

基于 UPLC-QTOF-MS 的单增李斯特菌复方新诺明 耐药性菌株代谢组学分析

周继福^{1,2}, 王 婷¹, 郭 佳^{1,3}, 陈 颖^{1*}

(¹ 中国检验检疫科学研究院 北京 100176

² 南京财经大学食品科学与工程学院 南京 210023

³ 天津科技大学食品科学与工程学院 天津 300457)

摘要 采用非靶标代谢组学方法,研究单增李斯特菌复方新诺明耐药株和敏感株的代谢组学差异。以复方新诺明(SXT)耐药株和敏感株为研究对象,使用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术(UPLC-QTOF-MS)获得菌株胞内代谢轮廓信息,建立 OPLS-DA 判别模型,并对差异化合物的数量、种类及其在代谢通路中的调控表达进行分析。结果表明:耐药株和敏感株的代谢特征存在显著差异,共鉴定出 21 种对分类有显著贡献的化合物,主要以氨基酸和核苷酸为主。差异代谢物主要参与氨基酸代谢、碳水化合物代谢和核苷酸代谢等通路。腺苷、色氨酸和亮氨酸在 2 条显著性差异代谢途径中的表达变化表明:菌株受复方新诺明作用后,细胞内的肽、蛋白质合成受阻,细胞氧化应激提高。甘油磷脂代谢表明:细胞调控转运、蛋白功能和信号转导受复方新诺明严重影响。本研究阐明了菌株受复方新诺明作用的耐药性形成原因,为药物作用靶点的寻找和干预菌株防控提供帮助。

关键词 单增李斯特菌; 耐药性; 非靶标代谢组学; 代谢通路

文章编号 1009-7848(2022)01-0215-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.024

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是一种革兰氏阳性、局部厌氧的短杆菌。菌株感染引起的李斯特菌病严重危害着人类健康^[1]。轻度感染会导致伴有发烧、呕吐和腹泻的肠胃炎,而重度感染则会导致脑膜炎、败血症、脑炎和孕妇流产等严重的李斯特菌病^[2]。对于李斯特菌病的治疗,通常推荐 β -内酰胺类抗生素(氨苄西林和青霉素)与氨基糖苷类抗生素单独或联合使用^[3-4]。然而,疾病治疗中部分患者对青霉素的过敏反应会造成休克或死亡^[5],对于青霉素表现过敏的患者,复方新诺明(Trimethoprim-sulfamethoxazole, SXT)作为常选的替代药物被使用。此外,复方新诺明在临床上也是治疗中枢神经退行性疾病和脑膜炎最好的口服替代药物^[6-7]。然而,抗生素的过度使用,已造成多种类食品及临床标本中发现复方新诺明耐药株。在 1 份临床和食品分离的李斯特菌耐药性统计中发现,菌株对复方新诺明的耐药率为 40.9%,远超庆

大霉素的 23.0%和青霉素的 11.1%^[8]。在鱼类及鱼加工工厂中分离的单增李斯特菌,对复方新诺明的耐药率为 47.1%^[9]。从我国南京即食肉类食品中分离的 33 株单增李斯特菌展现出 100%的复方新诺明耐药性^[10]。鉴于复方新诺明在临床上的用药地位和极高的耐药率,有必要探究单增李斯特菌复方新诺明相关耐药性的形成原因。

代谢组学是一种解释复杂生物系统的综合性研究方法,主要研究菌株细胞某一时刻所有代谢产物的集合,获得细胞代谢轮廓并对细胞生物学功能进行阐释^[11-12]。代谢组学技术已在一些病原菌抗生素耐药性研究中得到应用^[13-15]。目前对于单增李斯特菌的耐药性研究主要集中在植物提取物^[16-17]和微生物多肽^[18]的抗菌机制方面。Zhao 等^[16]利用 NMR 研究抗菌多肽和葡萄籽提取物(Grape seed extract, GSE)对单增李斯特菌的抑菌作用,结果发现使用前、后,菌株的三羧酸循环(TCA)、能量代谢和氨基酸生物合成被阻断,从而展现出抗菌效果,然而尚未见在单增李斯特菌抗生素耐药性研究中应用的报道。面对日益严峻的抗生素耐药现状,了解菌株受抗生素作用产生的细胞代谢反应,可为药物作用靶标的寻找、耐药机制研究及开发

收稿日期: 2021-06-17

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项
(2018YFC1603800)

作者简介: 周继福(1996—),男,硕士生

通信作者: 陈颖 E-mail: chenyingcai@163.com

新型抗生素提供研究基础。

本研究基于非靶标代谢组学方法,利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术(Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF-MS)对菌株胞内代谢产物进行分离、检测,分析菌株代谢轮廓存在的显著性差异,并对菌株耐药代谢途径进行富集分析,探究菌株代谢特征和耐药性之间的关联性。

1 材料与amp;方法

表1 食品分离株主要信息

Table 1 Main information of *L. monocytogenes*

菌株编号	食品分离基质	菌株编号	食品分离基质
16081401	西冷牛排 A	16081425	烟熏三文鱼 C
16081402	西冷牛排 A	16081426	烟熏三文鱼 C
16081403	西冷牛排 A	16081427	烟熏三文鱼 C
16081404	西冷牛排 A	16081429	烟熏三文鱼 D
16081405	西冷牛排 B	16081430	烟熏三文鱼 D
16081406	西冷牛排 B	16081433	去骨牛肋排
16081407	西冷牛排 B	16101201	黑鱼皮
16081408	西冷牛排 B	16101203	黑鱼皮
16081409	肉眼牛排	16112101	扁桃仁巧克力脆皮雪糕
16081410	肉眼牛排	16112102	扁桃仁巧克力脆皮雪糕
16081411	牛腩	17041902	日式料理(肉松)
16081412	去骨牛肋排	17041904	日式料理(鱼子酱)
16081413	去骨牛肋排	17061702	烧鸡
16081414	烟熏三文鱼 A	17061703	烧鸡
16081416	烟熏三文鱼 A	17061704	烧鸡
16081417	烟熏三文鱼 A	17061705	烧鸡
16081418	烟熏三文鱼 A	17061707	凉皮 A
16081420	烟熏三文鱼 B	17061708	凉皮 A
16081422	烟熏三文鱼 B	17061709	凉皮 B
16081423	烟熏三文鱼 B	17061710	凉皮 B

注:A-D代表同一超市不同品牌的食品基质。

1.2 仪器与amp;设备

高速冷冻离心机(D-37520),德国 Osterode 公司;小型迷你台式恒温摇床(XHZ-03),上海堪鑫仪器设备有限公司;超声波清洗仪(SB5200D),宁波新芝生物科技股份有限公司;真空离心浓缩仪(Concentrator plus),德国 Eppendorf 公司;四极杆

1.1 材料与amp;试剂

试验菌株为本实验室分离获得,食品分离基质包括即食食品,生、熟肉,40株菌株信息见表1。

脑心浸液肉汤(Brain heart infusion, BHI)、脑心浸液琼脂(Brain heart infusion agar, BHIA),英国 OXOID 公司;甲醇(质谱纯),乙腈(质谱纯),美国 Thermo Fisher 公司;甲酸,美国 Honeywell 公司;Milli-Q 纯水,德国默克集团;Kinetex 反相 C18 液相色谱柱,美国飞诺美(phenomenex)公司;聚四氟乙烯微孔过滤器,上海安谱实验科技股份有限公司。

飞行时间串联质谱仪(Triple TOF 6600)、超高效液相色谱仪(ExionLC AD),美国 AB SCIEX 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化和培养 将磁珠保藏菌株接种于 BHI 培养基中,37℃下恒温摇床培养 16~18 h。取

出后用无菌接种环蘸取一环菌液划线接种于 BHIA 平板上进行二次活化培养,37 °C 恒温培养 16~18 h,进行菌株药敏试验。取 200 μL 第 1 次纯培养物,按照体积比 1:100 加到新鲜的 BHI 培养基中扩大培养,取对数生长期菌液进行胞内代谢物提取。

1.3.2 菌株药物敏感性试验 使用微量肉汤稀释法测定菌株的抗生素敏感性。阳性对照质控菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)。根据菌株的最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 值对照临床实验室标准化研究所 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100-S24-2014 标准对菌株耐药性进行判读^[19](表 2),当质控菌株药敏结果符合标准时,认为药敏试验结果真实可靠。

1.3.3 菌株淬灭及代谢产物的提取、浓缩 菌株胞内代谢产物的提取参照 Singh 等^[20]的方法,略作修改。试验中,加入 40%冷甲醇水(4 °C)淬灭溶液的体积为 1.5 mL;室温下在细胞碎片中加入无菌超纯水的体积为 1.5 mL,其余步骤参照文献^[20]进行。真空离心浓缩仪用于菌株胞内代谢物的离心浓缩,对旋干后的浓缩产物加入 100 μL 超纯水进行复溶。涡旋混匀后的胞内代谢产物用 0.22 μm 聚四氟乙烯微孔过滤器过滤。将样品置于带有内衬管的螺纹口自动进样瓶中,-80 °C 保存。每个菌株样品做 4 次生物学平行试验。每个样本取同等体积 (10 μL) 代谢提取物混匀,作为质量控制 (Quality control, QC) 样品,对试验仪器的稳定性和重复性进行监测。

1.3.4 非靶标代谢组学分析 采用超高效液相色谱系统 (ExionLC AD, AB SCIEX) 对菌株胞内代谢产物进行分离。色谱柱使用 C18 反相色谱柱 (2.6 μm , 100 A, 100 mm \times 2.1 mm)。液相色谱系统参数设定:流动相:A 相:含 0.1% 甲酸的水溶液;B 相:含 0.1% 甲酸的乙腈溶液。流动相使用前进行超声脱气。流动相洗脱梯度如表 3 所示,色谱柱温度 40 °C,进样量 3 μL 。

胞内代谢产物的检测采用联用电喷雾电离 (ESI) 的四极杆飞行时间串联质谱仪 (Triple TOF 6600),分别在正、负离子电离模式下采集数据。使用全扫 (Full-Scan) 和信息依赖扫描模式 (Informa-

表 2 临床实验室标准化研究所复方新诺明 M100-S24-2014 标准

Table 2 M100-S24-2014 standard of institute of clinical laboratory standardization

抗生素种类	MIC 值判定标准/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
复方新诺明	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$

表 3 流动相洗脱梯度

Table 3 Mobile phase elution gradient

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
0.00	98	2	0.3
0.50	98	2	0.3
7.00	60	40	0.3
8.00	2	98	0.3
10.00	2	98	0.3
10.10	98	2	0.3
12.00	98	2	0.3

tion dependent acquisition, IDA), 动态背景扣除 (DBS), 对一级、二级谱图进行采集。离子源参数设定:正离子模式下的喷雾电压 (Ion spray voltage floating, ISVF), 5 000 V;负离子模式下的喷雾电压 (ISVF), -4 500 V。一级质谱的扫描范围 m/z 100~1 000, 保留时间 0.250 s;二级质谱扫描范围 m/z 50~1 000, 保留时间 0.05 s, 模式选用高分辨模式 (High resolution), 碰撞电压 (Collision energy, CE) 为 35 eV, 碰撞能量叠加 (Collision energy spread, CES) 为 15 eV。为保证高分辨质谱在数据采集过程中的高质量灵敏度, 使用自动校准装置系统 (Calibration device system, CDS) 加注专用 CDS 校准液用于系统校正^[21]。

1.4 数据分析

1.4.1 数据处理和分析 使用 MarkerView 1.3.1 软件 (AB SCIEX) 实现对所有进样样品的峰检测、峰比对、峰积分和数据归一化等数据预处理。利用 SIMCA15.0.2 软件对预处理的矩阵数据进行化学计量学分析,分析中权重 (Weighting) 设为佩尔托标度 (Pareto scaling, par)、转化 (Transformation) 为 log 转化。试验建立有监督的正交偏最小二乘分析 (Orthogonal partial least squares discriminant

analysis, OPLS-DA)模型。模型的拟合参数(R^2Y 和 Q^2)用于直观评判模型的质量,当 R^2Y 和 Q^2 值大于 0.9 时,认为建立的模型有非常优秀的可靠性和预测度。参数 R^2 和 Q^2 的差值最好处于 0.2~0.3 之间。试验中使用置换检验模式对模型进行检验,模型参数直观表示为 R^2 的截距小于 0.3 并接近于 0, Q^2 的截距小于 0.05^[22]。

1.4.2 差异代谢物的定性 差异化合物的筛选遵循单变量统计分析和多维变量统计分析相结合的方式。使用 SIMCA 软件建立 OPLS-DA 模型,根据模型输出变量重要性投影值 (Variable importance in projection, VIP),结合显著性统计值进行潜在差异化合物的筛选。试验中设定的差异化合物定性标准为“VIP \geq 1.5 & $P < 0.05$ ”。潜在差异化合物的初步筛选使用 PeakView 2.2 软件(AB SCIEX)中的 Formular Finder 插件,选择质量误差在 $\pm 5 \times 10^{-6}$ u 以内的化学式进行数据库检索和物质鉴定。差异化合物的对比确证使用人类代谢组数据库 (Human metabolome database, HMDB) (<http://www.hmdb.ca>)、MassBank (<https://massbank.eu/MassBank>) 和在线软件 MS-DIAL ([\[psc.riken.jp/compms/msdial/main.html\]\(http://psc.riken.jp/compms/msdial/main.html\)\)^{\[23-24\]}。](http://prime.</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.4.3 差异代谢物可视化分析和代谢通路分析 GraphPad Prism 8.0.2.(263)软件用于差异化合物火山图绘制。MetaboAnalyst 5.0 在线数据处理软件 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 中的 Statistical Analysis 模块用于差异化合物层次聚类分析,软件的 Pathway Analysis 模块结合京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) (<https://www.kegg.jp>) 用于代谢通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 菌株药物敏感性试验

基于 CLSI 判别标准,对 40 株单增李斯特菌进行 9 种常见抗生素药物敏感性测定。测定结果(表 4)表明:所有菌株对庆大霉素、氨苄西林、青霉素、万古霉素、红霉素、利福平、四环素等 7 种抗生素均表现为敏感。菌株对复方新诺明和环丙沙星有耐药现象,耐药率分别为 30% (12/40) 和 100% (40/40)。单增李斯特菌对环丙沙星的耐药分析研究将在其它试验中开展。

表 4 单增李斯特菌常见抗生素药敏性结果

Table 4 Results of drug sensitivity to common antibiotics of *L. monocytogenes*

菌株编号	GM	AM	P	SXT	VA	E	CIP	RA	TE
16081401	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081402	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081403	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081404	S	S	S	S	S	S	I	S	S
16081405	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081406	S	S	S	S	S	S	I	S	S
16081407	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081408	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081409	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081410	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081411	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081412	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081413	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16081414	S	S	S	R	S	S	I	S	S
16081416	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081417	S	S	S	R	S	S	I	S	S
16081418	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081420	S	S	S	R	S	S	I	S	S
16081422	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081423	S	S	S	R	S	S	R	S	S

(续表 4)

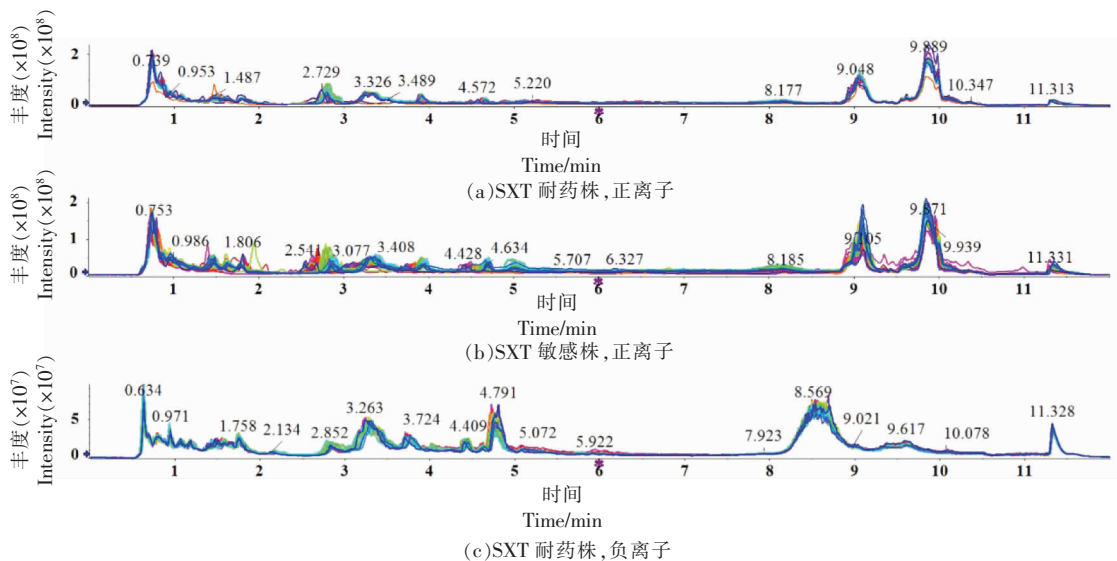
菌株编号	GM	AM	P	SXT	VA	E	CIP	RA	TE
16081425	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081426	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081427	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081429	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081430	S	S	S	R	S	S	R	S	S
16081433	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16101201	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16101203	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16112101	S	S	S	S	S	S	R	S	S
16112102	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17041902	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17041904	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17061702	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17061703	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17061704	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17061705	S	S	S	S	S	S	I	S	S
17061707	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17061708	S	S	S	S	S	S	R	S	S
17061709	S	S	S	S	S	S	I	S	S
17061710	S	S	S	S	S	S	R	S	S

注:S:对抗生素敏感;R:对抗生素耐药;I:对抗生素中等耐药;抗生素的缩略:GM:庆大霉素;AM:氨基西林;P:青霉素;SXT:复方新诺明;VA:万古霉素;E:红霉素;CIP:环丙沙星;RA:利福平;TE:四环素。

2.2 化学计量学分析

基于 UPLC-QTOF-MS, 在正、负离子模式下对单增李斯特菌胞内代谢产物进行分离、检测。在 MarkerView 软件输出的数据矩阵中, 选择单同位素峰用于后续化学计量学分析。根据总离子流

图结果(图 1), 正、负离子模式下 Markerview 软件峰提取时间分别设置为 0.6~5.0 min 和 0.6~6.0 min。在正、负离子模式下, 分别获得 3 795 个和 4 174 个峰, 化学计量学中用这些峰来说明 SXT 耐药株和敏感株的差异代谢特征^[25]。



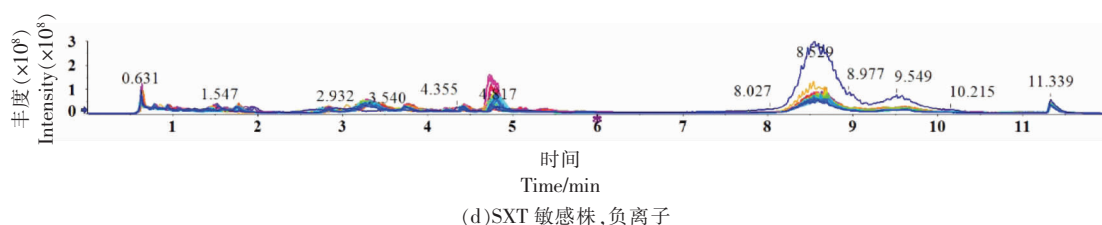
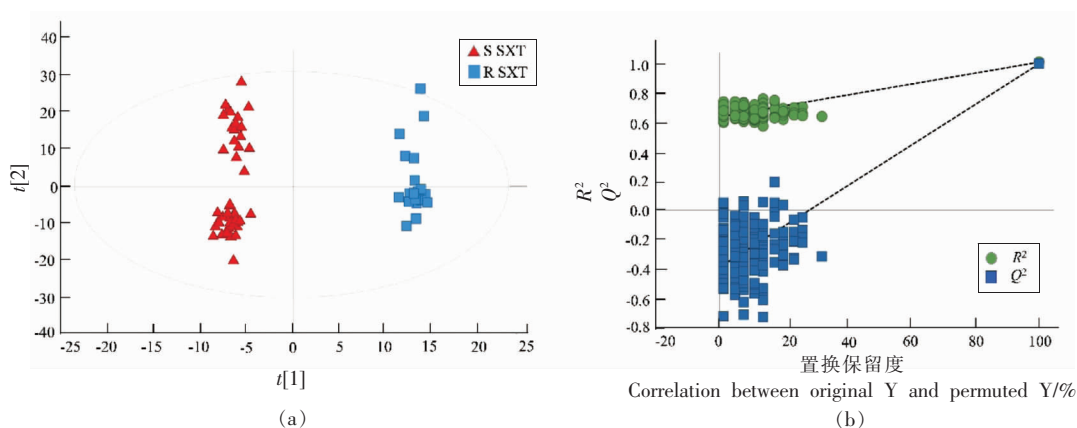


图1 SXT 耐药株和敏感株的 UPLC-QTOF-MS 总离子流图

Fig.1 UPLC-QTOF-MS total ion chromatogram of SXT-resistant strains and sensitive strains

使用 SIMCA 软件进行化学计量学分析。根据菌株复方新诺明药敏试验结果,将试验菌株分为 SXT 耐药株和敏感株,根据分组建立 OPLS-DA 模型。如 OPLS-DA 得分图所示(图 2a,3a),SXT 耐药株和敏感株的样本点距离较远,并有明显的聚

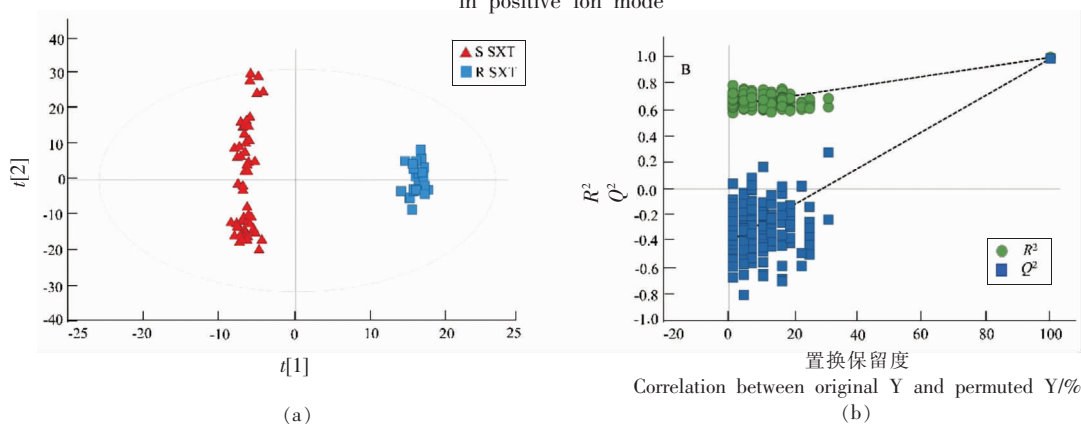
集趋势,说明耐药株和敏感株在代谢轮廓上存在差异。为直观表示模型拟合程度,OPLS-DA 在正、负离子模式下的拟合参数分别为:正离子模式下, $R^2Y=0.991$; $Q^2=0.981$,负离子模式下, $R^2Y=0.992$; $Q^2=0.988$,2 种电离模式下的模型参数指标均接近



注:S SXT:菌株对复方新诺明敏感;R SXT:菌株对复方新诺明耐药。

图2 正离子模式下 SXT 耐药株和敏感株 OPLS-DA 得分图(a)及置换检验图(b)

Fig.2 OPLS-DA score plot (a) and permutation test (b) of SXT-resistant strains and sensitive strains in positive ion mode



注:S SXT:菌株对复方新诺明敏感;R SXT:菌株对复方新诺明耐药。

图3 负离子模式下 SXT 耐药株和敏感株 OPLS-DA 得分图(a)及置换检验图(b)

Fig.3 OPLS-DA score plot (a) and permutation test (b) of SXT-resistant strains and sensitive strains in negative ion mode

于 1, 说明模型 OPLS-DA 具备很强的解释和预测能力, 能有效区分 SXT 耐药株和敏感株。

为验证建立的 OPLS-DA 模型的预测能力和解释能力, 选择置换检验进行验证。200 次迭代循环的置换检验结果如图 2b 和 3b 所示, 正、负离子模式下的原始模型 Q^2 检验结果分别为 -0.385 和 -0.397, 数值均小于 0.05。这说明建立的 OPLS-DA 模型能够用于单增李斯特菌复方新诺明耐药株和

敏感株的鉴别, 试验数据可用于菌株代谢特征分析。

2.3 差异化合物分析

根据差异化合物筛选标准实现潜在差异化合物的筛选。通过查阅相关文献和 HMDB 对化合物的描述, 最终确定耐药 SXT 菌株和敏感株的胞内差异化合物有 21 种(表 5)。耐药前、后的化合物变化显著, 主要以氨基酸、核苷和核苷酸为主。比

表 5 复方新诺明耐药株和敏感株差异化合物信息表

Table 5 Overview of differential compounds in *L. monocytogenes* SXT-resistant and sensitive strains

编号	m/z (MS)	RT/min	加合方式	m/z (MS/MS)	分子式	定性结果	\log_2 (FC) R SXT/S SXT
1	104.0523	1.02	[M+H] ⁺	58.06, 69.03, 87.04	C ₄ H ₉ NO ₂	4-氨基丁酸	0.08
2	132.1019	1.67	[M+H] ⁺	56.04, 69.07, 86.09	C ₆ H ₁₃ NO ₂	L-亮氨酸	0.07
3	132.1019	1.67	[M+H] ⁺	56.04, 69.07, 86.09	C ₆ H ₁₃ NO ₂	L-异亮氨酸	0.07
4	131.6913	1.64	[M+H] ⁺	86.09	C ₆ H ₁₃ NO ₂	N- α -甲基-L-缬氨酸	0.15
5	182.0671	1.67	[M+NH ₄] ⁺	65.03, 77.03, 91.05, 107.04, 119.04, 136.07	C ₉ H ₈ O ₃	4-羟基肉桂酸	-0.59
6	198.0862	0.85	[M+H] ⁺	83.05, 93.04, 110.07, 156.07	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃	N-乙酰-L-组氨酸	-0.17
7	229.1546	1.40	[M+H] ⁺	58.06, 70.06, 114.05, 142.08, 229.15	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	异丙基脯氨酸	-0.10
8	246.0788	1.80	[M+H] ⁺	69.06, 86.07, 87.05, 133.05, 246.15	C ₁₀ H ₁₉ N ₃ O ₄	亮氨酰天冬酰胺	0.21
9	252.1089	3.00	[M+H] ⁺	119.03, 136.06	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	脱氧腺嘌呤核苷	0.16
10	258.1105	0.86	[M+H] ⁺	60.08, 86.09, 98.98, 104.10, 124.99, 166.06, 184.07	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	甘油磷酸胆碱	-0.21
11	267.1614	3.23	[M+H] ⁺	136.06	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	腺苷	-0.34
12	284.0986	2.88	[M+H] ⁺	110.03, 135.02, 152.05	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	鸟苷	0.11
13	409.2191	3.23	[2M+H] ⁺	118.06, 146.05, 188.07, 205.09	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	L-色氨酸	0.24
14	457.1391	3.83	[M+H] ⁺	117.05, 198.06, 243.08, 359.13, 414.10, 439.10	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₉ P	黄素单核苷酸	0.14
15	560.0771	0.88	[M+H] ⁺	136.06, 348.07, 428.03	C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₄ P ₂	磷酸核糖-AMP	-0.22
16	267.0738	2.01	[M-H] ⁻	108.02, 135.03, 267.07	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	肌苷	0.23
17	267.0738	2.01	[M-H] ⁻	108.02, 135.03, 267.07	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	阿拉伯糖次黄嘌呤	0.23
18	312.0952	1.99	[M+FA-H] ⁻	134.04	C ₉ H ₁₇ NO ⁸	唾液酸	0.61
19	558.0644	0.78	[M-H] ⁻	78.95, 158.92, 211.00, 346.05, 408.01, 558.06	C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₄ P ₂	二磷酸腺苷核糖	-0.24
20	565.0466	0.88	[M-H] ⁻	78.95, 211.00, 241.01, 323.02, 384.98, 565.04	C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₄ P ₂	尿苷二磷酸葡萄糖	0.24
21	565.0466	0.88	[M-H] ⁻	78.95, 211.00, 241.01, 323.02, 384.98, 565.04	C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₄ P ₂	尿苷二磷酸半乳糖	0.24

注: m/z : 质荷比; RT: 保留时间; \log_2 (FC) 的正、负值分别表示 SXT 耐药株中差异化合物的上调、下调; R SXT 表示为复方新诺明耐药株; S SXT 表示为复方新诺明敏感株。

较耐药株和敏感株的差异倍数(Fold change,FC)值发现,相比于敏感株,耐药株中包括4-氨基丁酸、亮氨酸和色氨酸在内的14种化合物表现为上调 $[\log_2(FC)>0]$,而腺苷二磷酸核糖和4-羟基肉桂酸等7种物质表现为下调 $[\log_2(FC)<0]$ 。根据VIP值分析发现,氨基酸类物质的VIP值更大,说明菌株受到SXT作用产生耐药性后,氨基酸类物质的变化更为明显,更能表现SXT耐药株和敏感株间的差异(图4)。

为表示差异化合物丰度水平在SXT耐药株和敏感株之间的聚类程度,采用聚类热图进行可视化分析。如图5所示,R SXT和S SXT分别代表SXT耐药株和SXT敏感株。聚类结果表明40株单增李斯特菌被明显地区分为2簇,说明代谢组学数据可将SXT耐药株和敏感株区分开。热图中色标(2至-2)表示SXT作用菌株后细胞内差异化合物代谢水平由高到低的变化趋势。根据色标值的变化,包括亮氨酸、异亮氨酸、4-氨基丁酸、鸟苷、尿苷二磷酸葡萄糖和尿苷二磷酸半乳糖等15

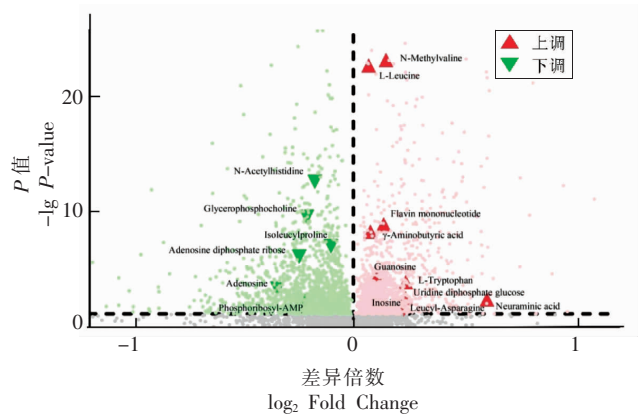


图4 复方新诺明耐药株和敏感株差异代谢物火山图
Fig.4 Volcano map of the differential metabolites between SXT-resistant and sensitive strains

种化合物在SXT耐药株中有较高的代谢水平,相反,这些物质在敏感株中的代谢水平较低。明显的代谢物丰度差异表明差异化合物可用于后续耐药株和敏感株的代谢通路富集分析^[26]。

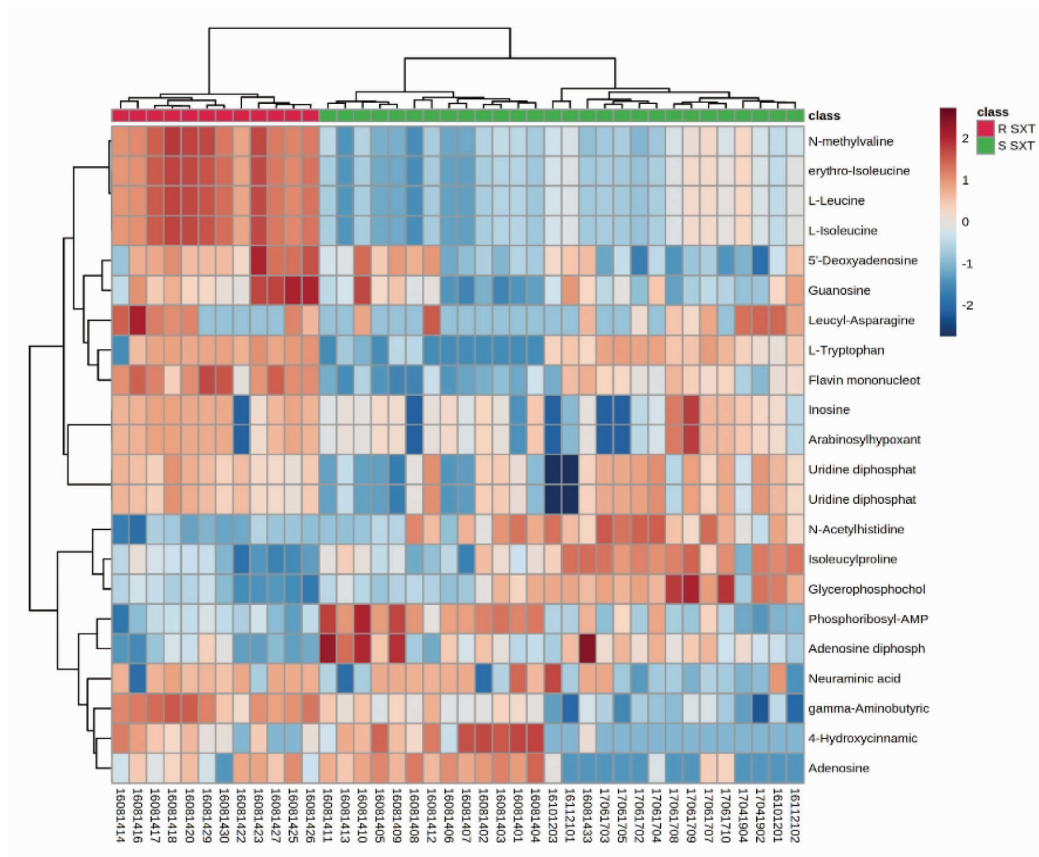


图5 SXT耐药株和敏感株差异代谢产物热图

Fig.5 Heatmap of differential metabolites between SXT-resistant strains and sensitive strains

2.4 差异代谢通路研究

为确定菌株受到复方新诺明作用产生耐药性前、后的相关代谢通路,基于 KEGG 数据库结合 Metaboanalyst 软件对定性的差异化合物进行代谢通路富集分析。分析发现,SXT 耐药株和敏感株的代谢途径一共有 19 条(表 6)。其中含 2 个或 2 个以上差异化合物的代谢途径有 6 条,通过归类分析发现,6 条代谢途径分为氨基酸代谢(2 条)、碳水化合物代谢(2 条)、核苷酸代谢(1 条)和遗传信息的处理、翻译(1 条)。与差异化合物相关的主要代谢途径如图 6a 所示。

为分析 SXT 引起菌株耐药性和敏感性的显著性差异代谢途径和重要代谢途径,根据 $P < 0.05$ 筛选耐药株和敏感株的显著性差异代谢途径,结果发现分别属于核苷酸代谢和遗传信息处理、翻译的嘌呤代谢(a)和氨酰基 tRNA 生物合成(b)代谢途径。根据响应值(Impact) ≥ 0.10 筛选,结果发现受到 SXT 作用严重影响的 4 条代谢途径,分别为核黄素代谢(c),氨基糖和核苷酸糖代谢(d),甘

油磷脂代谢(e),丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(f),归类表明代谢途径分别属于氨基酸代谢、碳水化合物代谢和脂质代谢。根据代谢途径在代谢通路中的相关关系设定图 6b 的代谢网络。

3 结论与讨论

本文基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用的非靶标代谢组学技术,研究单增李斯特菌复方新诺明耐药株和敏感株之间的代谢物差异。据文献报道,复方新诺明作用时细菌的二氢蝶呤合成酶和四氢叶酸的生物合成受阻,进而抑制核酸、蛋白质的合成,最终导致细菌生长繁殖障碍^[27]。试验中,差异化合物在代谢途径中的调控变化表明:在氨酰基 tRNA 的生物合成途径中,亮氨酸和色氨酸在 SXT 耐药株中表达上调,而亮氨酸用于维持细胞渗透稳定,这说明菌株细胞难以抵抗 SXT 的作用而生存菌株的抗性因亮氨酸的上调而降低^[28-29]。色氨酸能够提高细胞氧化活性,菌株可以通过调节氧化应激来增强抗性。腺苷用于

表 6 SXT 耐药株和敏感株代谢通路富集结果

Table 6 Enrichment results of metabolic pathways of SXT-resistant strains and sensitive strains

代谢途径	Match Status	P 值	$-\lg(p)$	错误发生率	响应值
嘌呤代谢	4/73	0.029103	1.5361	1.0	0.04065
氨酰基 tRNA 的生物合成	3/45	0.03618	1.4415	1.0	0.0
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	2/22	0.050361	1.2979	1.0	0.0
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解	2/23	0.054614	1.2627	1.0	0.0
半乳糖代谢	2/39	0.13669	0.86427	1.0	0.03811
色氨酸代谢	1/10	0.15625	0.80619	1.0	0.0
氨基糖和核苷酸糖代谢	2/44	0.1662	0.77936	1.0	0.13227
组氨酸代谢	1/12	0.18459	0.73378	1.0	0.09184
β -丙氨酸代谢	1/13	0.19843	0.7024	1.0	0.0
核黄素代谢	1/13	0.19843	0.7024	1.0	0.10396
丁酸酯代谢	1/17	0.25158	0.59933	1.0	0.06349
抗坏血酸和藻酸盐代谢	1/18	0.26433	0.57785	1.0	0.0
淀粉和蔗糖代谢	1/22	0.31334	0.50399	1.0	0.05787
甘油磷脂代谢	1/22	0.31334	0.50399	1.0	0.10801
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	1/22	0.31334	0.50399	1.0	0.13846
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	1/23	0.3251	0.48799	1.0	0.0
精氨酸和脯氨酸代谢	1/29	0.39176	0.40698	1.0	0.01035
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢	1/33	0.43269	0.36382	1.0	0.0
戊糖和葡萄糖醛酸酯的相互转化	1/35	0.45217	0.3447	1.0	0.00222

注:Match Status:试验中差异化合物匹配的代谢通路和 KEGG 数据库中相应代谢通路中化合物的数量比值。

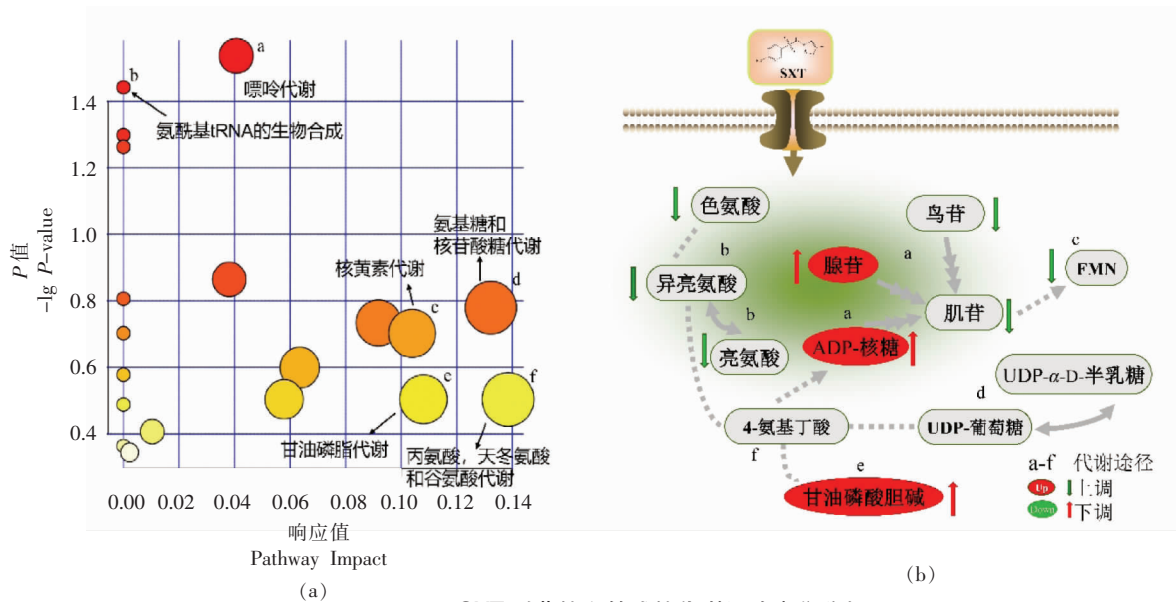


图6 SXT耐药株和敏感株代谢通路富集分析

Fig.6 Enrichment analysis of metabolic pathways of SXT-resistant strains and sensitive strains

酸化激活氨基酸,产生的氨酰基腺酸转移至核糖核酸,从而生成氨酰基 tRNA^[30]。试验中鉴定的核苷酸类化合物(如腺苷)在 SXT 耐药株中表现为下调,这说明菌株受 SXT 作用后,菌株的能量供应和氨基酸生物合成受到影响。甘油磷脂作为微生物细胞的膜脂类物质,控制着细胞的调控转运、蛋白功能和信号转导^[31]。试验中菌株在 SXT 作用下,菌株细胞的甘油磷酸胆碱表达下调,说明 SXT 对细胞的作用使得细胞调控转运、蛋白功能和信号转导发生变化,从而影响菌株对抗生素的耐药性^[32]。此外,试验分离的单增李斯特菌株对环丙沙星的耐药性非常高,值得关注,将在后续研究中分析。

参考文献

- [1] SCHODER D, MELZNER D, SCHMALWIESER A, et al. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(6): 919-924.
- [2] SCHLECH W F, LAVIGNE P M, BORTOLUSSI R A, et al. Epidemic listeriosis - Evidence for transmission by food[J]. The New England Journal of Medicine, 1983, 308(4): 203-206.
- [3] PAGLIANO P, ARSLAN F, ASCIONE T. Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: Meningitis and bacteraemia[J]. Le Infezioni in Medicina, 2017, 25(3): 210-216.
- [4] 冯有为, 潘佳栋, 陈思思, 等. 单核细胞增生李斯特菌的耐药特征及机制[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(2): 158-163.
FENG Y W, PAN J D, CHEN S S, et al. Antibiotic resistance characteristics and mechanism of *Listeria monocytogenes*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(2): 158-163.
- [5] 孟娟, 王良录. 青霉素过敏及诊断方法[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2016, 10(4): 412-420.
MENG J, WANG L L. Penicillin allergy and diagnostic methods[J]. Chinese Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2016, 10(4): 412-420.
- [6] GRANT M H, RAVREBY H, LORBER B. Cure of *Listeria monocytogenes* meningitis after early transition to oral therapy[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(5): 2276-2277.
- [7] UNO S, HASE R, TOGUCHI A, et al. Pyelonephritis with bacteremia caused by *Listeria monocytogenes*: A case report[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2017, 23(2): 111-113.
- [8] 孙照琨, 吴璇, 陈蕊, 等. 李斯特菌病既往中国文献报告病例分析[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(11): 1323-1326.
SUN Z K, WU X, CHEN R, et al. Previous cases of listeria disease reported in China[J]. Chin J Mi-

- croecol, 2016, 28(11): 1323-1326.
- [9] SKOWRON K, KWIECIŃSKA-PIRÓG J, GRUDLEWSKA K, et al. The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 282: 71-83.
- [10] WANG G Y, QIAN W J, ZHANG X X, et al. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China[J]. Food Control, 2015, 50: 202-208.
- [11] TUYIRINGIRE N, TUSUBIRA D, MUNYAMPUNDU J P, et al. Application of metabolomics to drug discovery and understanding the mechanisms of action of medicinal plants with anti-tuberculosis activity[J]. Clinical and Translational Medicine, 2018, 7(1): 1-12.
- [12] 吴清平, 李玉冬, 张菊梅. 常见食源性致病菌代谢组学研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 609-618.
- WU Q P, LI Y D, ZHANG J M. Advances in metabolomics of common food-borne pathogen[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 609-618.
- [13] MARTIN J K, SHEEHAN J P, BRATTON B P, et al. A dual-mechanism antibiotic kills gram-negative bacteria and avoids drug resistance[J]. Cell, 2020, 181(7): 1518-1532.e14
- [14] HUSSEIN M, HU X H, PAULIN O K A, et al. Polymyxin B combinations with FDA-approved non-antibiotic phenothiazine drugs targeting multi-drug resistance of Gram-negative pathogens[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 2247-2258.
- [15] ZHONG F Y, XU M Y, METZ P, et al. A quantitative metabolomics study of bacterial metabolites in different domains[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1037: 237-244.
- [16] ZHAO X, CHEN L, WU J E, et al. Elucidating antimicrobial mechanism of nisin and grape seed extract against *Listeria monocytogenes* in broth and on shrimp through NMR-based metabolomics approach[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 319(C): 108494.
- [17] MUHIALDIN B J, KADUM H, FATHALLAH S, et al. Metabolomics profiling and antibacterial activity of fermented ginger paste extends the shelf life of chicken meat[J]. LWT, 2020, 132.
- [18] SARAOUI T, FALL P A, LEROI F, et al. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bio-protective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031[J]. Food Microbiology, 2016, 53(Pt A): 70-78.
- [19] 李庆辉. 食品源单增李斯特菌的分离鉴定及耐药性检测[D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
- LI Q H. Isolation, identification and drug resistance of *Listeria monocytogenes* from food sources[D]. Shihezi: Shihezi University, 2019.
- [20] SINGH A K, ULANOV A V, LI Z, et al. Metabolomes of the psychrotolerant bacterium *Listeria monocytogenes* 10403S grown at 37 °C and 8 °C[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 107-114.
- [21] 胡谦, 张九凯, 韩建勋, 等. 基于UPLC-QTOF-MS技术的压榨和浸出油茶籽油甘油酯组成比较分析[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 235-240.
- HU Q, ZHANG J K, HAN J X, et al. Comparative analysis of the glyceride compositions of pressed and extracted camellia seed oil using ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Food Science, 2021, 42(2): 235-240.
- [22] 阿基业, 何骏, 孙润彬. 代谢组学数据处理——主成分分析十个要点问题[J]. 药学学报, 2018, 53(6): 929-937.
- A J Y, HE J, SUN R B. Multivariate statistical analysis for metabolomic data: The key points in principal component analysis[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 53(6): 929-937.
- [23] CHEN L F, LI H Y, CHEN Y, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces mortality of septic mice by modulating gut microbiota composition and metabolic profiles[J]. Nutrition, 2020, 78: 110863.
- [24] 刘晗璐, 张九凯, 韩建勋, 等. 基于UPLC-QTOF-MS代谢组学技术的NFC和FC橙汁差异成分比较[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 229-237.
- LIU H L, ZHANG J K, HAN J X, et al. Analysis of differential composition between not from concentrate and from concentrate orange juices using uplc-qtof-ms-based metabolomics[J]. Food Science, 2021, 42(6): 229-237.

- [25] 张宏蕊, 刘长虹, 张九凯, 等. 多光谱成像的玛咖掺伪定性鉴别和定量分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(1): 152–156.
ZHANG H R, LIU C H, ZHANG J K, et al. Identification and quantitative analysis of maca adulteration based on multispectral imaging[J]. Spectral Analysis and Spectral Analysis, 2020, 40(1): 152–156.
- [26] 张怡芸. 肉类食品中沙门氏菌耐药性与代谢特征关系的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
ZHANG Y Y. The relationship between *Salmonella* drug resistance and metabolic characteristics in meat foods[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [27] ROBSON J, MCKENZIE J L, CURSONS R, et al. The vapBC operon from mycobacterium smegmatis is an autoregulated toxin–antitoxin module that controls growth via inhibition of translation [J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 390(3): 353–367.
- [28] JOZEF CZUK S, KLIE S, CATCHPOLE G, et al. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*[J]. Molecular Systems Biology, 2010, 6(1): 364.
- [29] ZHAO L, ZHAO X, WU J E, et al. Comparison of metabolic response between the planktonic and air-dried *Escherichia coli* to electrolysed water combined with ultrasound by ¹H NMR spectroscopy[J]. Food Research International, 2019, 125(C): 108607.
- [30] MARUYAMA C, HAMANO Y. tRNA –dependent amide bond –forming enzymes in peptide natural product biosynthesis[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2020, 59: 164–171.
- [31] ECKER J, LIEBISCH G. Application of stable isotopes to investigate the metabolism of fatty acids, glycerophospholipid and sphingolipid species[J]. Progress in Lipid Research, 2014, 25(5): 14–31.
- [32] 李会. 空肠弯曲菌酰胺醇类诱导耐药株与敏感株的组学比较研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
LI H. Comparative omics study on *Campylobacter jejuni* susceptible and amphenicols–induced resistant strains[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.

Metabolomics Analysis of Trimethoprim–sulfamethoxazole Resistant Strains of *Listeria monocytogenes* Based on Ultra–high Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time–of–Flight Mass Spectrometry

Zhou Jifu^{1,2}, Wang Ping¹, Guo Jia^{1,3}, Chen Ying^{1*}

¹Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176

²College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023

³College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457

Abstract In this study, non–target metabolomics methods were used to study the metabolomic differences between trimethoprim–sulfamethoxazole (SXT) –resistant and sensitive strains of *Listeria monocytogenes*. Ultra–high performance liquid chromatography–quadrupole time–of–flight mass spectrometry (UPLC–QTOF–MS) was used to obtain the intracellular metabolic profile information of the strains contained by SXT–resistant and sensitive strains. OPLS–DA discriminant models were established to illustrate the metabolomics differences, then the number and type of different compounds were qualified and their regulatory expression in metabolic pathways were analyzed. The results showed that there were significant differences in the metabolic characteristics of drug–resistant strains and sensitive strains. A total of 21 compounds that contributed significantly to the classification were identified, mainly amino acids and nucleotides. Differential metabolites are mainly involved in the pathways of amino acid metabolism, carbohydrate metabolism and nucleotide metabolism. The expression changes of adenosine, tryptophan and leucine in two significantly different metabolic pathways indicate that the synthesis of peptides and proteins in the cell has been blocked and the cell oxidative stress has increased after the strain is affected by the compound trimethoprim. The metabolism of glycerophospholipids indicated that the cell regulation of transport, protein function, and signal transduction were severely affected by the strains being affected by the SXT. The study clarified the reasons for the formation of the drug resistance of the strains affected by the SXT, and provided help for the search for drug targets and intervention in the prevention and control of strains.

Keywords *Listeria monocytogenes*; drug resistance; non–target metabolomics; metabolic pathways