结果正确的转化子命名为大肠埃希菌 BL21(DE3)pET21a-NDM-5-C208A,甘油保存。

1.2.3 NDM-5 突变体转化子的抗生素表型验证 根据 EUCAST 推荐的微量肉汤稀释法^[10]测定 6 种 β -内酰胺类抗生素氨苄西林、阿莫西林、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢他啶和美罗培南对大肠埃希菌 BL21(DE3)pET21a-NDM-5 和大肠埃希菌 BL21(DE3)pET21a-NDM-5-C208A 的最小抑菌浓度(MIC),大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌株。根据 EUCAST 敏感性折点进行菌株耐药性评价^[11]。各药物折点分别为氨苄西林 $<8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、阿莫西林 $<8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、头孢呋辛 $<8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、头孢噻肟 $<1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、头孢他啶 $<1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和美罗培南 $<2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.4 不同浓度的大蒜辣素对 NDM-5 野生型和突变体菌株生长的影响 将大肠埃希菌 BL21(DE3)pET21a-NDM-5 和 BL21(DE3)pET21a-NDM-5-C208A 接种于 LB 肉汤中过夜培养后,调整菌液浓度 D_{600} 值为 0.1 后均匀加入 96 孔板,除对照组外,每孔再加入不同梯度终浓度的大蒜辣素,于 37 °C 恒温培养。每隔 4 h 测定 D_{600} ,绘制不同菌株的生长曲线。

1.2.5 NDM-5 突变体的表达与纯化 挑选测序与表型结果符合预期的大肠埃希菌 BL21(DE3)pET21a-NDM-5-C208A 转接至 LB 肉汤中,37 °C 过夜振荡培养。将过夜培养物按 1:100 稀释至 1 L 的新鲜 LB 肉汤中,培养至菌液的 D_{600} 值为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.2 mmol·L⁻¹ 的 IPTG,转入 30 °C 摇床中振荡培养 16 h。12 000 g 离心 30 min 后弃上清液,用平衡缓冲液重悬沉淀并加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 PMSF 以保护蛋白,将重悬混合液在冰浴条件下进行超声破碎,功率为 35 W,破碎 5 s,暂停 10 s,共超声 15 min。12 000 g 离心 30 min 后取上清液,将上清液加至平衡液平衡好的 Ni-NTA 柱,用梯度浓度(20~500 mmol·L⁻¹) 的咪唑缓冲液冲洗柱子并收集各洗脱液,将各洗脱液逐一进行 SDS-PAGE 验证。把含有单一目的条带的洗脱液混合后用截留蛋白相对分子质量为 10×10^3 的超滤离心管进行换液和浓缩。SDS-PAGE 验证浓缩液纯度后,Nanodrop 检测浓缩液中的蛋白浓度。

1.2.6 NDM-5 突变体的酶活性测定 为测定所得 NDM-5-C208A 突变对酶活性的影响,比较相同浓度的 NDM-5 与 NDM-5-C208A 对底物美罗培南的水解能力。参考文献[12]的方法,略作优化后进行测定。水解反应于 96 孔板中进行,每孔分别加入 100 μL 稀释后终浓度为 20 nmol·L⁻¹ 的 NDM-5 和 NDM-5-C208A,接着每孔均加入 100 μL 终浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 美罗培南溶液,温和振荡 96 孔板使酶与底物充分接触,迅速放入酶标仪,于 30 °C 检测 D_{300} 值的变化,每隔 1 min 检测 1 次,持续检测 30 min。将 2 组底物美罗培南吸光值的下降量除以各自反应时间分别得到 NDM-5 和 NDM-5-C208A 的水解速率 v_{WT} 和 v_{MT} 。设定 NDM-5 的酶活性为 100%,则 NDM-5-C208A 的酶活性为 $(v_{\text{MT}}/v_{\text{WT}})\times 100\%$ 。

1.2.7 大蒜辣素对 NDM-5 及突变体 NDM-5-C208A 的抑制活性比较 构建反应体系测定大蒜辣素对 NDM-5 和 NDM-5-C208A 的酶抑制情况。于 96 孔板中进行反应,每孔分别加入 50 μL 终浓度为 20 nmol·L⁻¹ 的 NDM-5 和 NDM-5-C208A,与梯度浓度大蒜辣素(0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 于 30 °C 下孵育 30 min。接着加入 100 μL 终浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的美罗培南溶液后立刻放入酶标仪中检测 30 min 内 D_{300} 的变化。计算对照组中酶水解速率(v_0),大蒜辣素处理后的酶水解速率(v_i),以 2 组对照组中的酶活性为 100%,剩余酶活性为 $(v_i/v_0)\times 100\%$ 。

1.2.8 大蒜辣素联合美罗培南对 NDM-5 野生型和 NDM-5-C208A 突变菌株的联合抑菌活性 采用微量肉汤棋盘稀释法^[13]测定大蒜辣素与美罗培南联合对 NDM-5 野生型菌株和 NDM-5-C208A 突变菌株的联合抑菌活性。反应于 96 孔板中进行,在 6×6 范围内将二倍梯度稀释的 2 种药物分别与 2 株细菌悬液($1.5\times 10^6 \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混合,于 37 °C 温箱中静置培养 18 h。根据公式计算联合抑菌指数(FICI): $FICI = FICI_a + FICI_b = MIC_{ab}/MIC_a + MIC_{ba}/MIC_b$ 。式中: MIC_a 是化合物 A 单独的 MIC; MIC_{ab} 是联用药物时化合物 A 的 MIC; MIC_b 为化合物 B 单独的 MIC; MIC_{ba} 是联用药物时化合物 B 的 MIC。判读标准: $FICI \leq 0.5$ 为协同作用; $0.5 < FICI \leq 1$ 为相加作用; $1 < FICI \leq 2$ 为无关作用; $FICI > 2$ 为拮抗作用。

1.2.9 不同浓度的大蒜辣素对 NDM-5 野生型和突变体菌株的时间杀菌曲线 将大肠埃希菌 BL21(DE3)pET21a-NDM-5 和 BL21(DE3)pET21a-NDM-5-C208A 过夜培养后,以 1:1 000 稀释于 LB 肉汤后进行如下药物处理:对大肠埃希菌 BL21(DE3)pET21a-NDM-5,分别设美罗培南处理组(32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/4 MIC)、大蒜辣素处理组(8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/2 MIC)、美罗培南(32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/4 MIC)+大蒜辣素(8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/2 MIC)联合处理组,以及不加药的空白对照组;对突变菌株 BL21(DE3)pET21a-NDM-5-C208A,分别设美罗培南处理组(0.004 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/4 MIC)、大蒜辣素处理组(4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/2 MIC)、美罗培南(0.004

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/4 MIC)+大蒜辣素($4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1/2 MIC)联合处理组,以及不加药的空白对照组。处理完毕后于 $37\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养 24 h,每隔 6 h 分别吸取 $100\ \mu\text{L}$ 菌液用无菌 PBS 系列梯度稀释后进行活菌计数,以时间为横轴、lgCFU 为纵轴绘制时间杀菌曲线。

2 结果与分析

2.1 关键结合位点的确认及 NDM-5 C208A 转化子的鉴定

经过 AutoDock 软件的模拟对接,得到大蒜辣素与 NDM-5 的结合模式图(图 1-A)。大蒜辣素与 NDM-5 有 4 个可能结合的位点,其中只有 Cys208 位于酶活性口袋处,推测其对维持酶活性有重要作用,故选择 Cys208 为关键位点进行突变。对转化后的突变子疑似阳性克隆进行测序,将测序结果与 NDM-5 的序列进行比较,结果(图 1-B)显示已成功将 Cys208 突变为 Ala208,且未发现其他突变,符合后续试验要求。将成功构建的 NDM-5-C208A 突变载体命名为 pET21a-NDM-5-C208A,菌株命名为大肠埃希菌 BL21(DE3) pET21a-NDM-5-C208A。

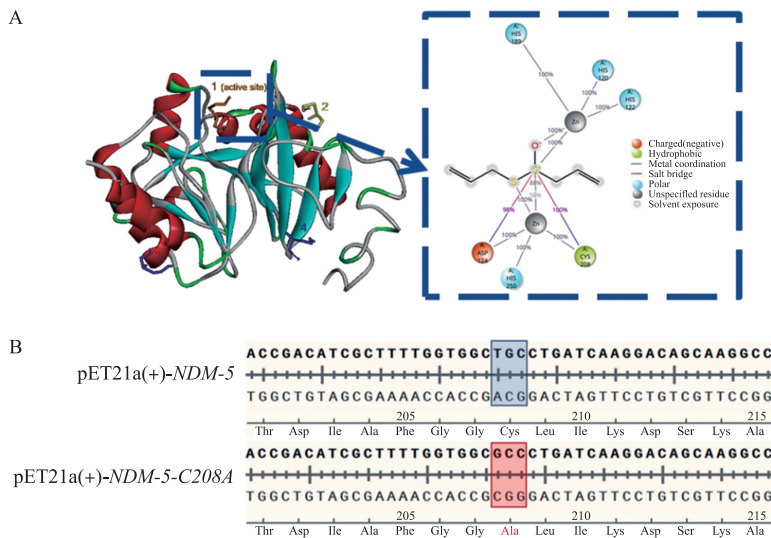


图 1 大蒜辣素与 NDM-5 结合位点预测(A)及 NDM-5-C208A 转化子序列鉴定(B)

Fig. 1 Binding sites prediction of allicin with NDM-5(A) and sequence identification of NDM-5-C208A transformants(B)

2.2 不同抗生素和大蒜辣素对 NDM-5-C208A 突变菌株和野生型菌株的 MIC

通过药敏试验检测转化子对 6 种抗生素的敏感性见表 1。NDM-5 野生型菌株 BL21(DE3) pET21a-NDM-5 与 NDM-5-C208A 突变菌株 BL21(DE3) pET21a-NDM-5-C208A 均对氨苄西林和阿莫西林表现出耐药;NDM-5 野生型菌株 BL21(DE3) pET21a-NDM-5 对头孢呋辛、头孢噻肟、头孢他啶和美罗培南表现为耐药,但是 NDM-5 的 Cys208 位点突变为 Ala 后,菌株对头孢呋辛、头孢噻肟、头孢他啶和美罗培南则会恢复敏感,表明 NDM-5-C208 位点对水解头孢类和碳青霉烯类抗生素非常关键。

表 1 β -内酰胺类抗生素和大蒜辣素对重组菌株的 MIC

Table 1 MIC of β -lactam antibiotics against recombinant strains

抗菌药 Antimicrobial agents	<i>E. coli</i> BL21(DE3)- pET21a-NDM-5	<i>E. coli</i> BL21(DE3)- pET21a-NDM-5-C208A	<i>E. coli</i> ATCC-25922	EUCAST 敏感性折点 Breakpoint of EUCAST
氨苄西林 Ampicillin	>256	>256	8	<8
阿莫西林 Amoxicillin	>256	>256	8	<8
头孢呋辛 Cefuroxime	128	0.5	4	<8
头孢噻肟 Cefotaxime	64	≤ 0.5	≤ 0.5	<1
头孢他啶 Ceftazidime	64	≤ 0.5	≤ 0.5	<1
美罗培南 Meropenem	128	0.0156	≤ 0.125	<2
大蒜辣素 Allicin	16	8	16	

2.3 大蒜辣素对 NDM-5 菌株突变前后生长曲线的影响

通过测定生长曲线以判断大蒜辣素对大肠埃希菌 BL21(DE3) pET21a-NDM-5 和 大肠埃希菌 BL21(DE3) pET21a-NDM-5-C208A 的生长是否有影响。从图 2 可知,大蒜辣素对大肠埃希菌 BL21(DE3)

pET21a-NDM-5 的生长有一定的抑制作用,当大蒜辣素浓度为 $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时可完全抑制其生长。显示大蒜辣素对 NDM-5 突变型大肠埃希菌的生长抑制存在剂量-效应关系,当大蒜辣素浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,处理组和对照组无显著差异 ($P>0.05$),而当大蒜辣素浓度升高至 $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时则能完全抑制其生长。这表明大蒜辣素对野生型和 NDM-5-C208A 突变菌均有直接抑制作用。

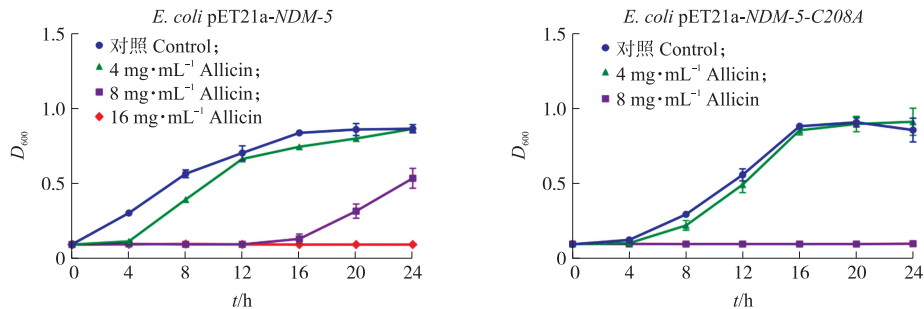


图 2 不同质量浓度大蒜辣素处理后大肠埃希菌的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *E. coli* strains treated with different concentrations of allicin

2.4 NDM-5-C208A 蛋白的纯化及活性测定

对突变体蛋白进行大量表达和纯化浓缩后,SDS-PAGE 电泳分析验证蛋白纯度。图 3-A 显示蛋白相对分子质量符合预期 24×10^3 ,且条带单一,纯度 $>90\%$,采用 Nanodrop 测定突变型蛋白浓度为 $3.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明突变体蛋白纯化成功,能满足后续试验要求。将纯化后的 NDM-5 和 NDM-5-C208A 进行活性测定。将 NDM-5 的水解活性设为 100%,则 NDM-5-C208A 水解底物美罗培南的酶活性极显著下降 ($P<0.001$),与野生型 NDM-5 相比,突变体的酶活性下降约 85%(图 3-B),表明 Cys208 位点是 NDM-5 维持水解活性的关键位点。

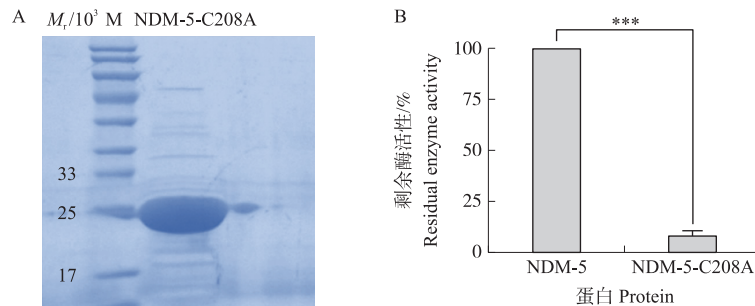


图 3 NDM-5-C208A 的表达纯化(A)及酶活性测定(B)

Fig. 3 Expression and purification of NDM-5-C208A (A) and the determination of the enzyme activity of NDM-5-C208A (B)

M. 蛋白标准品 Protein marker. *** $P<0.001$.

2.5 大蒜辣素对 NDM-5 和 NDM-5-C208A 的抑制效果

不同浓度大蒜辣素分别作用于 NDM-5 和 NDM-5-C208A,将无大蒜辣素处理组的酶活性定义为 100%,通过与各自的对照组比较计算其剩余的酶活性。从图 4 可知: $10\sim 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的大蒜辣素均对

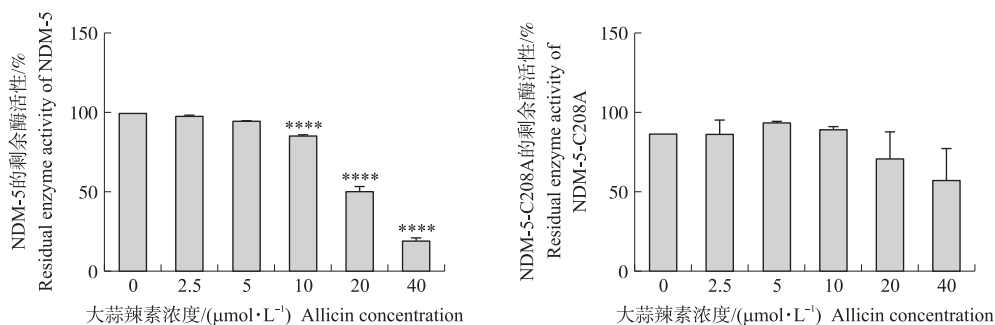


图 4 不同浓度大蒜辣素处理后 NDM-5 和 NDM-5-C208A 的酶活性比较

Fig. 4 Residual enzyme activity of NDM-5 and NDM-5-C208A treated with different concentrations of allicin

**** $P<0.0001$.

NDM-5 酶活性有极显著的抑制作用 ($P < 0.0001$), 并存在明显的剂量效应; 不同浓度的大蒜辣素对 NDM-5-C208A 的酶活性影响均不显著 ($P > 0.05$)。

2.6 大蒜辣素联合美罗培南对 NDM-5 的 Cys208 位点突变前后菌株的联合抑菌作用比较

从图 5 可知, 大蒜辣素联合美罗培南对大肠埃希菌 BL21(DE3) pET21a-NDM-5 的 FICI 为 0.375, 表示二者对其有协同抑菌作用, 二者联用对突变菌 BL21(DE3) pET21a-NDM-5-C208A 的 FICI 为 2, 表现为独立作用, 失去协同抗菌作用。

时间杀菌曲线(图 6)显示亚抑菌浓度的大蒜辣素与美罗培南单独使用均不能有效杀灭大肠埃希菌 BL21(DE3) pET21a-NDM-5, 但是二者即使采用亚抑菌浓度进行联用也能抑制细菌的生长并表现出了明显的杀菌效果; 若菌株的 NDM-5 发生 C208A 突变后, 大蒜辣素和美罗培南则无明显的联合杀菌效果。细菌体内试验再次证实 NDM-5 的 Cys208 是大蒜辣素对酶发挥抑制作用的关键位点。

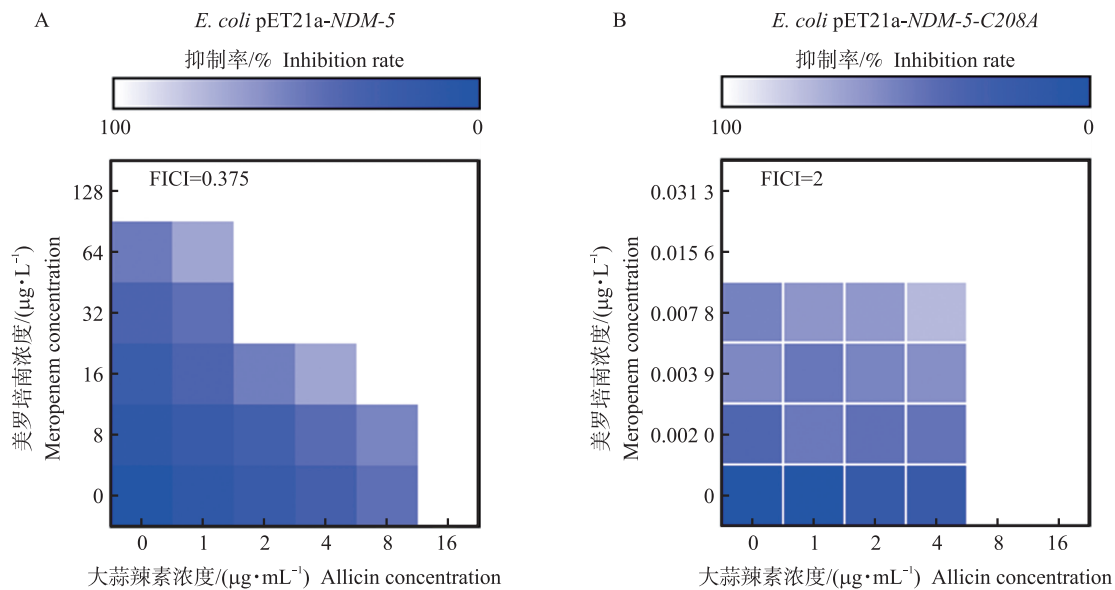


图 5 美罗培南和大蒜辣素联用对 NDM-5 阳性菌株 (A) 及其 C208A 突变后菌株 (B) 的作用结果

Fig. 5 The effect of combination of meropenem and allixin on NDM-5 positive strain (A) and its C208A mutation strain (B)

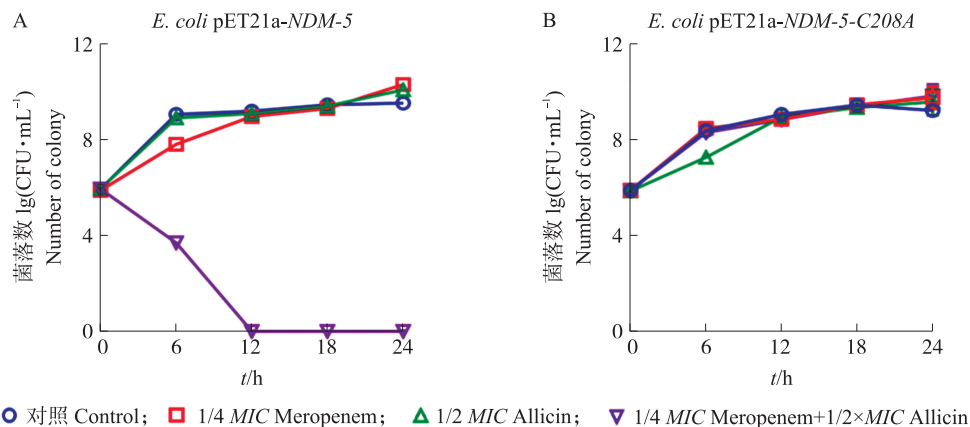


图 6 大蒜辣素和美罗培南联合对 NDM-5 野生型菌株 (A) 及 Cys208 突变菌株 (B) 的时间杀菌曲线

Fig. 6 Time-dependent killing curve of the combination of allixin and meropenem against NDM-5 wild type strain (A) and its Cys208 mutation strain (B)

3 讨论

近年来, 耐药菌的产生和传播以及相关有效药物的缺乏已成为威胁公众健康的重要问题^[14]。碳青霉烯类抗生素是人医临床抗革兰阴性菌感染的“最后一道防线”^[15]。但近些年来不断有研究显示人、动物及其所处环境中均能检测到介导细菌对碳青霉烯类耐药的 NDM 基因, 并存在不同生态位的水平传播。

人医临床中也发现碳青霉烯类抗生素逐渐失去了应有的治疗效果^[16-18]。NDM 可以水解除氨曲南之外的所有 β -内酰胺类抗生素,因此,NDM 在畜禽中的检出对兽医临床常用的青霉素类及专用的头孢类抗生素的活性也会产生重要影响。NDM 导致的耐药已成为人医和兽医临床共同关注的焦点。

NDM 具有典型的 $\alpha\beta/\beta\alpha$ 三明治结构,其中 α -螺旋与 β -折叠通过柔性的 Loop 环连接,该空间折叠结构特点使 NDM 对不同的 β -内酰胺类抗生素都具有高度的适应性^[19]。NDM 的活性中心有 2 个 Zn^{2+} ,各自可与 3 个氨基酸残基相互作用, Zn_1 与 His120、His122 和 His189 配位; Zn_2 则与 Asp124、Cys208 和 His250 配位,研究表明活性中心的残基对维持 NDM 酶水解活性至关重要,因此是较为理想的抑制剂潜在作用靶点^[20]。NDM 结构的解析为采用分子对接、蛋白结晶等技术用于预测和模拟受体-配体复合物结构以及结合位点提供重要基础^[21]。本文则是基于模拟对接分析大蒜辣素与 NDM-5 的结合位点为活性保守残基 Cys208,进一步通过定点突变方法成功构建出突变型载体 pET21a-NDM-5-C208A,由此获得 NDM-5 的 C208 位点突变菌株,并证实 C208A 突变可导致 NDM 水解头孢类抗生素和碳青霉烯类抗生素的活性下降,后续的体外酶水解试验进一步佐证了该结果。Wang 等^[12]发现当 Cys208 被突变为惰性氨基酸丙氨酸(Ala)后,NDM 的酶活性约下降了 80%,本研究结果与之较为一致,均证实该残基对 NDM-5 水解活性的重要性以及外源化合物可通过干预该位点起到抑制酶活性的作用。本试验中发现构建的 C208A 突变菌株对氨苄西林与阿莫西林仍表现耐药,我们分析是由于表达载体 pET21a 携带氨苄西林抗性,因此 NDM 失去了水解活性,而质粒携带的抗性基因仍在发挥作用。我们后续将通过筛选其他抗性载体进行验证。

随着近些年细菌耐药性的广泛蔓延,抗生素在兽医和人医临床中的应用越来越谨慎,因此从现有化学物质或天然化合物中筛选特异性酶抑制剂与 β -内酰胺类抗生素联用,以恢复现有抗生素作用是当前抗 CRE 感染的较为经济有效的方法。基于该策略,目前已报道了 500 余种具有抑制 NDM 作用的活性分子,这些化合物或可通过作用于 NDM 活性位点的锌离子^[22],或可与活性氨基酸残基通过共价结合改变酶的空间构象而发挥作用^[22-23]。厚朴酚^[24]、黄芩苷^[25]和紫檀芪^[26]等一些天然产物也纷纷被证实对 NDM 有抑制效果,但作用机制均未探讨。本课题组的研究结果以及一些文献已显示大蒜辣素具有较好的直接抗菌活性^[27-28]。此外,我们发现其对产碳青霉烯酶的耐药肠杆菌也有较好活性,与碳青霉烯类抗生素美罗培南联合有显著的协同抗菌作用,故推测其对碳青霉烯酶有一定抑制作用。本文进一步通过分子对接、定点突变、蛋白表达等体外方法证实亚抑菌浓度的大蒜辣素对 NDM-5 具有剂量依赖性的显著抑制作用,且其抑制作用与 NDM 的 Cys208 位点相关。为进一步证实该作用,我们采用亚抑菌浓度的大蒜辣素与美罗培南进行了联合抑菌试验并计算联合抑菌指数(FICI),FICI 是评价 2 种药联用效果的最佳量化指数^[29]。亚抑菌浓度的大蒜辣素与美罗培南联用后对 NDM-5 野生型菌株的 FICI 为 0.375,而对 NDM-5-C208A 的 FICI 为 2,这表明 C208 位点突变后,无法与大蒜辣素结合,进而与亚抑菌浓度的美罗培南无联合效果。时间杀菌曲线结果也证实该点。以上独立试验均表明位点 Cys208 对大蒜辣素与 NDM-5 的结合发挥了至关重要的作用,这与文献报道的一些 NDM 共价抑制剂,如硝普钠^[30]、依布硒啉^[31]等的抑制作用原理相似。有研究显示,大蒜辣素可以与含巯基的酶如木瓜蛋白酶、乙醇脱氢酶等发生反应进而导致酶失活^[32]。因此,我们初步推测大蒜辣素通过其特有的烯丙巯基结构($S-CH_2-CH=CH_2$)可与 NDM 活性中心的 Cys-SH 发生共价结合,进而导致酶空间构象改变而失去水解活性,后续我们拟采用质谱方法结合药物蛋白共结晶方法进一步验证。另外,大蒜辣素是否对其他碳青霉烯酶如 KPC、IMP、VIM 有效,也值得进一步探讨。

综上所述,本研究首次探讨了大蒜辣素对 NDM-5 的抑制作用及其相关作用位点,提示大蒜辣素有望以一种新型的碳青霉烯类抗生素佐剂用于产 NDM 的 CRE 菌株感染治疗,并具有较好的应用前景。

参考文献 References:

- [1] Munoz-Price L S, Poirel L, Bonomo R A, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2013, 13(9): 785-796.
- [2] Schwaber M J, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat [J]. *Journal of the American Medical Association*, 2008, 300(24): 2911-2913.
- [3] Mojica M F, Rossi M A, Vila A J, et al. The urgent need for metallo- β -lactamase inhibitors: an unattended global threat [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2022, 22(1): e28-e34.
- [4] Ju L C, Cheng Z S, Fast W, et al. The continuing challenge of metallo- β -lactamase inhibition: mechanism matters [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2018, 39(7): 635-647.

- [5] Moellering R C, Jr. NDM-1: a cause for worldwide concern[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 363(25): 2377–2379.
- [6] Timothy R W, Janis W, David M L, et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11(5): 355–362.
- [7] Khan A U, Maryam L, Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health[J]. *BMC microbiology*, 2017, 17(1): 101.
- [8] Liu Z H, Wang K, Zhang Y R, et al. High prevalence and diversity characteristics of *bla*_{NDM}, *mcr*, and *bla*_{ESBLs} harboring multidrug-resistant *Escherichia coli* from chicken, pig, and cattle in China[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 11: 755545.
- [9] 马丽娜, 李峰杰, 陈坚, 等. 大蒜主要活性成分及药理作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(6): 760–763.
Ma L N, Li F J, Chen J, et al. Research advances in garlic's main active ingredients and their pharmacological effects [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2014, 30(6): 760–763 (in Chinese with English abstract).
- [10] Bulik C C, Fauntleroy K A, Jenkins S G, et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(7): 2402–2406.
- [11] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0 [EB/OL]. [2022-07-02]. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf.
- [12] Wang R M, Lai T P, Gao P, et al. Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo- β -lactamase inhibitors[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 439.
- [13] Liu Y, Jia Y Q, Yang K N, et al. Anti-HIV agent azidothymidine decreases Tet(X)-mediated bacterial resistance to tigecycline in *Escherichia coli*[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 162.
- [14] Urban-Chmiel R, Marek A, Stepień-Pysniak D, et al. Antibiotic resistance in bacteria: a review[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(8): 1079.
- [15] El-Gamal M I, Brahim I, Hisham N, et al. Recent updates of carbapenem antibiotics[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 131: 185–195.
- [16] Wang M G, Fang C, Liu K D, et al. Transmission and molecular characteristics of bla_{NDM}-producing *Escherichia coli* between companion animals and their healthcare providers in Guangzhou, China[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2022, 77(2): 351–355.
- [17] Yang F X, Tian X L, Han B J, et al. Tracking high-risk beta-lactamase gene (*bla* gene) transfers in two Chinese intensive dairy farms[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 274: 116593.
- [18] Lu X Y, Du Y F, Peng K, et al. Coexistence of *tet*(X4), *mcr*-I, and *bla*_{NDM-5} in ST6775 *Escherichia coli* isolates of animal origin in China[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0019622.
- [19] Charan J, Mulla S, Ryavanki S, et al. New Delhi metallo-beta lactamase-1 containing Enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern[J]. *The Pan African Medical Journal*, 2012, 11: 22.
- [20] Liang Z J, Li L C, Wang Y Y, et al. Molecular basis of NDM-1, a new antibiotic resistance determinant[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23606.
- [21] Bottegoni G, Rocchia W, Cavalli A. Application of conformational clustering in protein-ligand docking[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 819: 169–186.
- [22] Wang T, Xu K J, Zhao L Y, et al. Recent research and development of NDM-1 inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 223: 113667.
- [23] Linciano P, Cendron L, Gianquinto E, et al. Ten years with New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): from structural insights to inhibitor design[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(1): 9–34.
- [24] Liu S, Zhou Y L, Niu X D, et al. Magnolol restores the activity of meropenem against NDM-1-producing *Escherichia coli* by inhibiting the activity of metallo-beta-lactamase[J]. *Cell Death Discovery*, 2018, 4: 28.
- [25] Shi C, Bao J X, Sun Y, et al. Discovery of Baicalin as NDM-1 inhibitor: virtual screening, biological evaluation and molecular simulation[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 88: 102953.
- [26] Liu S, Zhang J, Zhou Y L, et al. Pterostilbene restores carbapenem susceptibility in New Delhi metallo- β -lactamase-producing isolates by inhibiting the activity of New Delhi metallo- β -lactamases[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2019, 176(23): 4548–4557.
- [27] Cavallito C J, Bailey J H. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1944, 66(11): 1950–1951.
- [28] Leontiev R, Hohaus N, Jacob C, et al. A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 6763.
- [29] Liu Y, Jia Y Q, Yang K N, et al. Melatonin overcomes MCR-mediated colistin resistance in gram-negative pathogens[J]. *Theranostics*, 2020, 10(23): 10697–10711.
- [30] Thomas P W, Spicer T, Cammarata M, et al. An altered zinc-binding site confers resistance to a covalent inactivator of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) discovered by high-throughput screening[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(11): 3138–3146.
- [31] Chiou J C, Wan S B, Chan K F, et al. Ebselen as a potent covalent inhibitor of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) [J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(46): 9543–9546.
- [32] Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, et al. S-Allylmercaptogluthathione; the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1499(1/2): 144–153.