

• 药理与临床 •

黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌的转录组影响分析

朱健铭^{1*}, 翁幸璧², 姜如金¹, 吴晋兰³, 贺子龙⁴, 姚娜¹

1. 杭州市余杭区中医院, 浙江 杭州 311106

2. 宁波市第一医院, 浙江 宁波 315010

3. 杭州市余杭区第五人民医院, 浙江 杭州 311100

4. 中国科学院北京基因组研究所 基因组科学与信息重点实验室, 北京 100101

摘要: 目的 探讨黄芩水煎剂抑制尿道致病性大肠埃希菌的分子机制。方法 采用 RNA-seq 技术分析黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌临床分离株 (NB8) 转录组的影响。设黄芩组和阴性对照组 2 个组, 黄芩组用 10 倍 MIC 浓度的黄芩水煎剂 (62.5 mg/mL) 作用于尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株 30 min, 对照组给等量生理盐水, 提取细菌总 RNA, 去除 rRNA, 反转录合成 cDNA, 在 HiSeq2000 测序平台上进行转录组测序, 利用 BIGpre、Tophat、Cufflinks 等生物信息学工具软件进行转录组数据处理; 并将得到的表达谱作差异表达、GO 和 COG 功能富集以及 KEGG 代谢通路分析。结果 黄芩组和对照组之间差异表达基因共有 1 665 个, 其中上调基因为 1 169 个, 下调基因为 496 个; 在黄芩水煎剂的作用下, 尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株糖酵解、三羧酸循环和脂肪酸生物合成等关键代谢途径的编码基因以及核糖体蛋白的编码基因显著下调, 而细菌趋化性和鞭毛组装途径以及 ABC 转运蛋白通路相关基因表达显著上调。结论 阐明了黄芩水煎剂抑制尿道致病性大肠埃希菌的分子机制, 黄芩作用的靶位是糖酵解、三羧酸循环、脂肪酸的生物合成途径和蛋白质的翻译; 此外, 细菌趋化性、鞭毛组装途径和 ABC 转运蛋白在细菌对黄芩的应激反应中也具有重要作用。

关键词: 黄芩; 尿道致病性大肠埃希菌; 转录组; RNA-seq; 差异表达基因; 分子机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)09-1791-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.015

Effect analysis on water decoction of *Scutellaria baicalensis* to transcription of uropathogenic *Escherichia coli*ZHU Jian-ming¹, WENG Xing-bei², JIANG Ru-jin¹, WU Jin-lan³, HE Zi-long⁴, YAO Na¹

1. Hangzhou Yuhang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311106, China

2. Ningbo First Hospital, Ningbo 315010, China

3. Hangzhou Yuhang Fifth People's Hospital, Hangzhou 311100, China

4. CAS Key Laboratory of Genome Sciences and Information, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis* to uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). **Methods** RNA-seq was used to analyze transcriptome of UPEC NB8 effected by water decoction of *S. baicalensis*. *S. baicalensis* group and negative control group were set up. In *S. baicalensis* group, UPEC NB8 was disposed by water decoction of 10 times of MIC of *S. baicalensis* (62.5 mg/mL) for 30 min. While in negative control group, UPEC NB8 was disposed by same amount of normal saline. Then, total RNA of UPEC NB8 was extracted, while rRNA was removed, cDNA was reverse transcriptional synthesized. Transcriptome sequencing was sequenced on HiSeq2000, transcriptome data were analyzed by BIGpre, Tophat, and Cufflinks. Expression profile was analyzed for differential expression, GO, COG functional enrichment analysis, and KEGG metabolic pathway analysis. **Results** A total of 1665 differentially expressed genes existed between *S. baicalensis* group and negative control group. Among them, 1169 genes were up-regulated genes, while 496 genes were down-regulated genes. Under the

收稿日期: 2016-11-26

基金项目: 杭州市科技计划引导项目 (2012028); 杭州市卫生科技计划项目 (2012B034); 杭州市余杭区重大科技项目 (2012006)

*通信作者 朱健铭 (1962—), 副主任技师, 主要从事药用植物资源研究与开发。Tel: (0571)89020552 E-mail: zhujianming001@126.com

effect of water decoction of *S. baicalensis*, genes of NB8 down-regulated in glycolysis, Krebs cycle, biosynthesis of fatty acids, and ribosomal proteins, while genes of NB8 up-regulated chemotaxis and assembly path of flagella, and transportation protein ABC pathway. **Conclusion** The molecular mechanism of the inhibitory effect of *S. baicalensis* to UPEC is explained. Targets of *S. baicalensis* to UPEC are glycolysis, Krebs cycle, biosynthesis of fatty acids, and translation of proteins. Besides, chemotaxis, the assembly path of flagella, and transportation protein ABC also play a key role in alarm reaction of *S. baicalensis*.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; uropathogenic *Escherichia coli*; transcriptome; RNA-seq; differential expression gene; molecular mechanism

尿路感染 (urinary tract infections, UTI) 是仅次于呼吸道感染的第二大感染性疾病^[1]。全球每年有 1.30 亿~1.75 亿人患 UTI^[2], 80% 以上的 UTI 由尿道致病性大肠埃希菌所致^[3]。临床上, 常选用氟喹诺酮类、2~3 代头孢菌素类、碳青霉烯类等抗菌药物治疗^[4]。近年来, 随着广谱抗菌药物的大量使用, 引起尿路感染的大肠埃希菌耐药现象日趋严重, 产超广谱 β -内酰胺酶以及多重耐药菌株比例不断增加^[5], 给临床抗感染治疗带来困难。因此, 开发更有效的治疗 UTI 的药物已是当务之急。中医药防治感染性疾病有着悠久的历史, 具有种类多、不易产生耐药性、广谱抗菌、毒副作用小、价廉易得等优点。许多中药具有很好的抗耐药大肠埃希菌作用^[6]。最近研究表明黄芩对大肠埃希菌包括产超广谱 β -内酰胺酶菌株以及多重耐药菌株均具有较强的抑菌作用^[6-7], 但其抑菌机制尚未阐明。

转录组研究可以从整体水平上反映细胞中基因表达情况及其调控规律。新一代测序技术的快速发展催生了 RNA-seq (high-throughput RNA sequencing) 技术的出现, RNA-seq 技术可以更好地从基因水平阐明中药的作用机制。近年来, 国内外学者已运用 RNA-seq 技术对丹参、红花、胡黄连、首乌等中药的转录组进行测序, 获得了基因表达谱, 发现了其功能基因^[8-11], 但中药对细菌在转录水平上的影响国内外鲜有报道。本实验采用 RNA-seq 技术和生物信息学分析工具, 研究黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌的转录组影响, 寻找黄芩对其的作用靶位, 以期阐明黄芩抑制尿道致病性大肠埃希菌的分子机制, 为今后临床中药应用提供理论依据。

1 材料

1.1 菌株来源

尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株于 2012 年 4 月分离自宁波市第一医院干部病房一例 83 岁糖尿病肾病合并尿路感染女性患者的尿液样本。抗菌药物敏感性试验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、金

黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC35218, 购自杭州滨和微生物试剂有限公司。

1.2 药品与试剂

黄芩 (北京同仁堂药店, 批号 131111); 血琼脂平板、菌种鉴定卡、M-H 琼脂、M-H 肉汤、E-test 条 (法国生物梅里埃公司); Cica-Beta Test 试剂盒为日本 Kanto Chemical 公司产品; 16 S rDNA 及 *gyrA* 基因检测试剂盒和 DNA Marker (无锡市克隆遗传技术研究所); 琼脂糖、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、溴化乙锭 (上海生工生物工程技术有限公司); PureLink RNA Mini Kit、RibioMinus Bacteria Kit (美国 Invitrogen 公司); Truseq RNA Sample Prep Kit-v2 (美国 Illumina 公司)。

1.3 仪器

VITEK2-Compact 全自动化微生物鉴定仪 (法国生物梅里埃公司); S1000 PCR 扩增仪、电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon 1600 凝胶成像系统 (上海天能公司); ABI 3730 型毛细管全自动测序仪 (美国 Applied Biosystems 公司); SHA-103B 台式恒温摇床、HR2200R 高速冷冻离心机、723PC 可见分光光度计 (上海精密仪器仪表有限公司); HiSeq2000 测序平台 (美国 Illumina 公司)。

2 方法

2.1 细菌鉴定和抗菌药物敏感性试验

细菌的分离鉴定参照《全国临床检验操作规程》(第 4 版)进行, 并经法国生物梅里埃公司 VITEK 2-Compact 全自动微生物鉴定仪鉴定和 16 S rDNA 及 *gyrA* 基因测序进一步确认为大肠埃希菌。通过全基因组测序发现该菌株具有与尿路感染相关的毒力因子 (黏附素、P 菌毛和 I 型菌毛)、细胞毒性物质 (溶血素 hlyD、蛋白酶、抗原 43、SHI-2 毒力岛以及铁载体等), 系典型的尿道致病性大肠埃希菌 (Genebank ID: LBIS00000000.1)。药物敏感性试验采用 E-test 法测量 20 种抗菌药物的最低抑菌浓度 (MIC), 并根据 2015 年美国临床和实验室标准

化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100-S22 文件解释标准进行抗菌药物敏感性判断^[12]。

2.2 黄芩水煎剂的制备

称取黄芩 100 g, 以 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min 后, 在砂锅中强火加热至沸, 再以文火煎煮 30 min, 趁热滤过; 滤渣再加适量蒸馏水同法煎煮 30 min, 煎煮 4 次, 合并滤液, 加热浓缩到 100 mL, 高压灭菌 (0.1~0.11 MPa, 121 °C、15 min), 即成 1.0 g/mL 黄芩水煎剂 (含黄芩苷 42.31 mg/mL、黄芩素 0.38 mg/mL), 置 4 °C 冰箱备用。

2.3 黄芩水煎剂 MIC 测定

黄芩对尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株的 MIC 采用琼脂稀释法测定。用 1.0 g/mL 黄芩水煎剂配制分别含生药质量浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 mg/mL 黄芩水煎剂的 M-H 琼脂平皿, 同时设不加黄芩水煎剂的 M-H 琼脂平皿为生长对照。将尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株的新鲜培养物 (菌落) 用生理盐水稀释制成菌悬液, 相当于 0.5 麦氏比浊管浊度, 再用生理盐水稀释 10 倍 (1×10^7 cfu/mL), 15 min 内以多点接种仪接种, 最终接种量为每点 1×10^4 cfu, 菌液接种于含药平皿和对照平皿上, 放置室温让接种液被充分吸干后, 置 35 °C 培养箱中 16~20 h 读取结果。进行 3 次重复实验。

2.4 尿道致病性大肠埃希菌生长曲线测定

根据黄芩水煎剂 MIC 实验结果, 取 4 只无菌锥形瓶, 分别取一定量的 1.0 g/mL 黄芩水煎剂用 M-H 肉汤加至 100 mL, 制成含黄芩水煎剂 0.5×MIC、MIC、2×MIC 的 3 瓶含不同质量浓度黄芩水煎剂的 M-H 肉汤培养基, 另用 1 瓶不加任何药物仅用 M-H 肉汤做空白对照。接种尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株对数期菌液, 置 35 °C 摇床 (200 r/min) 后每隔 1 h 取样于 600 nm 下测定吸光度 (A_{600}), 并绘制尿道致病性大肠埃希菌的生长曲线。

2.5 尿道致病性大肠埃希菌转录组测序和结果分析

2.5.1 实验处理 在培养好的尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株培养皿上, 黄芩水煎剂 (黄芩) 组滴加 10×MIC 黄芩水煎剂 3 mL, 阴性对照 (对照) 组加等量生理盐水, 作用 30 min。用刮棒刮下菌体, 收集菌液, 离心 5 min ($12\ 588 \times g$), 弃上清。每组各设 2 个平行样品, 进行 2 次重复实验。采用较高作用浓度的目的是为了最大限度观察转录组学改

变, 而选择较短的作用时间是为避免非药物因素的影响^[13]。

2.5.2 尿道致病性大肠埃希菌 RNA 提取 使用 PureLink RNA Mini Kit 提取大肠埃希菌总 RNA, RibioMinus Bacteria Kit 去除总 RNA 中的 rRNA。

2.5.3 转录组测序 使用 Truseq RNA Sample Prep Kit-v2 进行片段化及 cDNA 合成, 末端补平、3'端加碱基 A、加接头、PCR 扩增, 然后在 HiSeq2000 测序平台上进行转录组测序。

2.5.4 基因表达及差异表达基因分析 将测序得到的转录组原始数据利用软件 BIGpre^[14]进行预处理去除接头和低质量序列 (reads)。剩余的 reads 以尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株 (GenebankID: LBIS01000000.1) 作为参考基因组, 利用短序列比对软件 (Tophat)^[15]进行序列比对并拼接尿道致病性大肠埃希菌 NB8, 只有唯一匹配的 reads 能使用。再利用比对结果文件 (bam 格式) 进行转录本构建, 采用 Cufflinks 程序计算表达量^[16], 表达量以 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) 表示, 每个基因表达的阈值为 FPKM ≥ 0.1 。

2.5.5 功能富集分析 将差异显著的基因提取相应的蛋白质序列进行基因本体论 (GO) 和直系同源体簇 (COG) 功能富集分析。

2.5.6 KEGG 代谢通路分析 将差异显著的基因提取相应的蛋白质序列用 KEGG 在线注释工具 KAAS 做成 FASTA 格式 (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>)^[19], 以“原核生物”为参数, 选择双向最佳匹配 (bi-direction best hit, BBH) 策略进行通路注释。

2.6 统计学处理

采用 DEGseq 软件进行差异表达基因的统计分析^[17-18], 采用 Fisher 确切概率法和拟然比检验。

3 结果

3.1 抗菌药物敏感性实验结果

由药敏实验结果 (表 1) 可见, 尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株除对亚胺培南和美罗培南敏感, 对哌拉西林/他唑巴坦和头孢哌酮/舒巴坦中介外, 对其他 16 种抗菌药物均为耐药, 其 MIC 值均超过了 E-test 条最大检测值, 系多重耐药株。

3.2 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌的抑菌效果

黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株的 MIC 为 6.25 mg/mL。

表 1 尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株对 20 种抗菌药物的药敏实验结果

Table 1 Drug sensitivity test of 20 kinds of antimicrobials to uropathogenic *E. coli* NB8

抗菌药物	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	药敏结果
氨苄西林	≥ 256	R
头孢唑啉	≥ 256	R
头孢曲松	≥ 256	R
头孢他啶	≥ 256	R
头孢替坦	≥ 256	R
头孢吡肟	≥ 256	R
氨基糖	≥ 256	R
亚胺培南	0.25	S
美罗培南	0.064	S
氨苄西林/舒巴坦	≥ 256	R
哌拉西林/他唑巴坦	64	I
头孢哌酮/舒巴坦	32	I
庆大霉素	≥ 256	R
妥布霉素	≥ 256	R
阿米卡星	≥ 256	R
环丙沙星	≥ 32	R
左氧氟沙星	≥ 32	R
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑	≥ 32	R
四环素	≥ 256	R
氯霉素	≥ 256	R

R-耐药 I-中介 S-敏感

R-resistant I-intermediate sensitive S-sensitive

3.3 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株的生长曲线的影响

尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株在黄芩水煎剂的作用下,生长受到明显的抑制。不加药物的空白对照组 2 h 开始有明显的生长,具有迟缓期、对数生长期、稳定期 3 个生长特征。与对照组比较,在 $0.5\times\text{MIC}$ 质量浓度的黄芩水煎剂作用下,尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株 8 h 内无明显生长,进入对数期的时间明显延长;而在 MIC 和 $2\times\text{MIC}$ 质量浓度的黄芩水煎剂作用下,在观察时间内 (24 h) 均无明显生长趋势。结果见图 1。

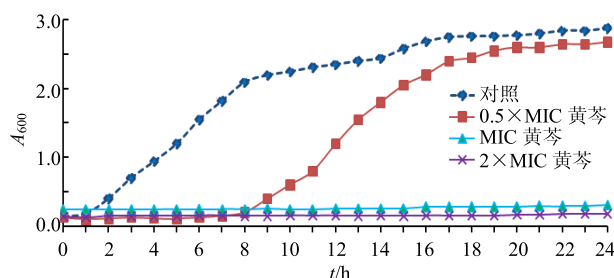


图 1 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株生长曲线的影响

Fig. 1 Effect of water decoction of *S. baicalensis* on growth curves of uropathogenic *E. coli* strain NB8

3.4 黄芩水煎剂处理尿道致病性大肠埃希菌转录组分析的一般特征

通过比较 2 个 mRNA 表达谱来分析尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株对黄芩水煎剂的动态反应。黄芩组和对照组测序产生的 reads, 通过预处理去除接头和低质量的 reads 后, 黄芩组和对照组分别有超过 1 800 万和 1 400 万的 reads 被保留作进一步分析。预处理后的 reads 黄芩组和对照组分别有 90.92% 和 95.61% 拼接到大肠埃希菌 NB8 株基因组注释区 (表 2)。黄芩组和对照组之间共有 1 665 个差异表达基因, 其中上调基因为 1 169 个, 下调基因为 496 个。对差异表达基因进行功能聚类分析发现, 这些基因主要集中在细胞组成模块中的细胞与细胞部件等过程、分子功能模块中的结合与催化以及生物过程模块中的细胞调控与代谢过程中。与对照组比较, 黄芩组结合与催化过程中的基因均明显富集, 运动力相关基因显示出上调, 多细胞生物过程基因均呈现上调, 细胞器组分相关成分下调基因多于上调基因, 见图 2。进一步分析显示上调基因集中在细菌趋化性和鞭毛组装蛋白、ABC 转运蛋白通路、II 型分泌系统, 而核糖体途径、脂肪酸合成、糖酵解和三羧酸循环则明显下调。

表 2 黄芩组和对照组转录组测序数据

Table 2 Transcriptome sequencing data of *S. baicalensis* group and negative control group

组别	原始 reads 数	预处理后 reads 数	定位在基因组上的 reads 数
对照	14 262 488	14 096 166	13 476 710
黄芩	20 149 724	18 709 230	17 010 774

3.5 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌基本代谢途径的转录组影响

3.5.1 糖酵解通路 细菌的能量代谢, 提供了合成菌体成分的原料和能量来源。葡萄糖是最重要的碳水化合物, 糖酵解是氧化葡萄糖分子来获得 ATP 和丙酮酸的途径^[20]。此外, 丙酮酸通过丙酮酸脱氢酶转化为乙酰辅酶 A, 由丙酮酸脱氢酶复合体催化。在黄芩水煎剂的作用下, 尿道致病性大肠埃希菌参与糖酵解的 18 个转录中除 2 个转录上调外, 其他 16 个转录均为下调, 包括限速酶葡萄糖激酶 (ngs2_2337) 和丙酮酸激酶 (ngs2_1571) (表 3 和图 3), 表明糖酵解被黄芩水煎剂强烈抑制。此外, 糖酵解中的重要酶磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase, ngs2_2818) 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (ngs2_1671)

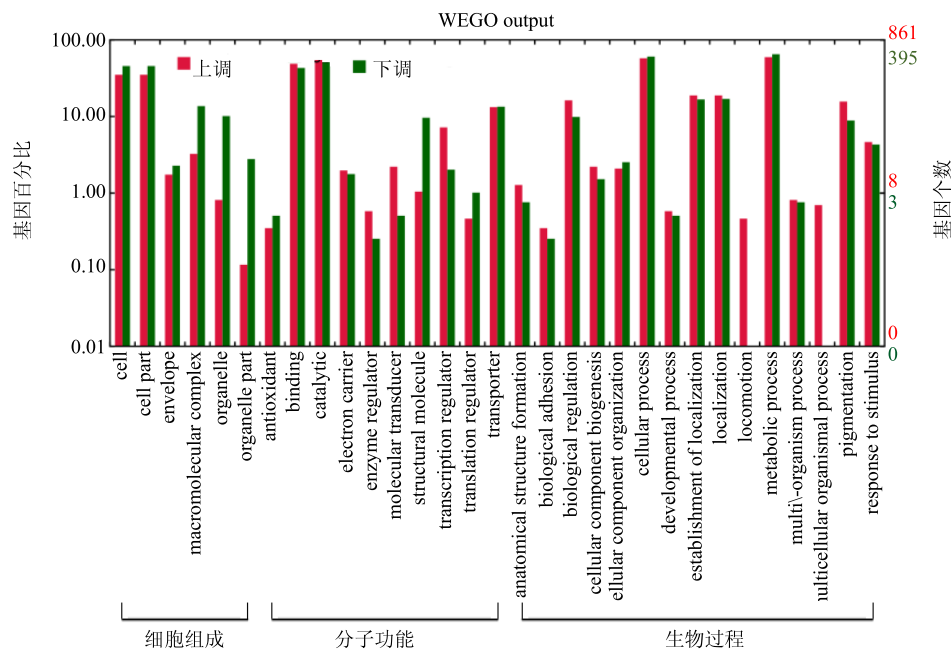


图 2 黄芩组和对尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株转录组差异基因聚类图

Fig. 2 Cluster of differential gene in transcriptome of uropathogenic *E. coli* strain NB8 disposed in water decoction of *S. baicalensis* and control group

表 3 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌糖酵解通路基因表达的影响

Table 3 Effect of water decoction of *S. baicalensis* to gene expression in pathway of glycolysis of uropathogenic *E.coli* NB8

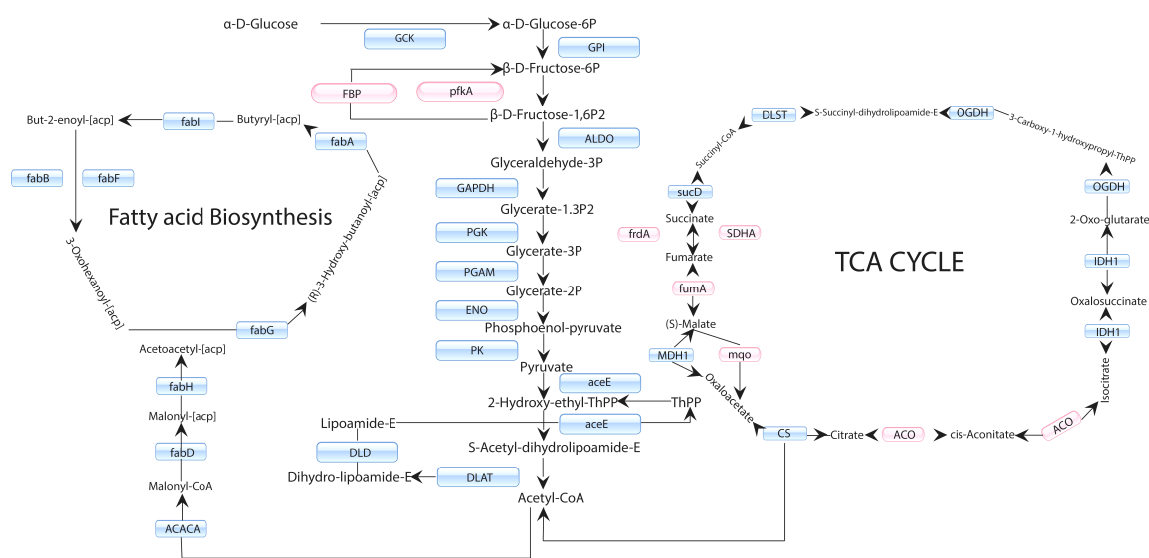
Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change	Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change
ngs2_0127	K00163	丙酮酸脱氢酶 E1 组, aceE	-3.45	ngs2_2361	K02777	葡萄糖转运蛋白亚基 IIA, PTS-Glc-EIIA	-10.09
ngs2_0128	K00627	丙酮酸脱氢酶 E2 组, pdhC	-73.28	ngs2_2663	K01689	烯醇化酶, ENO	-9.56
ngs2_0129	K00382	二氢硫辛酰胺脱氢酶, pdhD	-2.57	ngs2_2795	K01223	6-磷酸-β-葡萄糖苷酶, bglA	-3.03
ngs2_0714	K01834	磷酸甘油酸变位酶, PGAM	-4.96	ngs2_2817	K01624	果糖二磷酸醛缩酶, FBA	-5.42
ngs2_1571	K00873	丙酮酸激酶, PK	-3.24	ngs2_2818	K00927	磷酸甘油酸激酶, PGK	-3.89
ngs2_1671	K00134	3-磷酸甘油醛脱氢酶, GAPDH	-12.97	ngs2_3345	K01610	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶, pckA	-1.93
ngs2_1628	K01222	二乙酰-6-磷酸水解酶, celF	-1.60	ngs2_3897	K01810	葡萄糖-6-磷酸异构酶, GPI	-1.97
ngs2_2041	K01623	果糖二磷酸醛缩酶, ALDO	-1.74	ngs2_1618	K00850	6-磷酸果糖激酶, pfkA	1.19
ngs2_2337	K00845	葡萄糖激酶, glk	-3.32	ngs2_4155	K03841	1,6-二磷酸果糖酶, FBP	1.25

“Fold change”指尿道致病性大肠埃希菌 NB8 株黄芩组与对照组比较,其表达量 (FPKM) 上调/下调的倍数,“+”表示上调,“-”表示下调,下表同
Fold change is the expression (FPKM) time in up-regulation/down-regulation when comparing UPEC NB8 disposed by *S. baicalensis* group with negative control group. “+” means up-regulation, “-” means down-regulation, same as bellow

以及 3 种丙酮酸脱氢酶复合体 (PDC) 的编码基因 (ngs2_0127、ngs2_0128 和 ngs2_0129) 均全部下调 (图 3)。这些结果表明,尿道致病性大肠埃希菌生物功能、生长和繁殖通过糖酵解和丙酮酸脱羧途径中减少 ATP 和 NADH 的再生而受到抑制。

3.5.2 三羧酸循环 三羧酸循环是生物体获取能量的主要方式,乙酰辅酶 A 是三羧酸循环中一种重要的分子,它的主要功能是在三羧酸循环中传递碳原

子,为细菌产能。尿道致病性大肠埃希菌在黄芩水煎剂作用下,参与三羧酸循环的 5 个限速酶,包括二氢硫辛酰胺脱氢酶 (ngs2_0129)、柠檬酸合成酶 (ngs2_0683)、异柠檬酸脱氢酶 (ngs2_0688)、α-酮戊二酸脱氢酶 E1 组 (ngs2_0689)、α-酮戊二酸脱氢酶 E2 组 (ngs2_1066) 均表现为下调;其中二氢硫辛酰胺脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶 E1 组、α-酮戊二酸脱氢酶 E2 组 4 种酶都参与了



粉红色表示上调基因，浅蓝色表示下调基因；箭头的方向表示酶催化的方向
Pink (up-regulated genes), light-blue (down-regulated genes); the direction of arrows represents the direction of enzymatic catalysis

图 3 黄芩水煎剂处理的尿道致病性大肠杆菌 NB8 株的三羧酸循环和脂肪酸生物合成途径的差异表达基因

Fig. 3 Differentially expressed genes of TCA cycle and fatty acid biosynthesis pathways of uropathogenic *E. coli* NB8 disposed by water decoction of *S. baicalensis*

三羧酸循环中产 NADH 的步骤。其次，参与产 NADH 步骤的苹果酸脱氢酶 (ngs2_3174) 也明显下调 (图 3 和表 4)。

3.5.3 脂肪酸生物合成 脂肪酸的生物合成 (II 型) 在大肠埃希菌中已被证明是一个抗菌药物靶标^[21-22]，和真核生物 I 型酶不同。脂肪酸的生物合成基因对大肠埃希菌的生长至关重要^[23]，并能够被真菌产物浅蓝菌素和硫乳霉素 (thiolactomycin) 所抑制^[24]。参与脂肪酸生物合成通路的 12 个基因中黄芩组有 10 个基因表达下调 (图 3 和表 5)，表明尿道致病性大

肠埃希菌在黄芩水煎剂的作用下，脂肪酸生物合成途径被强抑制 (图 3 和表 5)。首先，ngs2_2267 (accD)、ngs2_3191 (accB) 和 ngs2_3192 (accC) 编码乙酰-CoA 羧化酶参与脂肪酸生物合成途径的第一步。accD 基因表达下调，而其他 2 个基因没有下调，表明 accD 可能是黄芩水煎剂的作用靶位之一。其次，3-乙酰-ACP 合成酶催化丙二酰-ACP 第一个缩合步骤和延伸步骤，一直达到 16 到 18 个碳原子的酰基链长度。黄芩组中编码 3-乙酰-ACP 合成酶的 fabH、fabB、fabF 基因表达下调，而且 3-羟基

表 4 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌三羧酸循环通路基因表达的影响

Table 4 Effect of water decoction of *S. baicalensis* to gene expression in pathway of Krebs's cycle of uropathogenic *E. coli* NB8

Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change	Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change
ngs2_0127	K00163	丙酮酸脱氢酶 E1 组, aceE	-1.65	ngs2_3174	K00024	苹果酸脱氢酶, mdh	-2.93
ngs2_0128	K00627	丙酮酸脱氢酶 E2 组, pdhC	-6.49	ngs2_3345	K01610	磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (ATP), pckA	-1.93
ngs2_0129	K00382	二氢硫辛酰脱氢酶, pdhD	-2.57	ngs2_0684	K00241	琥珀酸脱氢酶/延胡索酸还原酶, 细胞色素 b 亚基, sdhC, frdC	3.14
ngs2_0131	K01682	2-甲基异柠檬酸脱水酶, acnB	-1.58	ngs2_0685	K00242	琥珀酸脱氢酶/延胡索酸还原酶, 膜固定亚基, sdhD, frdD	2.89
ngs2_0683	K01647	柠檬酸合成酶, gltA	-2.20	ngs2_0731	K01681	乌头酸水合酶, acnA	1.83
ngs2_0688	K00164	α-酮戊二酸脱氢酶 E1 组, sucA	-1.92	ngs2_1504	K01679	II 类延胡索酸水合酶, fumC	3.21
ngs2_0689	K00658	α-酮戊二酸脱氢酶 E2 组 (二氢硫氨酸), sucB	-1.54	ngs2_2158	K00116	苹果酸脱氢酶, mgo	2.88
ngs2_0690	K01903	琥珀酰辅酶 A β 亚基合成酶, sucC	-1.50	ngs2_4021	K01676	I 类延胡索酸水合酶, fumA, fumB	3.49
ngs2_0691	K01902	琥珀酰辅酶 A α 亚基合成酶, sucD	-1.53				
ngs2_1066	K00031	异柠檬酸脱氢酶, IDH	-2.58				

表 5 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌脂肪酸生物合成通路基因表达的影响

Table 5 Effect of water decoction of *S. baicalensis* to gene expression in pathway of biosynthesis of fatty acids of uropathogenic *E. coli* NB8

Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change	Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change
ngs2_0922	K01716	3-羟基癸酰脂-ACP 脱水酶, fabA	-2.21	ngs2_1293	K00208	烯酰-ACP 还原酶, fabI	-3.45
ngs2_1016	K03621	3-磷酸甘油酰基转移酶, plsX	-2.45	ngs2_2267	K01963	乙酰辅酶 A 羧化酶 β 组, accD	-1.67
ngs2_1017	K00648	3-酰基-ACP 合成酶, fabH	-2.26	ngs2_2275	K00647	3-酰基-ACP 合成酶, fabB	-3.64
ngs2_1018	K00645	丙二酰辅酶 A-ACP 酰基转移酶, fabD	-3.09	ngs2_3191	K02160	乙酰辅酶 A 羧化酶生物素羧基载体蛋白, accB	1.23
ngs2_1019	K00059	3-酮脂酰-ACP 还原酶, fabG	-4.70	ngs2_3192	K01961	乙酰辅酶 A 羧化酶生物素羧化酶亚基, accC	1.59
ngs2_1020	K02078	ACP, acpF	-9.57				
ngs2_1021	K09458	3-酰基-ACP 合成酶, fabF	-4.02				

癸酰脂-脱水酶 (fabA) 和烯酰 ACP 还原酶 (fabI) 也下调。这些结果表明, 以上这些脂肪酸生物合成基因可能是黄芩水煎剂的作用靶位。

3.6 黄芩对尿道致病性大肠埃希菌蛋白质翻译途径的转录组影响

核糖体是所有细胞蛋白质合成的场所, 原核生物核糖体包括一个 30 S 小亚基和一个 50 S 大亚基, 大肠埃希菌核糖体 30 S 小亚基有 21 个蛋白质, 50 S 大亚基有 34 个蛋白质。陈禹先等^[22]证实黄芩通过抑制蛋白质的翻译来杀死并抑制金黄色葡萄球菌, Zhang 等^[23]通过 SDS-PAGE 发现蒲公英抑制功能蛋白表达, 来抑制大肠埃希菌。本研究发现, 尿道致

病性大肠埃希菌在黄芩水煎剂作用下, 编码核糖体蛋白质的 55 个基因中有 54 个表达下调 (图 4 和表 6), 表明黄芩水煎剂抑制了尿道致病性大肠埃希菌的蛋白质翻译。

3.7 黄芩对尿道致病性大肠埃希菌应激反应途径的转录组影响

细菌趋化是一种对化学刺激的反应过程, 由鞭毛的旋转马达驱动。在本研究中, 发现尿道致病性大肠埃希菌黄芩组细菌趋化性和鞭毛组装途径的基因表达均显著上调 (表 7), ABC 转运蛋白通路 109 个相关基因中 97 个基因表达上调 (表 8), 表明这些基因在对黄芩水煎剂的应激反应中发挥重要作用。

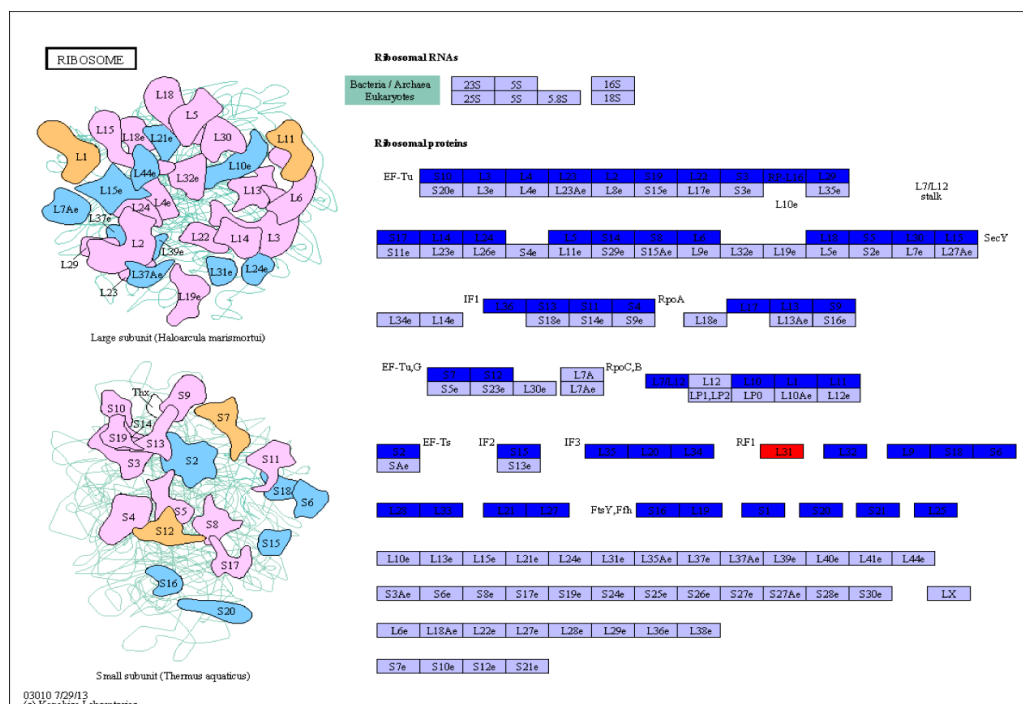


表 6 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌核糖体通路基因表达的影响

Table 6 Effect of water decoction of *S. baicalensis* to gene expression in pathway of ribosome of uropathogenic *E. coli* NB8

Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change	Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change
ngs2_0022	K02968	30 S 核糖体蛋白 S20	-5.86	ngs2_3249	K02931	50 S 核糖体蛋白 L5	-14.73
ngs2_0187	K02967	30 S 核糖体蛋白 S2	-15.51	ngs2_3250	K02895	50 S 核糖体蛋白 L24	-19.46
ngs2_0885	K02945	30 S 核糖体蛋白 S1	-20.56	ngs2_3251	K02874	50 S 核糖体蛋白 L14	-9.05
ngs2_1015	K02911	50 S 核糖体蛋白 L32	-16.43	ngs2_3252	K02961	30 S 核糖体蛋白 S17	-16.51
ngs2_1611	K02887	50 S 核糖体蛋白 L20	-12.27	ngs2_3253	K02904	50 S 核糖体蛋白 L29	-16.43
ngs2_1612	K02916	50 S 核糖体蛋白 L35	-16.67	ngs2_3254	K02878	50 S 核糖体蛋白 L16	-18.45
ngs2_2131	K02897	50 S 核糖体蛋白 L25	-1.93	ngs2_3255	K02982	30 S 核糖体蛋白 S3	-13.15
ngs2_2523	K02884	50 S 核糖体蛋白 L19	-9.59	ngs2_3256	K02890	50 S 核糖体蛋白 L22	-20.05
ngs2_2526	K02959	30 S 核糖体蛋白 S16	-8.18	ngs2_3257	K02965	30 S 核糖体蛋白 S19	-17.85
ngs2_3016	K02970	30 S 核糖体蛋白 S21	-3.77	ngs2_3258	K02886	50 S 核糖体蛋白 L2	-17.77
ngs2_3111	K02956	30 S 核糖体蛋白 S15	-3.90	ngs2_3259	K02892	50 S 核糖体蛋白 L23	-24.69
ngs2_3130	K02899	50 S 核糖体蛋白 L27	-70.10	ngs2_3260	K02926	50 S 核糖体蛋白 L4	-23.80
ngs2_3131	K02888	50 S 核糖体蛋白 L21	-16.85	ngs2_3261	K02906	50 S 核糖体蛋白 L3	-24.14
ngs2_3168	K02996	30 S 核糖体蛋白 S9	-12.14	ngs2_3262	K02946	30 S 核糖体蛋白 S10	-66.80
ngs2_3169	K02871	50 S 核糖体蛋白 L13	-10.42	ngs2_3283	K02992	30 S 核糖体蛋白 S7	-10.70
ngs2_3235	K02879	50 S 核糖体蛋白 L17	-8.26	ngs2_3284	K02950	30 S 核糖体蛋白 S12	-7.62
ngs2_3237	K02986	30 S 核糖体蛋白 S4	-14.74	ngs2_3602	K02913	50 S 核糖体蛋白 L33	-9.06
ngs2_3238	K02948	30 S 核糖体蛋白 S11	-12.30	ngs2_3603	K02902	50 S 核糖体蛋白 L28	-8.27
ngs2_3239	K02952	30 S 核糖体蛋白 S13	-6.86	ngs2_3634	K02914	50 S 核糖体蛋白 L34	-2.47
ngs2_3240	K02919	50 S 核糖体蛋白 L36	-15.66	ngs2_3850	K02867	50 S 核糖体蛋白 L11	-7.76
ngs2_3242	K02876	50 S 核糖体蛋白 L15	-14.48	ngs2_3851	K02863	50 S 核糖体蛋白 L1	-11.81
ngs2_3243	K02907	50 S 核糖体蛋白 L30	-13.41	ngs2_3852	K02864	50 S 核糖体蛋白 L10	-7.54
ngs2_3244	K02988	30 S 核糖体蛋白 S5	-18.17	ngs2_3853	K02935	50 S 核糖体蛋白 L7/L12	-20.19
ngs2_3245	K02881	50 S 核糖体蛋白 L18	-12.80	ngs2_4117	K02990	30 S 核糖体蛋白 S6	-8.10
ngs2_3246	K02933	50 S 核糖体蛋白 L6	-17.17	ngs2_4119	K02963	30 S 核糖体蛋白 S18	-11.21
ngs2_3247	K02994	30 S 核糖体蛋白 S8	-15.03	ngs2_4120	K02939	50 S 核糖体蛋白 L9	-11.93
ngs2_3248	K02954	30 S 核糖体蛋白 S14	-19.11	ngs2_0285	K02909	50 S 核糖体蛋白 L31	5.34

表 7 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌趋化性和鞭毛通路基因表达的影响

Table 7 Effect of water decoction of *S. baicalensis* to gene expression in chemotaxis and pathway of flagella of uropathogenic *E. coli* NB8

Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change	Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change
ngs2_0207	K02400	鞭毛合成蛋白 FlhA	8.38	ngs2_1774	K03516	鞭毛蛋白 FlhE 前体	143.78
ngs2_0254	K02557	趋化蛋白 MotB	11.07	ngs2_1775	K02400	鞭毛合成蛋白 FlhA	4.04
ngs2_0955	K07772	趋化蛋白 CheY	4.23	ngs2_1776	K02401	鞭毛合成蛋白 FlhB	14.20
ngs2_0994	K02399	鞭毛合成分子伴侣蛋白 FlgN	8.46	ngs2_1777	K03414	趋化蛋白 CheZ	6.23
ngs2_0995	K02398	抗-sigma28 因子 FlgM	13.75	ngs2_1778	K03413	趋化蛋白 CheY	8.28
ngs2_0996	K02386	鞭毛基体 P 圈合成蛋白 FlgA	26.49	ngs2_1779	K03412	趋化蛋白 CheB	10.69
ngs2_0998	K02387	鞭毛基体杆蛋白 FlgB	17.59	ngs2_1780	K00575	趋化蛋白 CheR	31.61
ngs2_0999	K02388	鞭毛基体杆蛋白 FlgC	12.61	ngs2_1781	K05877	甲基化趋化蛋白 IV	320.61
ngs2_1000	K02389	鞭毛基体杆修饰蛋白	3.56	ngs2_1782	K05875	甲基化趋化蛋白 II	17.21
ngs2_1001	K02390	鞭毛弯曲蛋白 FlgE	19.52	ngs2_1783	K03408	趋化蛋白 CheW	9.12
ngs2_1002	K02391	鞭毛基体杆蛋白 FlgF	9.72	ngs2_1784	K03407	趋化蛋白 CheA	15.88
ngs2_1003	K02392	鞭毛基体杆蛋白 FlgG	7.35	ngs2_1785	K02557	鞭毛马达蛋白 MotB	11.50
ngs2_1004	K02393	鞭毛基体 L 环蛋白	7.23	ngs2_1786	K02556	鞭毛马达蛋白 MotA	7.77
ngs2_1005	K02394	鞭毛基体 P 圈蛋白	10.43	ngs2_1787	K02402	鞭毛的转录调节 FlhC	4.18
ngs2_1006	K02395	鞭毛杆装配蛋白 FlgJ	12.04	ngs2_1788	K02403	鞭毛的转录调节 FlhD	8.31
ngs2_1007	K02396	鞭毛圈相关蛋白 FlgK	9.32	ngs2_2273	—	鞭毛生物合成调节	2.48
ngs2_1008	K02397	鞭毛圈相关蛋白 FlgL	2.94	ngs2_3022	K03776	趋氧性受体单位	2.22
ngs2_1164	—	鞭毛圈抑制蛋白 YcgR	529.49	ngs2_4316	K05874	甲基化趋化蛋白 I	11.55
ngs2_1375	K05876	甲基化趋化蛋白 III	7.00				

表 8 黄芩水煎剂对尿道致病性大肠埃希菌 ABC 转运蛋白通路基因表达的影响

Table 8 Effect of water decoction of *S. baicalensis* to gene expression in transport protein ABC of uropathogenic *E. coli* NB8

Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change	Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change
ngs2_0074	K02063	硫胺素转运系统通透酶, thiP	-2.43	ngs2_2123	K13893	肽 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	3.51
ngs2_0075	K02064	硫胺素 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	-1.44	ngs2_2124	K13894	小菌素 C ABC 转运通透酶, YejB	2.68
ngs2_1053	K11069	腐胺/亚精胺 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	-1.87	ngs2_2125	K13895	小菌素 C ABC 转运通透酶	5.00
ngs2_1054	K11070	腐胺/亚精胺 ABC 转运通透酶	-2.14	ngs2_2145	K02196	细胞色素 C 生物合成蛋白, CcmD	359.25
ngs2_1055	K11071	亚精胺转运系统通透酶	-2.42	ngs2_2146	K02195	亚铁血红素 ABC 转运通透酶	9.81
ngs2_1056	K11072	腐胺/亚精胺 ABC 转运 ATP 通透酶	-1.32	ngs2_2147	K02194	亚铁血红素 ABC 转运通透酶	20.44
ngs2_2126	K13896	小菌素 C ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白, YejF	-1.71	ngs2_2148	K02193	细胞色素 C 生物合成蛋白, CcmA	2.18
ngs2_2555	K02000	甘氨酸/甜菜碱 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	-6.46	ngs2_2159	K06159	多药 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	6.15
ngs2_3137	K07323	有机溶剂 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	-1.74	ngs2_2257	K10017	组氨酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	19.09
ngs2_3138	K02067	磷脂 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	-1.81	ngs2_2258	K10015	组氨酸转运通透酶, hisM	4.88
ngs2_3140	K02065	有机溶剂 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	-1.80	ngs2_2259	K10016	组氨酸/赖氨酸/精氨酸/鸟氨酸 ABC 转运通透酶, HisQ	5.61
ngs2_3402	K01999	氨基酸 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	-6.80	ngs2_2260	K10014	锌转运体	1.90
ngs2_0350	K15551	牛磺酸 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	3.86	ngs2_2261	K10013	氨基酸 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	3.66
ngs2_0352	K15552	牛磺酸 ABC 转运通透酶	7.44	ngs2_2366	K02047	硫酸盐/硫代硫酸盐转运通透酶亚类	8.51
ngs2_0618	K10004	精氨酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	3.52	ngs2_2557	K02002	甘氨酸/三甲胺乙内酯 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	2.28
ngs2_0619	K10002	谷氨酸/天冬氨酸转运通透酶, GltK	1.96	ngs2_3146	K06861	脂多糖 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	5.36
ngs2_0620	K10003	谷氨酸/天冬氨酸 ABC 转运通透酶, GltJ	6.23	ngs2_3214	K09969	氨基酸 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	50.91
ngs2_0621	K10001	氨基酸转运蛋白	1.60	ngs2_3217	K09972	精氨酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	16.69
ngs2_0719	K05776	钼 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	3.60	ngs2_3389	K05816	3-磷酸甘油 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	20.31
ngs2_0724	K02017	钼酸盐 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	2.26	ngs2_3390	K05815	3-磷酸甘油转运膜蛋白	11.54
ngs2_0771	K10038	谷氨酰胺 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	1.87	ngs2_3391	K05814	3-磷酸甘油转运通透酶	18.16
ngs2_0772	K10037	谷氨酰胺 ABC 转运通透酶	2.19	ngs2_3392	K05813	3-磷酸甘油 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	3.92
ngs2_0773	K10036	氨基酸 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	2.46	ngs2_3393	K01996	氨基酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	1.74
ngs2_0792	K13892	谷胱甘肽 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	1.62	ngs2_3394	K01995	氨基酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	4.72
ngs2_0793	K13889	谷胱甘肽 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白, GsiB	2.13	ngs2_3395	K01998	亮氨酸/异亮氨酸/缬氨酸转运酶亚类	5.41
ngs2_0794	K13890	谷胱甘肽 ABC 转运通透酶	4.60	ngs2_3396	K01997	支链氨基酸通透酶亚组, LivH	5.36
ngs2_0795	K13891	谷胱甘肽 ABC 转运通透酶, GsiD	9.01	ngs2_3404	K09811	细胞分裂蛋白, FtsX	4.17
ngs2_0817	K11073	腐胺/亚精胺 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	3.82	ngs2_3405	K09812	细胞分裂蛋白, FtsE	5.18
ngs2_0818	K11076	腐胺/亚精胺 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	4.04	ngs2_3420	K15585	镍 ABC 转运通透酶	11.39
ngs2_0819	K11075	腐胺转运系统通透酶, potH	5.39	ngs2_3421	K15586	钠离子反向转运体	24.23
ngs2_0824	K09998	精氨酸转运通透酶亚类, ArtM	1.39	ngs2_3423	K10824	镍 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	11.28
ngs2_0825	K09999	精氨酸转运通透酶亚类, ArtQ	1.41	ngs2_3505	K12372	肽 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	1.32
ngs2_0827	K10000	精氨酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	1.74	ngs2_3507	K12370	肽 ABC 转运体	3.55
ngs2_0843	K05685	大环内酯类 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	6.35	ngs2_3508	K12369	肽 ABC 转运通透酶	7.11
ngs2_0849	K16012	ATP-结合/通透, CydC	3.68	ngs2_3533	K10545	木糖 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	3.76
ngs2_0908	K15555	脂肪酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	8.33	ngs2_3534	K10544	木糖 ABC 转运通透酶	6.29
ngs2_0909	K15554	磺酸 ABC 转运蛋白	151.88	ngs2_3655	K02036	磷酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	3.55

续表 8

Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change	Gene ID	KO 号	功能注释	Fold change
ngs2_1047	K09810	肽 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	2.06	ngs2_3656	K02038	磷酸转运通酶亚组, PtsA	6.38
ngs2_1048	K09808	转运体	3.29	ngs2_3657	K02037	磷酸转运通酶亚组, PstC	9.90
ngs2_1232	K15581	肽 ABC 转运通酶	2.83	ngs2_3658	K02040	磷酸 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	3.56
ngs2_1233	K15582	肽 ABC 转运通酶	2.81	ngs2_3679	K06726	D-核糖吡喃酶	3.87
ngs2_1324	K10112	糖 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	7.11	ngs2_3681	K10440	核糖 ABC 转运通酶	3.01
ngs2_1337	K15580	肽 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	4.53	ngs2_3682	K10439	D-核糖转运亚组, RbsB	6.56
ngs2_1605	K06074	维生素 B12-转运 ATP 通酶	9.71	ngs2_3906	K10110	麦芽糖转运通酶	10.30
ngs2_1607	K06073	维生素 B12 转运通酶	3.04	ngs2_3907	K10109	麦芽糖转运蛋白膜蛋白	13.22
ngs2_1753	K09817	锌转运体	2.88	ngs2_3909	K10111	ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	4.77
ngs2_1754	K09816	锌转运体	4.62	ngs2_3988	K10549	细胞色素 C	11.94
ngs2_1792	K10538	阿拉伯糖 ABC 转运通酶	8.35	ngs2_4004	K02042	磷酸 ABC 转运通酶	5.93
ngs2_1793	K10539	阿拉伯糖 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	8.88	ngs2_4006	K02041	磷酸 ABC 转运蛋白, ATP-结合蛋白	8.83
ngs2_1794	K10537	阿拉伯糖 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	3.56	ngs2_4185	K07091	脂多糖 ABC 转运蛋白通酶, LptF	1.70
ngs2_1869	K10009	氨基酸 ABC 转运通酶	3.00	ngs2_4186	K11720	脂多糖 ABC 转运通酶	2.82
ngs2_2074	K05847	ATP-结合蛋白	3.52	ngs2_5076	K02016	柠檬酸依赖的铁转运, 周质蛋白	1.97
ngs2_2075	K05846	ABC 转运膜蛋白	8.15	ngs2_5078	K02015	Fe ³⁺ 枸橼酸 ABC 转运通酶	6.81
ngs2_2076	K05845	渗透保护物质吸收系统底物结合蛋白	4.00	ngs2_5079	K02013	铁 ABC 转运蛋白	4.47
ngs2_2095	K10540	甲基半乳糖苷 ABC 转运蛋白, 底物结合蛋白	4.36				

4 讨论

黄芩始载于《神农本草经》，为唇形科植物的干燥根，具有清热燥湿、泻火解毒、止血和安胎之功效。黄芩及其有效成分具有广泛的药理作用，如抗炎、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等^[25-26]，尤以抗细菌/真菌作用最为显著，抗菌的有效成分主要是黄芩苷和黄芩素，黄芩不仅对多重耐药大肠埃希菌具有显著的抗菌作用，还可以抑制大肠埃希菌生物被膜^[7]。本研究基于 RNA-seq 技术，通过 HiSeq2000 测序平台获得转录组测序数据，采用 Cufflinks 程序计算表达量、DEGseq 软件包进行差异表达基因分析，将差异显著的基因作 GO 和 COG 功能富集分析，并对 KEGG 代谢通路加以详细分析，发现黄芩作用于尿道致病性大肠埃希菌所引起的基因表达改变是整体性的改变，上调基因多于下调基因，黄芩首先是激发尿道致病性大肠埃希菌不同功能基因发生表达，开启其自我保护机制，以应对药物对细菌造成的损伤。上调基因集中在细菌趋化性和鞭毛组装蛋白，ABC 转运蛋白通路，II 型分泌系统；下调基因主要为核糖体途径、脂肪酸合成、糖酵解和三羧酸循环，这些结果提示黄芩对尿道致病性大肠埃希菌的作用是一个非常复杂的过程，揭示了黄

芩的抗菌作用机制与链霉素等抗生素不同^[13]。黄芩作用的靶位是糖酵解、三羧酸循环、脂肪酸的生物合成途径和蛋白质的翻译。黄芩通过抑制能量代谢的限速酶和产能酶以及脂肪酸的生物合成，从而影响细菌生长和繁殖；并通过核糖体蛋白编码基因表达的下调，来抑制细菌蛋白质的翻译与合成，这将破坏尿道致病性大肠埃希菌正常蛋白的结构与生物功能。此外，细菌趋化性、鞭毛组装途径和 ABC 转运蛋白在细菌对黄芩的应激反应中也具有重要作用。由此可见，黄芩对尿道致病性大肠埃希菌具有多靶位和多环节抗菌作用的特点，进一步表明中药在使用过程中不易产生耐药性，而且对抗菌药物多重耐药的细菌同样有效的独特优势。

本研究在国内外首次通过应用 RNA-seq 技术对我国常用传统中药黄芩对尿道致病性大肠埃希菌的分子作用机制进行了有益的探索，为中药黄芩的临床应用提供了理论依据。今后将对黄芩的全组分进行提取分离，研究不同成份的体外抗菌活性，进一步明确黄芩抑菌的有效成分，为开发高效低毒的中药抑菌剂提供依据和新的思路。

参考文献

- [1] 乔庐东, 陈 山. 大肠埃希菌诱发尿路感染发病机制

- 的研究进展 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2014, 35(1): 70-72.
- [2] Russo T A, Johnson J R. Medical and economic impact of extraintestinal infection due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(5): 449-456.
- [3] Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection [J]. *Nat Rev Urol*, 2010, 7(12): 653-660.
- [4] 尿路感染诊断与治疗中国专家共识编写组. 尿路感染诊断与治疗中国专家共识 (2015 版) [J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(4): 241-244.
- [5] 张 平, 张 艳. 尿路感染患者大肠埃希菌的分布和药敏情况 [J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(3): 477-479.
- [6] 云云, 汪长中. 中药抗耐药大肠埃希菌研究进展 [J]. 中国微生物学杂志, 2013, 25(2): 238-241.
- [7] 施高翔, 邵 菁, 汪天明, 等. 黄芩及其有效成分抗菌作用新进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3713-3718.
- [8] Li Y, Sun C, Luo H M, *et al.* Transcriptome characterization for *salvia miltiorrhiza* using 454 GS FLX [J]. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(4): 524-529.
- [9] Huang L L, Yang X, Sun P, *et al.* The first illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38653.
- [10] Gahlan P, Singh H R, Shankar R, *et al.* De novo sequencing and characterization of *Picrorhiza kurrooa* transcriptome at two temperatures showed major transcriptome adjustments [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 126.
- [11] Hao D C, Ma P, Mu J, *et al.* De novo characterization of the root transcriptome of a traditional Chinese medicinal plant *polygonum cuspidatum* [J]. *Sci China Life Sci*, 2012, 55(5): 452-466.
- [12] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22 [S]. 2015.
- [13] Qiu J, Zhou D, Han Y, *et al.* Global gene expression profile of *Yersinia pestis* induced by streptomycin [J]. *FEMS Microb Lett*, 2005, 243(2): 489-496.
- [14] Zhang T W, Luo Y F, Liu K, *et al.* BIGpre: a quality assessment package for next-generation sequencing data [J]. *Genom Proteom Bioinform*, 2011, 9(6): 238-244.
- [15] Trapnell C, Pachter L, S L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(9): 1105-1111.
- [16] Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, *et al.* Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(17): 2325-2329.
- [17] Trapnell C, Hendrickson D G, Sauvageau M, *et al.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 46-53.
- [18] Wang L, Feng Z, Wang X, *et al.* DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136-138.
- [19] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, *et al.* KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: W182-185.
- [20] Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1983, 49(3): 209-224.
- [21] Heath R J. Bacterial fatty-acid biosynthesis: an antibacterial drug target waiting to be exploited [J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(14): 715.
- [22] 陈禹先, 周 彤, 谢鲲鹏, 等. 黄芩素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抑菌机制的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(12): 2000-2006.
- [23] Zhang Y, Cronan J E. Transcriptional analysis of essential genes of the *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis gene cluster by functional replacement with the analogous *Salmonella typhimurium* gene cluster [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(13): 3295-3303.
- [24] Price A C, Choi K H, Heath R J, *et al.* Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin. Structure and mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(9): 6551-6559.
- [25] 于蓓蓓, 吕 凌, 于宗渊, 等. 基于抑菌药效的黄芩提取物精制工艺优选 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 362-366.
- [26] 闫明亮, 周玉枝, 李明花, 等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的黄芩醇提物延长果蝇寿命研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1714-1722.