

文章编号: 1004-0374(2010)02-0185-07

细菌锌离子抗性机制研究进展

季秀玲*, 魏云林, 林连兵

(昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明 650224)

摘要: 锌(Zn)是生命代谢中重要的微量金属元素,但锌过量会对细胞造成毒害作用。细菌通过一些特有的机制来解除重金属离子对它们的毒害。该文重点介绍了细菌对高浓度 Zn^{2+} 的抗性机制,主要包括外排机制(RND蛋白家族、CDF蛋白家族和P-型ATPase)、螯合机制和外排后结合机制。通过这些机制细菌能有效控制胞内 Zn^{2+} 浓度,保护其不受过量 Zn^{2+} 的毒害,但抗性机制往往不依赖单一的抗性系统,而是多种系统协调作用的结果。细菌 Zn^{2+} 抗性机制的研究将有助于进一步揭示生物是如何应对高浓度金属离子的胁迫及相应的适应性规律。

关键词: 外排机制; 螯合; 外排后结合; Zn^{2+}

中图分类号: X172 **文献标识码:** A

Research advances on zinc ion resistance mechanisms in bacteria

Ji Xiu-ling*, Wei Yun-lin, Lin Lian-bing

(Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: Zinc, though an essential trace metal element, is toxic to the cell at higher concentrations. Mechanisms to evade metal ion toxicity are prevalent in bacteria. Mechanisms of zinc ion resistance are summarized in this paper. They range from efflux, sequestration, post-efflux binding to metal-responsive transcriptional regulatory proteins. Efflux-mediated zinc resistance mechanisms include RND system, CDF system and P-type ATPase. All these mechanisms aim at reducing the intracellular concentration of zinc ion so as to protect the cellular targets. Zinc ion resistance is not unique function, but the result of multiple resistance systems. Mechanisms of zinc ion resistance are particularly of interest. It helps in the understanding of the homeostatic control of managing the excess amount of metal.

Key words: Efflux-mediated resistance mechanism; sequestration; post-efflux binding; Zn^{2+}

密度在5以上的金属统称为重金属,如金、银、铜、铅、锌、镍、钴、镉、铬和汞等。随着它们在冶金、化工及农业等领域应用的不断拓展,重金属造成的环境污染问题逐步凸现,其治理也日益受到重视。众所周知,重金属在生物体内超过一定浓度时,会对其造成不同程度的毒害,对微生物来说也不例外,但它们可以通过主动运输、结合或转化等方式解除重金属离子对它们的毒害。

锌(Zn)是生命代谢中重要的微量金属元素:它是多种生物酶类的重要辅基,如碱性磷酸酶、乙醇脱氢酶、氨基肽酶等;它还参与了糖类、脂类、

蛋白质的合成和降解等重要的新陈代谢过程;在调节细胞的增殖、分化和程序性凋亡以及维持细胞的膜结构中均起到了重要作用。因此,锌离子(Zn^{2+})在整个生命活动中都扮演着重要的角色,可以说没有它生命就不可能存在。然而,物极必反, Zn^{2+} 过量会对细胞造成毒害作用。首先,过量的 Zn^{2+} 与

收稿日期: 2009-09-01; 修回日期: 2009-11-03

基金项目: 云南省自然科学基金(KKSA200826046);
昆明理工大学科学研究青年基金(KKZ2200826091)

*通讯作者 Tel:0871-3802069; E-mail: jixiuling1023@126.com

其他功能金属离子竞争蛋白的结合位点使其失活；其次，它还可形成羟基自由基，对DNA、蛋白质和脂类造成伤害；最后，高浓度 Zn^{2+} 还会直接抑制电子传递链中的电子传递，影响呼吸作用，对生物体造成损伤^[1]。如何对抗过量 Zn^{2+} 对生物体的损伤，对环境适应性最强的微生物首先给出了答案，如某些微生物可通过启动解毒机制精确调控胞内 Zn^{2+} 的动态平衡，从而对过量 Zn^{2+} 的毒性产生耐受性或抗性。

在现有的生命形式中，细菌是最古老、分布最广的生物。由于其生境的多样性，它们成为地球物质中最主要组成部分，因此是研究金属离子与生物相互作用的理想模型。对不同种属细菌 Zn^{2+} 调控机制研究表明，不同细菌可以同时具备一种或多种机制来保持胞内 Zn^{2+} 的浓度，就目前的研究结果来看，细菌对高浓度 Zn^{2+} 的抗性机制主要有：外排机制(包括resistance-nodulation-celldivision-RND蛋白家族、cation diffusion facilitators-CDF蛋白家族和P-型ATPase)、螯合机制和外排后结合机制(图1)。

1 外排机制

细菌排出 Zn^{2+} 的机制主要有三种，通过特殊的膜转运蛋白来完成：包括了RND蛋白家族、CDF蛋白家族和P-型ATPase的外排机制，其中RND蛋白家族的外排机制为革兰氏阴性细菌所特有。RND外排机制要涉及到细菌外膜，所以只存在于革兰氏阴性菌中。而CDF蛋白和P-型ATPase属于单亚基转运系统，能将细菌细胞胞质中过量的 Zn^{2+} 转运至

周质空间，这两种转运蛋白定位于细胞质膜，在革兰氏阳性和阴性细菌中均存在。

细菌利用金属应答转录调控蛋白维持金属离子动态平衡，这些蛋白与特定的金属离子结合，调控编码金属离子的转运、螯合、外排和吸收蛋白的基因的转录。它们多为MerR和ArsR/SmtB家族蛋白，其金属离子结合位点位于亚基表面，为3~4个Cys的巯基^[2]。MerR家族蛋白主要通过金属离子结合，激活细菌金属离子抗性相关基因的转录；而ArsR/SmtB家族蛋白则通过与特定金属离子结合后解除对细菌金属离子抗性相关基因转录的抑制，利用去阻遏作用赋予宿主菌对相应金属离子抗性^[3]。在耐 Zn^{2+} 的细菌中，金属应答转录调控蛋白也普遍存在^[4,5]。

Cupriavidus metallidurans CH34菌株为兼性化能自养型革兰氏阴性细菌，分离自高浓度重金属污染(如钴、锌、镍和镉)的工业沉淀物、土壤和废水中。在该菌中已发现了多种重要的抗性机制^[6,7]，RND蛋白家族、CDF蛋白家族和P-型ATPase均存在于CH34菌株中。RND系统，尤其是Czc系统不仅可以通过质子通道直接降低细胞胞质内 Zn^{2+} 的浓度，还能将其他外排系统转运至周质空间中过量的 Zn^{2+} 进一步排出到外界^[8]。这就使得一部分 Zn^{2+} 在进入胞质之前就被阻断在胞外， Zn^{2+} 的存在可以诱导三种外排泵工作。CzcCBA外排系统主要介导细菌高浓度 Zn^{2+} 抗性，同时能降低 Zn^{2+} 对编码P-型ATPase(*ZntA*或*CadA*)基因的诱导作用，CzcCBA是最高效的 Zn^{2+} 外排系统。因此，Czc是 Zn^{2+} 抗性的第一层防御系统；CDF蛋白主要是协助和参与 Zn^{2+} 的转运；P-型ATPase则利用ATP水解产生的能量将胞质内过量的 Zn^{2+} 向周质空间方向转运。

1.1 RND家族的外排机制

由于耐药节结化细胞分化家族(RND)蛋白排出胞质内过量 Zn^{2+} 为革兰氏阴性细菌所特有，在RND驱动的跨膜 Zn^{2+} 外排蛋白系统中，蛋白复合物中心泵通常为RND超家族成员，排出胞内多余的 Zn^{2+} ，同时需要一种外膜因子和膜融合蛋白将 Zn^{2+} 直接转运至胞外。该家族成员均为反向运输蛋白，为二聚体，每个单体由12个跨膜区域组成，参与 Zn^{2+} 输出的蛋白其跨膜 α -螺旋具有保守的DFGX₃DGAX₃VEN结构^[9]。

关于细菌RND驱动的 Zn^{2+} 外排机制研究得比较深入的是CH34菌株的Czc系统。编码Czc系统的基因(*czcC*、*czcB*和*czcA*)定位于该菌的质粒pMOL30

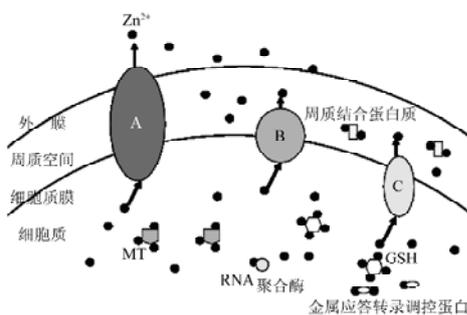


图1 细菌 Zn^{2+} 抗性机制

A: RND蛋白家族的外排机制; B: CDF蛋白家族的外排机制; C: P-型ATPase的外排机制; 白色长方形: 周质中与锌离子结合的蛋白质; 灰色五边形: 细胞质中与锌离子结合的金属硫蛋白(MT); 白色六边形: 细胞质中与锌离子结合的还原型谷胱甘肽(GSH); 椭圆图: 与锌离子结合的金属应答转录调控蛋白

上, 其基因产物 CzcA、CzcB 和 CzcC 组成一个完整的跨膜转运蛋白 CzcCBA 复合物。其中, CzcA 属于 RND 超家族的成员, 是阳离子 / 反向转运蛋白, 质子动力来源于 ΔpH , 其自身能形成穿膜的转运质子通道, 在位于胞质外的周质空间有一个 Zn^{2+} 结合位点, 胞内经质子通道转运出来的 Zn^{2+} 、周质内已存在的 Zn^{2+} 和经其他系统转运至周质空间的 Zn^{2+} 均能与 CzcA 的 Zn^{2+} 结合位点结合, 利用 H^+ 质子动力该系统可以将大量积累的 Zn^{2+} 通过 CzcB 和 CzcC 高效快速地向外膜转运 (图 2)。CzcA 蛋白的第 5 个跨膜 α -螺旋中的 Asp 参与质子转移, 是形成质子跨膜通道的组分之一; 而 CzcB 也是跨膜融合蛋白, 连接细胞周质空间与细胞外部环境, 主要是形成阳离子通道, 控制周质空间内阳离子的释放, CzcB 蛋白为二聚体或三聚体, 结构域中有 8 个 His 残基, 构成 2 个金属结合位点; CzcC 是外膜蛋白, 主要参与跨膜运输, 向外膜高效转运阳离子, CzcC 并不直接与 CzcA 融合, 而是通过 CzcB 贴附在 CzcA 上, CzcC 是一种修饰蛋白, 由它决定结合金属离子^[8]。CzcCBA 对 Zn^{2+} 的 k_{50} 值均在 mmol/L 水平, 在胞内 Zn^{2+} 浓度高于 k_{50} 时, CzcABC 系统快速将 Zn^{2+} 排出胞质, 而当胞质内 Zn^{2+} 浓度低于 k_{50} 值时, 该系统就无法快速泵出 Zn^{2+} , 比如 CH34 菌株胞内 Zn^{2+} 的转运就符合 S 形曲线, 希尔系数为 2^[10]。

RND 系统的外排机制普遍存在于其他的革兰氏阴性菌中, 如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) CMG103 和恶臭假单胞菌 (*P. putida*) CD2 菌株的 Czc 系统、恶臭假单胞菌 (*P. putida*) KT2440 菌株的 CzcCBA1 和 CzcCBA2 系统及幽门螺杆菌 (*Helicobacter*

pylori) Czn 系统^[10-13]。Czc 蛋白以及 Czn 蛋白与 CH34 菌株中的 Czc 系统具有高度的相似性, 其中 CzcA 和 CznA 属于 RND 蛋白家族成员, 与 CH34 菌株 Czc 型跨膜转运蛋白相似, 作为 Zn^{2+}/H^+ 反向运输蛋白穿过细胞质膜, 特异性外排 Zn^{2+} ^[10-12]。

RND 系统不仅可以通质子通道直接降低细胞胞质内 Zn^{2+} 的浓度, 还能将其他外排系统转运至周质空间过量的 Zn^{2+} 进一步排出到外界^[8]。这就使得一部分 Zn^{2+} 在进入胞质之前就被阻断在胞外, 因此 Czc 是 Zn^{2+} 抗性的第一层防御系统。

1.2 CDF 家族的外排机制

阳离子扩散蛋白家族 (CDF, T. C. 2. A. 4. 1. 1-2) 为金属转运蛋白家族, 只专一性地转运金属离子, 大多数参与 Zn^{2+} 的转运^[14]。细菌 CDF 蛋白定位于细胞质膜, 主要负责将过量 Zn^{2+} 从胞质内转运至周质空间, 降低胞内 Zn^{2+} 浓度, 属于阳离子 / H^+ 反向外排系统, 能量可以来源于浓度梯度、化学渗透梯度、 $\Delta \psi$ 、 ΔpH 或 K^+ 梯度等^[14, 15]。该家族蛋白多由 300~400 个氨基酸残基组成, 具有六个潜在的跨膜结构域、一个特殊的 N-端氨基酸序列和一段富含 His 残基的金属离子锚定区域, 该区域可以位于 C-端或 N-端, 甚至位于第四与第五跨膜螺旋之间^[8]; 其主要功能氨基酸残基位于保守的第二、第五和第六跨膜螺旋区域, 能形成完整的离子通道^[16]。CDF 系统主要对二价阳离子进行转运, 并且对其半径有一定的要求, 范围在 (74±2) pm 之间, Zn^{2+} 为 74 pm, 正好落在此区间^[9]。很多金属阳离子, 如 Zn^{2+} 均会通过非特异性吸收系统过量进入细菌胞内, 而 CDF 系统在将胞内多余的金属阳离子包括过量 Zn^{2+} 排出的过程中扮演了重要的角色。

CH34 菌株含有 3 种参与 Zn^{2+} 转运的 CDF 蛋白, 即 CzcD、FieF 和 DmeF。czcD 定位于质粒 pMOL30 上, 编码单体蛋白 CzcD, 其富含 His 区域能结合 2~3 个 Zn^{2+} ^[17], CzcD 能高效转运胞内过量的 Zn^{2+} , 降低胞内 Zn^{2+} 浓度, 并调控 CzcCBA 系统的表达, 提高宿主细菌的 Zn^{2+} 抗性^[18] (图 2); 而编码 FieF 和 DmeF 的基因定位于染色体上, 将它们转化锌敏感大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 后能诱导其宿主菌对 Zn^{2+} 产生抗性; 不同于其他已知 CDF 蛋白, DmeF 富含 His 区域位于细胞质膜内侧第四与第五跨膜螺旋之间, 而非一般的 N 端或 C 端^[8]。

一般的 *E. coli* 大多含有 CDF 家族的 2 种 Zn^{2+} 动态平衡蛋白 YiiP (FieF) 和 ZitB, 过量 Zn^{2+} 均可诱导它

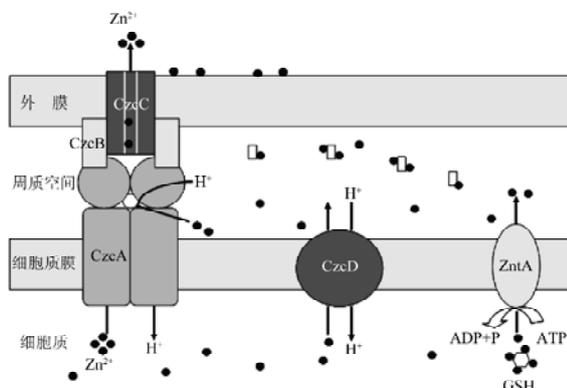


图2 *C. metallidurans* CH34菌株 Zn^{2+} 外排机制

图中自左至右分别代表 CzcCBA 蛋白的外排机制、CzcD 蛋白的外排机制和 ZntA 蛋白的外排机制

们大量表达,从而提高宿主菌对 Zn^{2+} 的耐受性^[14]。它们定位于细胞质膜上,均能与4个 Zn^{2+} 结合, YiiP (FieF) 为同型二聚体,与 Zn^{2+} 结合的位点处于二聚体表面第二和第四个跨膜区域之间, ZitB 与 Zn^{2+} 结合位点位于跨膜区域的 H₅₃、H₁₅₉、D₁₆₃ 和 D₁₈₆。它们均利用跨膜pH梯度催化内膜进行 Zn^{2+}/H^+ 交换转运^[19, 20], 从而降低胞内 Zn^{2+} 积累。

1.3 P-型ATPase的外排机制

P-型ATPase (P-type ATPase) 定位于细胞质膜, 是一类利用ATP水解产生的能量维持胞内离子强度的转运蛋白的总称。与重金属抗性相关的ATPase有以下一些特征: 具有强极性的N端, 其间有与重金属离子结合的位点; 具有保守的CPx基序, 包括CPC、CPH或CPS基序, 可归为CPx-型ATP酶; 同时在位于C端第六个跨膜区域34~43氨基酸的CPx基序中还有保守的组氨酸-脯氨酸(his-pro)二肽结构, 使该酶在跨膜区具有独特的空间结构, 该结构在重金属转运过程中扮演非常重要的角色, 其中WIYR/K保守序列对于 Zn^{2+} 转运至关重要^[21]。

Zn-CPx-型ATPase是细菌最重要的 Zn^{2+} 转运系统之一, 在CH34菌株中编码ZntA或CadA的基因定位于染色体上, 均属于Zn-CPx-型ATPase家族, 能利用ATP水解产生的能量高效转运 Zn^{2+} ^[8, 22] (图2)。ZntA蛋白N端富含His区域能与过量 Zn^{2+} 结合, 将细胞胞质内的过量 Zn^{2+} 定向转运到周质空间内; CadA蛋白的主要作用是参与 Cd^{2+} 的转运, 但当胞内 Zn^{2+} 浓度过高时, 作为一个备用的金属离子转运系统参与 Zn^{2+} 的转运^[21, 22]。在真核和原核生物的胞质内还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)能与一部分 Zn^{2+} 结合形成 Zn^{2+} -GSH复合物, 该复合物内的 Zn^{2+} 只有通过Zn-CPx-型ATPase才能转运至周质空间, 而位于质膜上的CzcCBA系统无法直接转运出 Zn^{2+} -GSH复合物中的 Zn^{2+} 。Zn-CPx-型ATPase在细菌中分布十分广泛, 如 *E. coli* 中的ZntA蛋白, 荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、金黄色葡萄球菌中以及幽门螺杆菌中的CadA、CadA1和CadA2蛋白均属于Zn-CPx-型ATPases, 它们为诱导表达型金属离子转运系统, 胞内过量的 Zn^{2+} 可以诱导它们过量表达, 从而高效排出 Zn^{2+} , 降低胞内浓度, 提高细菌的 Zn^{2+} 抗性^[12, 13, 23-25]。因此, Zn-CPx-型ATPase在维持细菌细胞质内 Zn^{2+} 的动态平衡中起着重要的作用^[22]。

E. coli 的ZntR蛋白属于MerR家族, 为金属应

答转录调控同型二聚体蛋白, 每个蛋白结合1~2个 Zn^{2+} , 结合了 Zn^{2+} 的ZntR与 *zntA* (*zntA* 编码Zn-CPx-型ATPase ZntA) 的启动子结合, 形成ZnZntR-DNA复合物, 导致DNA构象发生变化, 激活 *zntA* 基因的转录, 提高 Zn^{2+} 从细胞胞质内流出的效率^[4]。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* pI258) CadC蛋白属于ArsR/SmtB家族, 为金属应答转录调控同型二聚体抑制因子, 每个CadC单体由六个 α -螺旋和三个 β -折叠组成, 在第四和第五螺旋之间有螺旋-转角-螺旋DNA结合位点, CadC具有两个 Zn^{2+} 结合位点, 未与 Zn^{2+} 结合时抑制 *cadA* 基因的转录, Zn^{2+} 过量时与 Zn^{2+} 结合, 从 *cad* 操纵子/启动子中解离, 激活 *cadA* 基因的转录, 从而提高宿主菌对 Zn^{2+} 的抗性^[5, 24]。

2 螯合机制

金属硫蛋白(metallothioneins, MTs) 是一类环境胁迫诱导表达型蛋白, 具有抗氧化功能, 能够独立或与GSH一起保护细胞免受有害过氧化物的伤害。MTs富含Cys, 还原形式的Cys残基能通过羟硫键与金属离子结合, 形成金属-羟硫基复合物。

细菌的MTs能通过多价螯合来缓冲胞内瞬时过量的 Zn^{2+} , 降低或解除其对细胞的伤害。细菌可以利用MTs的Cys残基的硫和His的氮与金属离子形成螯合物^[26]。MTs在真核生物中较常见, 但在原核生物, 如蓝细菌中也发现了MTs, 它们的重要功能之一就是为 Zn^{2+} 依赖蛋白的生物合成提供 Zn^{2+} 。集胞藻属 (*Synechococcus* sp.) PCC 7942菌株的MT蛋白由 *smtA* 基因编码; PCC 6803菌株的MT蛋白由 *ziaA* 基因编码^[27]; 蓝细菌短丝颤藻 (*Oscillatoria brevis*) 的MT蛋白由 *bmtA* 基因编码。其中 *ziaA* 和 *bmtA* 能被 Zn^{2+} 诱导而大量表达, 它们均能有效降低胞内 Zn^{2+} 浓度, 经转化大肠杆菌后能明显提高其对 Zn^{2+} 的抗性^[28], 证明这些MT蛋白能赋予宿主菌 Zn^{2+} 抗性。

细菌ArsR/SmtB家族是一类重要的金属应答转录调控蛋白, 在调控 Zn^{2+} 动态平衡中扮演重要角色, 其成员为同型二聚体金属“感应”蛋白质, 含有 Zn^{2+} 结合位点和DNA结合区域, 未与 Zn^{2+} 结合时, 抑制DNA转录; 与 Zn^{2+} 结合后, 阻遏复合物从DNA上解离, 产生去阻遏作用, 从而激活细菌 Zn^{2+} 抗性相关基因的转录^[29]。ArsR/SmtB家族蛋白在细菌中较普遍, 如蓝细菌鱼腥藻属 (*Anabaena*)

PCC 7120 菌株的 *AztR* 蛋白、蓝细菌聚球藻 (*Synechococcus* sp.) PCC7942 和 PCC 6803 菌株的 *SmtB* 和 *ZiaR* 蛋白、蓝细菌短丝颤藻 (*Oscillatoria brevis*) 的 *BxmR* 蛋白等^[29-32]。

GSH 作为一种金属离子结合蛋白同样参与 *E. coli* Zn^{2+} 的动态平衡和抗性, 它主要通过 Cys 巯基、His 咪唑环、Asp 和 Glu 羧基与 Zn^{2+} 结合。GSH 有两个巯基和两个羧基与 Zn^{2+} 结合, 形成一个六价双-glutathionato 复合物“笼子”。GSH 和 P-型 ATPase *ZntA* 双缺失的 *E. coli* 突变株对 Zn^{2+} 抗性明显下降, 但 GSH 和 P-型 ATPase *ZntA* 的单一突变体对 Zn^{2+} 抗性影响很小, 证明 GSH 在细菌 Zn^{2+} 动态平衡中起着重要作用^[33]。

在细菌胞内存在大量以金属离子为辅基的酶和蛋白质, 如 RNA 聚合酶等, 它们在细菌细胞内能与 Zn^{2+} 通过螯合高效结合, 在缓冲胞内过量 Zn^{2+} 对细胞的伤害中扮演了重要角色。

3 外排后结合机制

外排后结合机制也是阻止外流离子再进入胞内的重要方式之一, 外排的金属离子通过沉淀或与特定蛋白结合被约束于胞外的特定区域。CH34 菌株可以通过沉淀作用来实现对外排后金属离子的调控, 外排的金属离子最终以硫酸盐和氢氧化物的形式沉淀于细胞的周质内^[22]。 Zn^{2+} 是一种具有重要生理功能的金属离子, 因此在胞内浓度过高时被外排沉淀于周质中的 Zn^{2+} 可被再利用, 过量的 Zn^{2+} 可暂时储存于细胞周质中。革兰氏阴性菌中的多种酶均可从周质中获取 Zn^{2+} 作为辅基, 如 *Ptr*、*UshA*、*PhoA*、*SodC*、*Rna*、*ZraP*、*ZnuA*、*YodA*、*NlpD* 和 *YibP* 等蛋白质均以 Zn^{2+} 为辅基^[34]。因此, 过量 Zn^{2+} 外排及胞外特异性结合的双重策略对于细菌控制胞内 Zn^{2+} 是非常有效的, 外排机制适用于快速地解除金属毒害, 而结合/储存方式更有利于细菌形成长期的抗性^[35]。

4 小结

细菌对金属离子的抗性机制往往不是依赖单一的抗性系统, 而是多种系统相互作用的结果。CH34 模式菌株就集中了代表性的 RND 家族蛋白、CDF 家族蛋白和 P-型 ATPase, 该菌的高抗性形成可主要归纳为: 首先, 通过基因水平转移, 含有的三种蛋白家族基因数量多; 其次, 具有能被金属

离子诱导的串联高效操作子, 如 CDF 蛋白 (*CzcD*) 与 RND 蛋白 (*CzcA*) 相联系, 提高了对金属离子的抗性; 最后, 不同的金属离子转运系统间能够互补, 达到对过量金属抗性最大化^[22]; 除了在 CH34 中存在的金属离子转运系统外, 细菌还能通过 MTs 多价螯合来缓冲胞内瞬时过量的金属离子, 降低或解除其对细胞的伤害; 而金属应答转录调控蛋白则可通过激活或去阻遏作用赋予宿主菌对相应金属离子抗性; 上述机制均可降低胞内过量金属离子浓度, 以达到保护细胞自身的目的。

随着各类新型复合金属材料的不开发和使用, 环境中重金属离子和多种抗生素协同污染的机率不断提高, 细菌通过自身的进化和适应形成了同时对两者的协同选择抗性, 由于重金属很难被降解, 成为长期、广泛且顽固的选择性压力, 使该环境中的微生物不仅保持和强化了原有的重金属抗性, 还加剧了对抗生素的抗性, 而具有这种特性的细菌很多是医院常见的致病菌^[36], 这种现象对于目前只利用抗生素进行细菌感染性疾病的治疗提出了新的挑战。协同抗性不但危害人类健康, 而且已成为威胁植物、动物感染性疾病防治的全球性问题^[37], 细菌的重金属抗性机制研究已不仅仅局限于单纯的重金属抗性, 而是更多地对协同抗性进行研究, 因此, 深入了解细菌重金属和抗生素协同选择抗性形成机制不但非常必要, 而且已经是一项刻不容缓的重要工作。

对细菌重金属抗性机制的研究很重要的一点是要回答高等生物如植物和动物的重金属抗性机制。到目前为止, 除 RND 家族蛋白的外排机制仅见于细菌外, 其他抗性机制在真菌、植物和动物中都被证实存在^[38]。与细菌相比, 植物和动物细胞在结构上不同, 因此在对金属离子的抗性机制上也有所区别, 如很多抗重金属植物的转运蛋白定位于液泡膜上(如 CDF 家族蛋白)或细胞器膜上(如 P-型 ATPase 定位于叶绿体膜、高尔基体膜及内质网上), 将细胞质内的过量 Zn^{2+} 排至体外或进行区室化隔离; 通过根部吸收、木质部装载、植物螯合肽和液泡的区室化, 转运、富集重金属从而大幅度地提高其对金属离子的抗性。目前在生物修复技术恢复生态环境研究领域, 有许多都是以细菌和植物共同作用为主, 但相关的协调作用机制也亟待加强。因此, 通过对细菌金属抗性机制的深入研究不仅可以更好地帮助人们研究和理解其他高等生物包括人类的重金

属抗性机制, 同时也可安全、清洁地解决环境问题提供重要的理论和实践基础。

参 考 文 献

- [1] Iqbal M, Kenney PB, Al-Humadi NH, et al. Relationship between mechanical properties and pentosidine in tendon: effects of age, diet restriction, and aminoguanidine in broiler breeder hens. *Poult Sci*, 2000, 79(9): 1338-44
- [2] Ordóñez E, Thiyagarajan S, Cook JD, et al. Evolution of metal (loid) binding sites in transcriptional regulators. *J Biol Chem*, 2008, 283(37): 25706-14
- [3] Pennella MA, Giedroc DP. Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals*, 2005, 18(4): 413-28
- [4] Cui J, Kaandorp JA, Lloyd CM. Simulating *in vitro* transcriptional response of zinc homeostasis system in *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol*, 2008, 2: 89
- [5] Kandegedara A, Thiyagarajan S, Kondapalli KC, et al. Role of bound Zn(II) in the Cad/Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor. *J Biol Chem*, 2009, 284(22): 14958-65
- [6] Mergeay M, Monchy S, Vallaëys T, et al. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(2-3): 385-410
- [7] von Rozycki T, Nies DH. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 96(2): 115-39
- [8] Munkelt D, Grass G, Nies DH. The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol*, 2004, 186(23): 8036-43
- [9] Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(2-3): 313-39
- [10] Stahler FN, Odenbreit S, Haas R, et al. The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. *Infect Immunol*, 2006, 74(7): 3845-52
- [11] Caille O, Rossier C, Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2007, 189(13): 4561-8
- [12] Hu N, Zhao B. Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 267(1): 17-22
- [13] Leedjarv A, Ivask A, Virta M. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol*, 2008, 190(8): 2680-9
- [14] Chao Y, Fu D. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12043-50
- [15] Guffanti AA, Wei Y, Rood SV, et al. An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K⁺ and H⁺. *Mol Microbiol*, 2002, 45(1): 145-53
- [16] Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, et al. Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, 2007, 8: 107
- [17] Anton A, Weltrowski A, Haney CJ, et al. Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2004, 186(22): 7499-507
- [18] Monchy S, Benotmane MA, Janssen P, et al. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol*, 2007, 189(20): 7417-25
- [19] Wei Y, Fu D. Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *J Biol Chem*, 2006, 281(33): 23492-502
- [20] Lu M, Fu D. Structure of the zinc transporter YiiP. *Science*, 2007, 317(5845): 1746-8
- [21] Lewinson O, Lee AT, Rees DC. A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(12): 4677-82
- [22] Legatzki A, Grass G, Anton A, et al. Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *J Bacteriol*, 2003, 185(15): 4354-61
- [23] Liu J, Dutta SJ, Stemmler AJ, et al. Metal-binding affinity of the transmembrane site in ZntA: implications for metal selectivity. *Biochemistry*, 2006, 45(3): 763-72
- [24] Ye J, Kandegedara A, Martin P, et al. Crystal structure of the *Staphylococcus aureus* pI258 Cad/Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-responsive repressor. *J Bacteriol*, 2005, 187(12): 4214-21
- [25] Rossbach S, Mai DJ, Carter EL, et al. Response of *Sinorhizobium meliloti* to elevated concentrations of cadmium and zinc. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(13): 4218-21
- [26] Blindauer CA. Metallothioneins with unusual residues: histidines as modulators of zinc affinity and reactivity. *J Inorg Biochem*, 2008, 102(3): 507-21
- [27] Robinson NJ, Whitehall SK, Cavet JS. Microbial metallothioneins. *Adv Microb Physiol*, 2001, 44: 183-213
- [28] Liu T, Nakashima S, Hirose K, et al. A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *FEBS Lett*, 2003, 542(1-3): 159-63
- [29] Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(2-3): 131-43
- [30] Liu T, Golden JW, Giedroc DP. A zinc(II)/lead(II)/cadmium(II)-inducible operon from the *Cyanobacterium anabaena* is regulated by AztR, an alpha3N ArsR/SmtB metallorepressor. *Biochemistry*, 2005, 44(24): 8673-83
- [31] Morita EH, Wakamatsu M, Kawamoto S, et al. Studies on the protein-DNA complex formation between the cyanobacterial transcription factors, SmtB and its homologues, functioning as zinc-ion sensors and the recognition DNA sequences. *Nucleic Acids Res Suppl*, 2003, (3): 203-4

- [32] Liu T, Nakashima S, Hirose K, et al. A novel cyanobacterial SmtB/ArsR family repressor regulates the expression of a CPx-ATPase and a metallothionein in response to both Cu(I)/Ag(I) and Zn(II)/Cd(II). *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17810-8
- [33] Helbig K, Bleuel C, Krauss GJ, et al. Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2008, 190(15): 5431-8
- [34] Hantke K. Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(2): 196-202
- [35] Blencowe DK, Morby AP. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(2-3): 291-311
- [36] Hayashi S, Abe M, Kimoto M, et al. The dsbA-dsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multi-drug resistance. *Microbiol Immunol*, 2000, 44(1): 41-50
- [37] Singh VP, Gupta P. Synthesis, physico-chemical characterization and antimicrobial activity of cobalt(II), nickel(II), copper(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes with some acyl dihydrazones. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2008, 23(6): 797-805
- [38] Kochian LV, Pence NS, Letham DL, et al. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant Soil*, 2002, 247: 109-19