

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2015.10.2015042001

刘灿,葛鸿铭,龙茜,等.磺胺与群感抑制剂对大肠杆菌的联合毒性机制初探[J].环境化学,2015,34(10):1854-1859
LIU Can, GE Hongming, LONG Xi, et al. A preliminary investigation on the mechanism of binary mixture toxicity containing sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Escherichia coli*[J].Environmental Chemistry, 2015, 34(10): 1854-1859

磺胺与群感抑制剂对大肠杆菌的联合毒性机制初探*

刘 灿^{1, 2} 葛鸿铭² 龙 茜² 安情情^{1, 2} 林志芬² 印春生^{1 **}

(1. 上海海洋大学海洋学院, 上海, 201306;
2. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 同济大学环境科学与工程学院, 上海, 200092)

摘 要 以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)为模式生物,磺胺及3种群体感应抑制剂(QSI)为研究对象,测定其单一毒性和联合毒性,采用分子对接技术初步探索了磺胺和QSI对*E. coli*的单一及联合毒性效应机制.结果显示,其联合毒性效应多表现为拮抗,推断可能是由于磺胺促进*E. coli*的SdiA蛋白的表达,后者与QSI结合,减少其生物有效剂量,导致拮抗效应.该研究为抗生素联用及抗生素的环境联合生态风险评价提供一定的理论依据和技术支持.

关键词 *E. coli*, 群体感应抑制剂(QSI), 磺胺类抗生素, 联合毒性.

A preliminary investigation on the mechanism of binary mixture toxicity containing sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Escherichia coli*

LIU Can^{1, 2} GE Hongming² LONG Xi² AN Qingqing^{1, 2} LIN Zhifen² YIN Chunsheng^{1 **}

(1. College of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai, 200092, China)

Abstract: Sulfonamides and three quorum sensing inhibitors (QSIs) were chosen to study the single and mixture toxicities on *E. coli*. The single and mixture toxicities of sulfonamides and QSIs were determined using *E. coli* as a mode organism, and the mechanism of the joint effects between sulfonamides and QSIs was explored with the method of Molecular Docking. The results showed that the joint effects were mostly antagonistic. This is probably because sulfonamides could promote the expression of SdiA, with which QSIs were assumed to bind, leading to the decrease of QSIs consequently.

Keywords: *E. coli*, QSI, sulfonamide, joint effect.

据统计,2009年全球抗生素产量达到21万吨,其中70%以上来源于我国^[1].抗生素滥用带来的环境问题日益突出并受到越来越多的关注.国内已有许多关于环境介质检出抗生素残留物的报道,如中国江苏等地区的污水处理厂,二级处理后的出水检测到磺胺类抗生素(磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶)浓度在0.01—170 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2].残留的抗生素不仅直接影响生态系统,而且由于滥用导致的细菌抗药性问题更为传统抗生素使用敲响了警钟^[2-5].2006年Pruden等^[6]首次将抗生素抗性基因(ARGs)作为一种环境污染物提出,目前ARGs已成为一种公认的新型环境污染物.为解决上述问题,研究人员尝试寻找新型抗生素,其中对于干扰群体感应(Quorum-sensing, QS)通路的新型抗生素——群体感应抑制剂(Quorum-

2015年4月20日收稿.

* 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室自主研究项目(PCRRY11003);国家自然科学基金(201177092, 21377096);中央高校基本科研业务费专项资金(0400219181)资助.

** 通讯联系人, Tel: 021-61900333; E-mail: csyin@shou.edu.com

sensing inhibitor, QSI) 的研究最为突出.有研究者^[7]指出 QSI 与传统抗生素联合用药会增加后者对细菌的敏感性,在一定程度上能减少传统抗生素的使用量.如今,全球已有多家研究机构及生物制药公司对 QSI 进行研究和开发,可以预测在不远的将来 QSI 与传统抗生素会在环境中并存,因此对 QSI 及抗生素的联合效应及机制初探具有重要的意义.

目前已有对传统抗生素与 QSI 联合用药研究的相关报道,如对小鼠肺部模型进行铜绿假单胞菌感染后,将大蒜中提取的 QSI 与托普霉素(Tobramycin)联合作用于细菌后,其对后者的敏感性增强^[7].安情情等^[8]分析了磺胺类抗生素与 3 类 QSI 对发光菌急性毒性的联合作用效应,发现呋喃酮类化合物与磺胺类抗生素的二元等毒性比下的联合效应表现为协同与加和,吡咯酮类、吡咯类化合物与磺胺类抗生素的二元等毒性比下的联合效应分别表现为加和与拮抗.然而,有关磺胺类抗生素及 QSI 的研究大多还停留在单一毒性和急性毒性水平^[9],而环境中的污染物组成极为复杂且残留时间长,慢性联合作用方式及机制与单一急性有着较大的区别^[10],Ahlers 等^[11]认为化合物作用方式的不同会使其急性和慢性毒性效应发生变化.磺胺作为最为常见的传统抗生素,对其抑菌机制的研究已较为完善,磺胺类抗生素和对氨基苯甲酸(PABA)的结构相似,会竞争结合二氢叶酸合成酶(DHPS)^[12],阻碍细菌生长所必需的二氢叶酸的合成.本课题组前期研究^[13]发现低浓度磺胺能促进发光菌 LuxR 蛋白的表达,而 *E. coli* 同样具有 LuxR 家族蛋白——SdiA^[14],推测磺胺同样能促进 *E. coli* 的 SdiA 表达.而 QSI 作为细菌信号分子的类似物,同样能够诱导受体 LuxR 家族蛋白,干扰 QS 系统,以达到抑菌的作用.本文主要关注磺胺与 QSI 对 *E. coli* 的单一及联合毒性.

近年来分子对接在毒性机制研究上已发展为一种较为成功的技术手段^[15].在前期的研究中本课题组使用分子对接分析了发光菌在磺胺和增效剂联合作用下的毒性机制^[8],通过已知结构的配体和受体,运用化学计量学方法计算模拟了分子间的作用力,为机制分析提供了参考依据.

本文以 *Escherichia coli* 为受试生物,选取 QSI 和磺胺类抗生素为研究对象,通过单一和联合毒性试验,运用分子对接技术,探讨 QSI 及磺胺联合作用的慢性毒性及其生物效应机制,旨在为将来 QSI 及传统抗生素联合用药后而导致的混合污染物的环境生态风险评价提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

实验试剂均购自 Sigma-aldrich 化学制品有限公司(st. louis, MO, USA),所用试剂 3 种磺胺和 4 种 QSIs 均为分析纯($\geq 95\%$)具体信息见表 1.

实验用仪器及软件:高压蒸汽灭菌器、精密电子天平(BT25S,德国 sartorius 公司)、电子 pH 计(PH510,美国 QAKTON 公司)、洁净工作台、生化培养箱(ZHP-Y2102F,上海德洋意邦仪器有限公司)、恒温培养振荡器、超声波清洗器、电热恒温鼓风干燥箱、Discovery Studio(版本 3.1,美国 Accelry 公司)、GaussView(版本 4.1,美国 Semichem 公司)、Gaussian09(版本 8.0,美国 Gaussian 公司)、全波长酶标仪(Multiskan GO1510,美国 Thermo Fisher)等.

1.2 毒性测定及表征方法

1.2.1 *E. coli* 的培养及毒性试验

E. coli K-12MG1655 购自普如汀生物技术有限公司.配制培养基参照菌种供应商提供的配方.

菌液配制:取适量的第三代传代斜面菌种接种到 5 mL 液体培养基,在 37 °C 恒温条件下培养至对数生长期得到摇瓶菌液,然后将菌液稀释 10^5 倍待用.

1.2.2 毒性数据的表征

化合物使用适量的二甲基亚砜(DMSO)助溶后,用 1% NaCl 定容.加入系列浓度梯度的化合物至 96 孔板中,每个浓度设置 3 个平行每板 18 个空白对照,37 °C 下培养 12 h,测定 OD 值,以化合物浓度的负对数为横坐标,抑制率($\ln\%$,式(1))为纵坐标,绘制剂量-效应曲线,50%抑制率对应的化合物浓度即为 EC_{50} .根据单一化合物的 EC_{50} ,配制 A 和 B 化合物等毒性比的混合溶液,按照单一毒性试验方法测定混合溶液的毒性,绘制剂量-效应曲线,最后得到混合溶液的 EC_{50} .磺胺以及 QSI 对 *E. coli* 的毒性测定用

OD 值表征,其表述采用 $\lg(1/EC_{50})$,慢性联合毒性采用 TU 指标来表述.相关计算公式如下:

$$\ln(\%) = (1 - OD / OD_{\text{control}}) \times 100\%$$

$$TU = C_A / EC_{50A} + C_B / EC_{50B}$$

式中,OD 为细菌染毒 12 h 后的测量值,OD_{control} 为空白对照值;*C_A* 和 *C_B* 是混合体系半数抑制效应时单一化合物(A、B)在混合体系中的摩尔浓度(mol·L⁻¹);EC_{50A} 和 EC_{50B} 分别是化合物单一污染时的半数效应浓度.实验采用 Broderius^[16] 的联合毒性判别标准,当 TU<0.8 认为两组分间存在协同效应;0.8<TU<1.2 认为两组分间存在加和效应;TU>1.2 认为两组分间存在拮抗效应.

表 1 实验用化合物理化参数及毒性数据

Table 1 Quantum-chemical parameters and toxicity results of reagents used in the experiment						
类别	名称及简称	结构式	CAS	lg <i>K</i> _{OW}	lg(1/ <i>EC</i> ₅₀)	<i>E</i> _{binding} / (kcal·mol ⁻¹)
磺胺	Sulfaquinoxalin, SQ		59-40-5	1.68	6.35	-45.54
	Sulfamethazine, SMZ		57-68-1	0.76	5.74	-36.92
	Sulfapyridine, SPY		144-83-2	0.53	5.55	-36.89
吡咯	<i>L</i> -(+)-Prolinol, L-P		23356-96-9	-0.35	1.69	-20.50
吡咯酮	2-Pyrrolidinone, 2-P		616-45-5	-0.32	1.58	-17.82
呋喃酮	3-Methyl-2(5H)-Furanone, 3-MF		22122-36-7	0.03	1.49	-17.56
	2(5H)-Furanone, 2(5H)-F		497-23-4	-0.60	1.45	-15.04

1.2.3 分子对接

蛋白选择:从 PDB 数据库(www.pdb.org)下载两类抗生素对 *E.coli* 作用蛋白三级结构,磺胺作用蛋白 DHPs 为 1AJ0(PDB ID)、QSI 作用蛋白 SdiA 为 4LFU(PDB ID).分子对接:分子对接使用 Accelrys 公司的 Discovery Studio(V3.1)内置 CDOCKER.采用 CDOCKER interaction energy(*E*_{binding}, kcal·mol⁻¹)作为评价参数^[17],选取最大负值为最稳定对接构象,从而分析化合物与蛋白对接能力及结合构象.

2 结果与讨论

2.1 磺胺及 QSI 的单一毒性

选择磺胺及 QSI 对 *E.coli* 进行 12 h 毒性试验,结果如表 1 所示.由表 1 可知,不同磺胺及 QSI 的毒性具有一定的差异性,磺胺的毒性大小为:SQ>SMZ>SPY;QSI 的毒性大小为:L-P>2-P>3-MF>2(5H)-F.通过分子对接,分别得到磺胺与 DHPs、QSI 与 SdiA 的对接图,如图 1 所示.

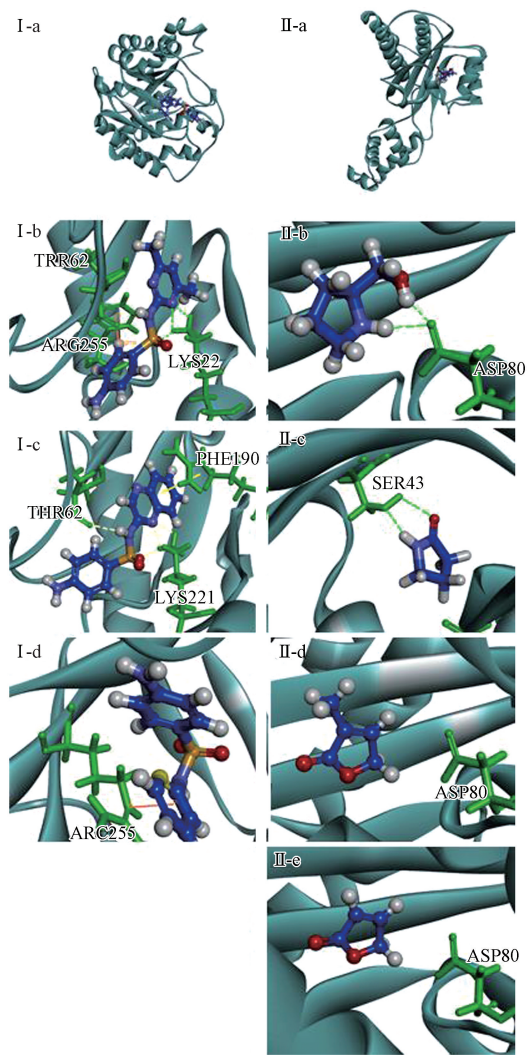


图 1 分子对接构象图

虚线表示与氨基酸相连的氢键,实线表示 π 键; I -a 为磺胺与 DHPs 对接总图, I -b 为 SQ 与 DHPs 对接图, I -c 为 SMZ 与 DHPs 对接图, I -d 为 SPY 与 DHPs 对接图; II -a 为 QSI 与 SdiA 对接图, II -b 为 L-P 与 SdiA 对接图, II -c 为 2-P 与 SdiA 对接图, II -d 为 3-MF 与 SdiA 对接图, II -e 为 2(5H)-F 与 SdiA 对接图

Fig.1 Conformation of molecular docking

对于磺胺而言,SQ 的苯磺酰基和喹喔啉基与 Lys 主链各形成一个氢键,喹喔啉基与 Arg 形成一个 σ - π 键,苯磺酰基相连的氮与 Thr 侧链形成一个氢键;SMZ 苯磺酰氨基与 Lys 主链以及 Thr 侧链各形成一个氢键,与 Phe 形成了一个 π - π 键,它的嘧啶基与 Lys 主链形成一个氢键;而 SPY 仅磺胺基与 Arg 形成一个 π^+ 键,毒性也为最小.观察蛋白与分子对接构象,可知毒性较大的 SQ 与 SMZ 均形成两个氢键,但 SQ 的 σ - π 比 SMZ 的 π - π 键能更强,所以 SQ 毒性更大;而毒性最小的 SPY 仅形成一个 π 键.磺胺的 E_{binding} (表 1) 比较也发现(E_{binding} , SQ<SMZ<SPY), E_{binding} 越小,结合越稳定,毒性也越大;同时,磺胺的 $\lg K_{\text{ow}}$ (SQ>SMZ>SPY,表 1) 越大也表现为毒性越大.

对于 QSI 而言,本文选择呋喃酮,吡咯及吡咯酮 3 类 QSI 为研究对象(表 1),毒性大小为吡咯>吡咯酮>呋喃酮,通过高斯计算 QSI 的给氢能力(H^+) 大小为 L-P>2-P>3-MF>2(5H)-F(0.36,0.32,0.18、0.19),吡咯给氢能力强于吡咯酮,即吡咯比吡咯酮的活性大,相应的毒性也大于吡咯酮.虽然吡咯酮与呋喃酮结构相似,但是吡咯酮的氮戊环比呋喃酮的氧戊环要活跃,因此吡咯酮毒性大于呋喃酮.相应的分子对接结果分析,也同样说明上述毒性结果,吡咯 2-P 含氮杂环及羰基与 Ser 形成两个主链氢键;吡咯 L-P 含氮杂环及羟基分别与 Asp 也形成了两个主链氢键;而毒性较小的吡咯酮 3-MF 和呋喃酮 2(5H)-F 并未与活性氨基酸成键. E_{binding} 大小:L-P<2-P<3-MF<2(5H)-F(表 1), E_{binding} 越小,QSI 与 SdiA

蛋白结合越稳定,毒性也越大.

2.2 磺胺及 QSI 的联合毒性

磺胺类化合物及 QSI 对 *E.coli* 的联合毒性结果如表 2 所示.

表 2 磺胺和 QSI 联合毒性数据
Table 2 The joint toxicity of sulfonamides and QSIs

磺胺	群体感应抑制剂	TU	联合效应
SQ	L-P	1.78	拮抗
SQ	2-P	1.14	相加
SQ	3-MF	1.28	拮抗
SQ	2(5)-F	1.34	拮抗
SMZ	L-P	0.99	相加
SMZ	2-P	1.24	拮抗
SMZ	3-MF	1.17	相加
SMZ	2(5)-F	1.14	相加
SPY	L-P	1.38	拮抗
SPY	2-P	1.02	相加
SPY	3-MF	1.39	拮抗
SPY	2(5)-F	1.24	拮抗

磺胺的抑菌能力表现在与 PABA 竞争结合 DHPs,阻碍二氢叶酸的合成,通过干扰细菌的叶酸代谢而抑制细菌的生长繁殖.但是本课题组的前期研究发现磺胺对发光菌的光值表达具有一定的 Hormesis (毒物兴奋效应),即低浓度磺胺能促进发光菌 LuxR 蛋白的表达^[13].由于 *E.coli* 具有 LuxR 家族蛋白 SdiA,所以推测磺胺同样能促进 *E.coli* 的 SdiA 表达.磺胺与 QSI 的共同作用下,QSI 与 AHL 竞争结合 SdiA,而磺胺促进的 SdiA 就需要与较多的 QSI 进行结合,从而消耗大量的 QSI,在联合效应上表现出拮抗作用,具体过程如图 2 所示.

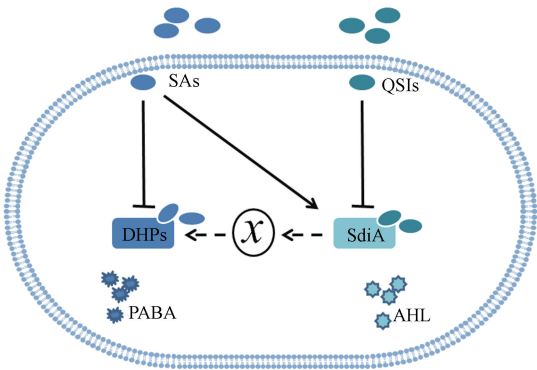


图 2 磺胺和 QSI 联合作用机制假设图
箭头表示促进;实线表示抑制

Fig.2 Possible mechanism for the joint toxicity between sulfanamide and QSIs

同时发现磺胺与 QSI 联合作用出现少量的相加效应(SQ 和 2-P;SMZ 和 L-P、3-MF、2(5)-F;SPY 和 2-P),其中 SMZ 参与的二元混合几乎都表现为相加,虽然 SMZ 与 2-P 的混合表现出为拮抗,但是只是轻微拮抗(TU,1.24),所以 SMZ 与上述 QSI 混合较易出现相加作用.根据 SMZ 化学结构(表 1)发现连接磺胺基的五元含氮杂环存在间位疏水甲基.这一独特的结构可能是其独特毒性效应的关键因素,有报道指出^[18]DHPs 与磺胺作用的关键在于氨基酸残基 II e272 和 Asp221,其决定因素为疏水作用.推测上述磺胺与 QSI 联合作用时,磺胺对靶蛋白 DHPs 的作用大于其对 SdiA 的刺激作用,掩蔽了磺胺的刺激作用,即表现为两类抗生素各自作用相应靶蛋白,最终表现为相加作用,其具体作用机制需要进一步的深入研究.

3 结论

(1) 本文测定了磺胺类抗生素与 QSI 的单一毒性,发现单一毒性与化合物结构、成键情况及结合能力 E_{binding} 有关,结合能力越强,毒性越大。

(2) 联合毒性方面,磺胺和 QSI 联合作用于 *E. coli* 时,磺胺会促进 SdiA 蛋白表达,从而消耗大量 QSI,导致联合效应较多表现为拮抗。

(3) 磺胺与 QSI 联合作用出现少量的相加效应,这可能是因为磺胺与 QSI 联合作用时,磺胺对靶蛋白 DHPs 的作用大于其对 SdiA 的刺激作用,此时磺胺主要表现对 DHPs 的作用,即两类抗生素各自作用相应靶蛋白,从而表现为相加作用。

参 考 文 献

- [1] 韩洪军, 陈凌跃, 马文成, 等. 我国微生物制药菌渣管理现状分析[J]. 环境工程, 2015, 33(1): 120-122
- [2] Xu W H, Zhang G, Li X D, et al. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China[J]. Water Research, 2007, 41(19): 4526-4534
- [3] Thiele-Bruhn S, Beck I. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass [J]. Chemosphere, 2005, 59(4): 457-465
- [4] Bauer W D, Robinson J B. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms[J]. Curr Opin Biotech, 2002, 13(3): 234-237
- [5] Karunasagar I, Pai R, Malathi G R, Indrani Karunasagar, Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection[J], Aquaculture, 1994, 128(3): 203-209
- [6] Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado [J]. Environmental Science and Technology, 2006, 40: 7445-7450
- [7] Bjarnsholt T, Jensen P, Rasmussen T B, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Microbiology, 2005, 151(12): 3873-3880
- [8] 安情情, 姚志峰, 顾宇菲, 等. 磺胺类抗生素与群体感应抑制剂对发光菌的联合毒性及其机制初探[J]. 环境化学, 2014, 33(12): 2068-2075
- [9] Calabrese E J, Linda A B. Toxicology rethinks its central belief- Hormesis demands a reappraisal of the way risks are assessed[J]. Nature, 2003, 421(9): 691-692
- [10] Zou X M, Lin Z F, Deng Z Q, et al. The joint effects of sulfonamides and their potentiator on *Photobacterium phosphoreum*: Differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms[J]. Chemosphere, 2012, 86(1): 30-35
- [11] Ahlers J, Riedhammer C, Vogliano M, et al. Acute to chronic ratios in aquatic toxicity—variation across trophic levels and relationship with chemical structure[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(11): 2937-2945
- [12] Hammoudeh D I, Zhao Y, White S W, et al. Replacing sulfa drugs with novel DHPS inhibitors[J]. Future Medicinal Chemistry, 2013, 5(11): 1331-1340
- [13] Deng Z Q, Lin Z F, Zou X M, et al. Model of hormesis and its toxicity mechanism based on quorum sensing: a case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum*[J]. Environmental Science and Technology, 2012, 46(14): 7746-7754
- [14] Dyszel J L, Soares J A, Swearingen M C, et al. *E. coli* K-12 and EHEC genes regulated by SdiA[J]. Plos One, 2010, 5(1): 8946-8960
- [15] De Wilde R, Swevers L, Soin T, et al. Cloning and functional analysis of the ecdysteroid receptor complex in the opossum shrimp *Neomysis integer* (Leach, 1814)[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 130: 31-40
- [16] Broderius S J, Kahl M D, Hoglund M D. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995, 14(9): 1591-1605
- [17] Wu G, Robertson D H, Brooks C L, et al. Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm[J]. Journal of Computational Chemistry, 2003, 24(13): 1549-1562
- [18] 梁晓. 基于二氢叶酸合成酶的磺胺类药物多残留快速检测分析研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2014