

DOI: 10.13376/j.cblls/2017147

文章编号: 1004-0374(2017)11-1113-06

## ROS在抗生素致死效应中的作用机制及其应用

娄仕高, 鲁涛\*

(云南大学, 云南省微生物研究所, 昆明 650091)

**摘要:** 日益严重的细菌抗药性已成为人类健康的重要威胁, 而更加全面深入地了解抗生素杀菌机制可以帮助我们更好地应对细菌抗药性问题。研究表明, ROS 在抗生素的杀菌过程中起重要作用, 涉及细菌胞内复杂的生理反应。现总结 ROS 在抗生素杀菌过程中作用机制及应用方面的一些最新研究进展, 以期寻找新的方法增强现有抗生素杀菌效果及开发新型药物提供一个新的视角。

**关键词:** ROS; 抗生素; 杀菌机制

**中图分类号:** R978.1 **文献标志码:** A

## The mechanism of action of ROS in the antibiotic lethality and its applications

LOU Shi-Gao, LU Tao\*

(Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** The ever-growing antibiotic resistance has posed a serious threat to human health. The comprehensive and in-depth understanding of the bactericidal mechanism of antibiotics would help us tackle the problem. Studies show that ROS play an important role in the process of antimicrobial lethality, in which complex physiological responses are involved. Herein we summarized the recent advance of studies on the mechanism and applications of ROS action during antimicrobial treatment, which would provide a new perspective for finding new ways to enhance the antimicrobial lethality of currently available antibiotics and for developing novel antibiotics.

**Key words:** ROS; antibiotic; bactericidal mechanism

抗生素的发现在人类医学史上具有里程碑意义, 自 1929 年弗莱明发现青霉素后, 越来越多不同种类的抗生素相继被发现并广泛使用, 这使得细菌感染性疾病得到了有效的控制。但由于抗生素的不当使用以及细菌本身的遗传变异等原因使得越来越多的致病菌产生抗药性, 这极大地降低了现有抗生素杀菌的效率。据估计, 现在每年有 70 万人死于抗药菌的感染。如果不找到积极的解决方案, 减缓细菌抗药性的产生和传播, 到 2050 年, 每年感染人数可上升至 1 000 万, 累计 100 万亿美元将被用于抵御抗药致病菌感染<sup>[1]</sup>。面对日益严重的抗药细菌的传播和蔓延, 人们所采取的策略主要是加快新药的研发。然而新药的研发却是一个极其漫长的过程, 平均耗时长达 10~12 年<sup>[2]</sup>, 而研究表明病原菌能在 1~2 年, 甚至几个月后产生耐药性<sup>[3]</sup>。因此, 深入研究抗生素杀菌机制, 寻找新的方法以增强现

有的抗生素杀菌效果就显得尤为重要。

传统的观点认为各种抗生素都有其特异的作用靶点, 从而阻止细菌相应的生物学功能:  $\beta$ -内酰胺类和糖肽类抗生素通过与各自靶点结合抑制细胞壁合成; 喹诺酮类抗生素通过与 DNA 旋转酶或拓扑异构酶结合, 干扰 DNA 合成和修复; 氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类、链阳霉素类、氯霉素类抗生素以及恶唑烷酮类则作用于核糖体亚基, 干扰细菌蛋白的正常合成<sup>[4-5]</sup>。然而, 随着研究的不断深入, 人们发现传统的药物与靶点的相互作用并不能完全解释抗生素介导的细胞死亡。换言之, 抗生素与靶

收稿日期: 2017-04-07; 修回日期: 2017-09-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660013, 308-60012)

\*通信作者: E-mail: taolu2000@yahoo.com

点结合后是如何导致细菌死亡的?在此过程中是否有其他因素参与?大量的研究认为,作为细胞能量代谢副产物的活性氧(reactive oxygen species, ROS)在许多生理和病理过程中扮演重要角色,包括抗生素的杀菌过程<sup>[6-14]</sup>。抗生素处理可引起细菌胞内 ROS 过量产生,是造成细菌死亡的重要原因。本文总结了 ROS 在抗生素介导的细胞死亡过程中作用的最新研究进展,以期更全面地了解抗生素的杀菌机制,为更合理地使用抗生素治疗细菌感染性疾病提供参考。

## 1 ROS 概述

活性氧是氧自由基及其活性衍生物的总称,也就是细胞呼吸过程中产生的含氧代谢产物及其衍生的活性物质,主要有超氧阴离子( $O_2^{\bullet-}$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )、羟自由基( $\bullet OH$ )三类<sup>[15]</sup>。细菌胞内的 ROS 主要由分子氧经呼吸链电子传递产生,在许多生理和病理过程中发挥重要作用。为应对 ROS 对细胞造成的损伤,细菌进化出一套自我保护机制,除胞内存在非酶类抗氧化剂(抗坏血酸、维生素 E、谷胱甘肽等)起到抗氧化作用外,还存在许多抗氧化酶(如氧化物酶、超氧化物歧化酶)清除  $H_2O_2$  和  $O_2^{\bullet-}$ ,保护细胞免受 ROS 的损伤<sup>[16-17]</sup>。正常情况下,细胞内 ROS 的产生和清除是平衡的,当处于逆境胁迫时(如抗生素处理等),细菌胞内会产生过量的 ROS,从而打破其积累与清除平衡。过量产生的 ROS 会破坏铁硫簇从而释放大量的二价铁离子( $Fe^{2+}$ ), $Fe^{2+}$  参与 Fenton 反应( $Fe^{2+}+H_2O_2\rightarrow Fe^{3+}+OH+\bullet OH$ )产生羟自由基,造成细胞膜脂质过氧化、蛋白质及 DNA 的损伤,其中以 DNA 的损伤最为严重<sup>[18]</sup>。当羟自由基剂量过高时,生物分子的严重氧化损伤可直接导致细胞死亡。反之,氧化损伤在细菌修复范围内,则细胞将不会被杀灭,由于突变等原因其或成为抗药菌株(图 1)。

## 2 ROS参与抗生素杀菌的作用机制研究进展

### 2.1 ROS参与抗生素杀菌作用的发现

早在 1990 年,Greenberg 等<sup>[19]</sup>就通过对 SoxR 调控子的研究提出抗生素与其靶点的相互作用会产生 ROS 的假设。在后续的研究中,人们发现抗氧化剂可以使细菌免受氟喹诺酮诱导的基因突变<sup>[20]</sup>和提高细菌对抗生素的耐受<sup>[21]</sup>;同时在药物处理时,对药物具有不同敏感性的菌株胞内由于 ROS 水平升高所导致的氧化压力不同,敏感菌株胞内的氧化

压力较抗药菌株高<sup>[22-23]</sup>。这些研究表明抗生素的杀菌作用与 ROS 有关。而细菌基因表达分析显示,抗生素的处理会导致细菌胞内氧化压力标签基因的表达上升<sup>[24]</sup>,这从另一个侧面证明了抗生素的杀菌作用与 ROS 有关。此外,氧的可利用度影响了抗生素的作用效果<sup>[25]</sup>,而生物体内 ROS 的来源主要是分子氧,也间接说明了 ROS 在抗生素杀菌过程中起作用。

### 2.2 ROS的作用机制模型

基于之前的研究,Collins 团队从多个角度全面地阐述了 ROS 与抗生素杀菌效应之间的关系:(1)利用基因芯片对经喹诺酮处理或表达多肽毒素基因 *ccdB* 后的大肠杆菌分析发现,DNA 旋转酶的抑制引起了氧化压力、离子摄取与利用、铁-硫簇生物合成的显著变化,由此推断这一系列的变化或许是铁离子稳态调节被破坏,游离的  $Fe^{2+}$  参与 Fenton 反应产生羟自由基所致<sup>[7]</sup>;(2)使用荧光染料 HPF (3'-(p-hydroxyphenyl)fluorescein) 检测胞内羟自由基水平,结果发现在杀菌类抗生素(如诺氟沙星、氨苄西林、卡那霉素)作用下能检测到大量的荧光信号<sup>[26]</sup>;(3)当加入离子螯合剂 2,2'-联吡啶(2',2'-dipyridyl)或者 ROS 清除剂硫脲(thiourea),亦或敲除 *iscS* 基因(调控 Fe-S 簇的合成)时,可减轻抗生素对细菌的杀伤作用<sup>[26]</sup>;(4)通过基因表达分析发现,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)耦合的电子传递是抗生素杀菌关键的调节通路,而敲除 *icdA* 基因(编码异柠檬酸脱氢酶,在三羧酸循环中催化产生 NADH)后,降低了抗生素的杀伤力<sup>[26]</sup>。基于上述结果,Collins 团队提出 ROS 的积累是抗生素介导的细胞死亡的共同机制假说,认为药物与其靶目标相互作用后刺激依赖于三羧酸循环的电子传递链形成超氧化物;超氧化物损害 Fe-S 簇,使得二价铁可通过 Fenton 反应产生羟自由基;羟自由基氧化损伤 DNA、蛋白质和脂质,导致细胞死亡<sup>[7,26]</sup>(图 1)。

### 2.3 ROS作用机制模型的补充与发展

自此以后,有关 ROS 在抗生素杀菌过程中的作用机制研究得到了极大发展,这些研究主要集中在以下两个方面:(1)ROS 的产生和积累对抗生素杀菌效应的影响。如 Yeom 等<sup>[27-28]</sup>研究发现铁氧还原蛋白-NADP 还原酶(ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase, FprB)突变株在抗生素处理时相对于野生型表现出更高的耐受,过表达 *fprB* 导致细菌对抗生素更加敏感(FprB 可催化高价的铁离子形成  $Fe^{2+}$  参与 Fenton 反应,过表达该还原酶将导致更多  $Fe^{2+}$  的产生,从

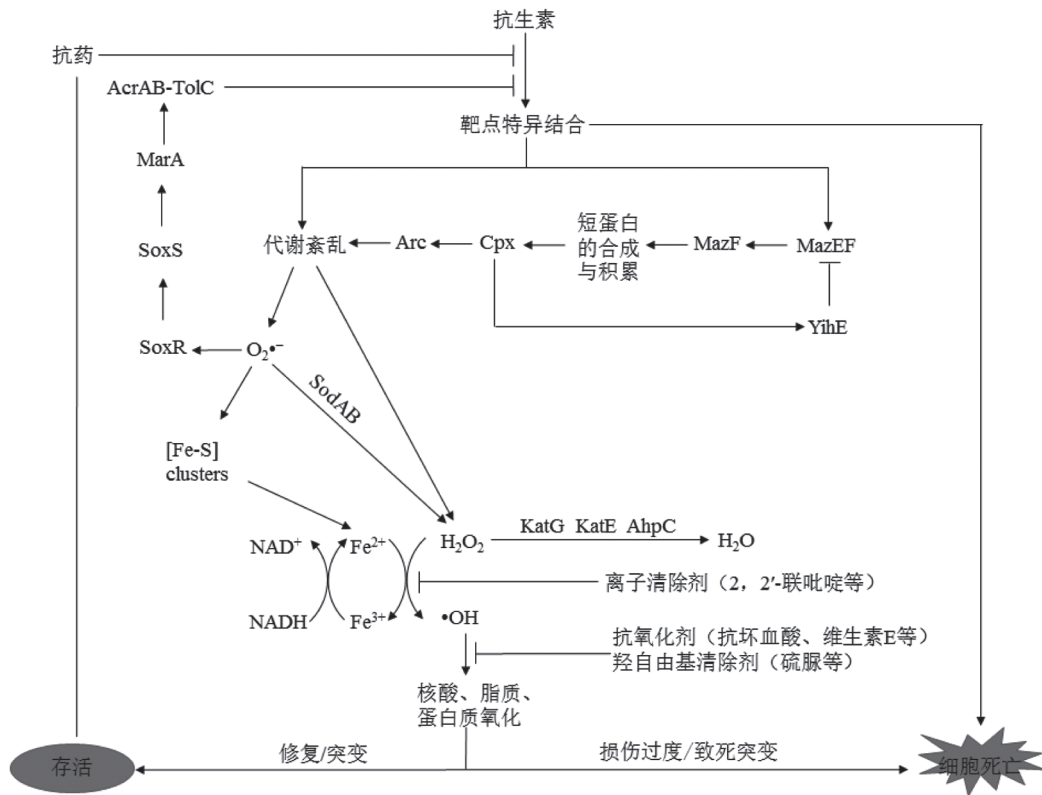


图1 ROS在抗生素介导的细胞死亡中的作用

而加剧羟自由基的产生); Girgis 等<sup>[29]</sup>用氨基糖苷类药物对一个转座子突变体库进行筛选发现, 2/3 参与电子传递链和氧化磷酸化的基因转座子插入突变, 有利于细菌生存(这些突变可能会减少呼吸酶参与潜在产生 ROS 的反应或通过电子传递链限制 NADH 消耗和通量, 从而限制在氨基糖苷类处理过程中 ROS 的产生); 当敲除编码过氧化氢酶的基因 (*katG*、*katE*、*ahpC*) 时, 抗生素杀菌效果得到增强<sup>[30]</sup> (这些基因的产物能够消除胞内 ROS)。(2)ROS 作用与其他细胞应激反应途径之间的关系。如 Liu 等<sup>[31]</sup>从单基因突变文库 (keio collection) 筛选得到了对多种抗生素敏感的菌株, 发现敲除 *recA*、*recB* 或 *recC* (参与 SOS 反应) 会导致大肠杆菌对多种杀菌抗生素 (包括 β-内酰胺类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类) 的敏感性增加, 这表明 ROS 介导的 DNA 双链断裂或许是抗生素杀菌的原因所在; 抗生素的作用会激活细菌 MazEF 程序性死亡途径 (programmed cell death, PCD), 稳定的毒素蛋白 MazF 对于 ROS 的产生与积累具有一定的调节作用<sup>[32-33]</sup>; 此外, 笔者课题组在大肠杆菌中发现了一个对细菌具有保护作用的基因 *yihE* (编码一种新的细菌 Ser/Thr 蛋白激酶),

其在药物处理时能够通过拮抗细菌 MazEF 程序性死亡途径对细菌起到保护作用, 是细菌程序性死亡途径中的关键调控因子<sup>[34]</sup> (图 1)。同时, 笔者课题组还发现 *YihE* 激酶对细菌的保护功能可能与 ROS 产生和积累有关 (待发表)。这些研究进一步补充和完善了 ROS 的作用机制模型。

#### 2.4 其他病原体中ROS作用机制的研究

ROS 的积累介导细胞死亡方面的研究并非仅存在于大肠杆菌中。研究指出, 在各种各样的病原体 (假单胞菌、分枝杆菌、沙门氏菌、李斯特菌、葡萄球菌和链球菌) 中都存在相同现象。比如在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中, Yeom 等<sup>[27]</sup>研究发现经抗生素 (诺氟沙星、庆大霉素、四环素) 处理后, 参与氧化应激的基因 *oxyR*、*ahp*、*gor* 的表达增加, 并且在 DNA 中检测到更高含量的 8-oxo-dGTP (dGTP 的氧化物形式, 其整合到核酸上会导致核酸损伤), 同时利用检测氧化压力的荧光染料在抗生素处理的细胞中发现了更高的荧光强度; Pandey 和 Rodriguez<sup>[35]</sup>在结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 也得到了类似的结果。在肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)



和李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 中的铁蛋白样离子储存蛋白 (ferritin-like iron storage protein) Fri、Dps 以及离子外排转运蛋白 (如 iron-citrate efflux transporter, IceT) 都能够保持体内离子平衡从而限制 Fenton 反应, 进而保护细胞免于抗生素的杀灭<sup>[36-38]</sup>。这些研究表明药物处理后产生氧化物并介导细菌损伤的现象广泛存在。

### 2.5 ROS作用机制的争议

然而, 在 ROS 的作用机制研究中也存在一些争议。一些研究对上述 ROS 作用机制模型提出了质疑, 这些质疑主要针对以下几方面。(1) 对细菌胞内氧化压力的检测是否具有特异性? 有研究指出 HPF 也能被诸如辣根过氧化酶、铁氰化物等非羟自由基物质氧化, 同时在厌氧条件下经抗生素处理后细菌胞内的 HPF 荧光值也会发生相应变化, 因此 HPF 荧光值的变化可能与 ROS 无关<sup>[39]</sup>。(2) ROS 的产生是否影响抗生素的杀菌作用? 比如研究发现, 在有氧和无氧条件下, 氨苄西林、诺氟沙星的杀菌效果并无明显区别, 抗生素的处理并不会导致耗氧量的增加, 胞内  $H_2O_2$  的含量也不会升高<sup>[40]</sup>。因此, 抗生素的杀菌效应不一定和 ROS 有关。(3) ROS 的清除是否影响抗生素的杀菌作用? Ezraty 等<sup>[41]</sup>指出在氨基糖苷类和  $\beta$ -内酰胺类抗生素处理后, 野生型和 *sodA*、*sodB* (编码超氧化物歧化酶) 双突变或 *oxyR* 突变体之间杀伤效果并无明显差异。(4) 电子传递链和 Fe-S 簇对于抗生素杀菌作用的影响是否与 ROS 有关? Ezraty 等<sup>[41]</sup>指出此影响或许与药物吸收有关, 而非通过 ROS 共有途径, 认为 ROS 参与抗生素杀菌这一理论仍有待商榷。

针对上述质疑, Collins 团队通过后续研究给出了回应, 对 ROS 作用机制模型进行了进一步完善<sup>[8-9, 12]</sup>。不同研究者间不一致甚至相悖的结果或许是不同实验室实验条件与方法差异以及氧化压力测量方法的局限所致<sup>[42]</sup>。总之, 虽然在一些细节上存在分歧, 但人们在对 ROS 的研究中似乎已逐渐形成了 ROS 参与抗生素杀菌的共识, 即抗生素与药物靶点特异结合后, 导致离子、代谢、呼吸等的稳态被打破, 诱发细胞氧化还原状态的改变, 促进 ROS 等活性物的形成。ROS 会对脂质、蛋白质、核酸等造成氧化损伤。当损伤发生后, 细胞会启动相应的损伤修复机制对其进行修复。如果这种损伤在可修复范围内或者非致死突变, 细胞会存活, 进而或演变为抗药菌株; 如果损伤超出其修复能力, 亦或修复本身机制及致死突变等原因, 最终将导致细胞死亡 (图 1)。

## 3 ROS在抗生素治疗中的应用

大量的研究证据表明, 抗生素与靶点结合后会导病原菌代谢的紊乱, 在此过程中会产生一些诸如 ROS 等的有害物质, 对细胞产生损伤。有目的地扰乱代谢, 增加 ROS 的产生是非常具有前景的药物开发方向: (1) 通过调节 ROS 产生相关基因的表达来增强抗生素的效应, 如 Lu 和 Collin 利用改造过的非裂解噬菌体分别表达 SoxR (调控氧化应激) 和 LexA3 (抑制 SOS 反应), 发现与对照组相比, 过表达 SoxR、LexA3 后增强了诺氟沙星对细菌的杀伤能力; (2) 添加离子调节 Fenton 反应产生更多的羟自由基以增强抗生素的杀菌作用, 例如添加纳米银离子可干扰代谢过程, 使电子传递链产生更多超氧化物, 导致 Fe-S 簇解离更多的  $Fe^{2+}$  参与 Fenton 反应产生更多羟自由基, 极大地增强抗生素的杀菌效果<sup>[43]</sup>; (3) 不同抗菌药物联用以增强抗菌作用, 如 Choi 和 Lee<sup>[44]</sup>用抗菌肽 Arenicin-1 与抗生素联用极大地增强了抗生素的效果。以上研究表明, 有针对性地开发作用于 ROS 生物学过程的药物或是解决当前药物产生抗药问题的一种有效途径。

## 4 总结与展望

ROS 参与抗生素介导的细胞死亡研究领域的一些主要研究成果表明, 抗生素与其药物靶点结合会产生诸如 ROS 等因子从而达到杀菌的目的, 这涉及一系列复杂的生理活动, 其复杂性远远超过 Collins 团队当初的设想。时至今日, 这其中所涉及的复杂的生理网络尚不清晰, 研究中一些问题依然存在一定的争议, 比如离子清除剂在清除  $Fe^{2+}$  的同时是否也会清除参与其他代谢过程的金属离子 (如三羧酸循环过程中的  $Mg^{2+}$ ), 从而影响相关酶的活性, 而之前所得结果是否只是因为代谢降低而对药物耐受而非 ROS 所致; 在接受抗生素治疗过程中, 一些常规的抗氧化食品添加剂或药品 (如维生素 C、白藜芦醇、姜黄素等) 是否会影响治疗效果。得到一个清晰的抗生素杀菌机理尚需时日, 还需要相关实验方法的突破及研究者们进一步的研究。但这些研究在一定程度上为全面了解抗生素杀菌以及细菌抗药机制提供了一个新的视角, 从系统生物学层面上去研究抗生素杀菌效应将是传统靶点理论的重要补充。以 ROS 相关生物学过程为靶点开发抗生素治疗佐剂可增加现有药物的作用效果, 也可为新靶点药物的研发提供新的思路和途径。

## [参 考 文 献]

- [1] O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations[EB/OL]. UK: Government of the United Kingdom, 2016(2016.5.19)[2017.3.27]. <http://apo.org.au/node/63983>
- [2] Thomson CJ, Power E, Ruebsamen-Waigmann H, et al. Antibacterial research and development in the 21(st) century--an industry perspective of the challenges. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7: 445-50
- [3] Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, et al. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet*, 2001, 357: 1179
- [4] Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 2000, 406: 775-81
- [5] Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8: 423-35
- [6] Zhao X, Hong Y, Drlica K. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70: 639-42
- [7] Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, et al. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Systems Biol*, 2007, 3: 91
- [8] Dwyer DJ, Collins JJ, Walker GC. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2015, 55: 313-32
- [9] Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E2100-9
- [10] Brynildsen MP, Winkler JA, Spina CS, et al. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 160-5
- [11] Zhao X, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 21: 1-6
- [12] Kishony R, Collins JJ. Antimicrobials: grappling with the complexities of antibiotics and resistance. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 21: v-vi
- [13] Keyer K, Imlay JA. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13635-40
- [14] Dwyer DJ, Kohanski MA, Collins JJ. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12: 482-9
- [15] Rajendran M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016, 13: 175-87
- [16] Seaver LC, Imlay JA. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, 183: 7173-81
- [17] Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 1119-22
- [18] Belenky P, Ye JD, Porter CBM, et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell Rep*, 2015, 13: 968-80
- [19] Greenberg JT, Monach P, Chou JH, et al. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6181-5
- [20] Arriaga-Alba M, Rivera-Sánchez R, Parra-Cervantes G, et al. Antimutagenesis of  $\beta$ -carotene to mutations induced by quinolone on *Salmonella typhimurium*. *Arch Med Res*, 2000, 31: 156-61
- [21] Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 949-54
- [22] Becerra MC, Albesa I. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297: 1003-7
- [23] Albesa I, Becerra MC, Battán PC, et al. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317: 605-9
- [24] Utaida S, Dunman PM, Macapagal D, et al. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology*, 2003, 149: 2719-32
- [25] Malik M, Hussain S, Drlica K. Effect of anaerobic growth on quinolone lethality with *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 28-34
- [26] Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 2007, 130: 797-810
- [27] Yeom J, Imlay JA, Park W. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species. *J Biol Chem*, 2010, 285: 22689-95
- [28] Yeom J, Jeon CK, Madsen EL, et al. Ferredoxin-NADP+ reductase from *Pseudomonas putida* functions as a ferric reductase. *J Bacteriol*, 2009, 191: 1472-9
- [29] Girgis HS, Hottes AK, Tavazoie S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One*, 2008, 4: e5629
- [30] Wang X, Zhao X. Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 1395-402
- [31] Liu A, Tran L, Becket E, et al. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 1393-403
- [32] Kolodkin-Gal I, Sat B, Keshet A, et al. The communication factor EDF and the toxin-antitoxin module mazEF determine the mode of action of antibiotics. *PLoS Biol*, 2008, 6: e319
- [33] Nariya H, Inouye M. MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *myxococcus* development. *Cell*, 2008, 132: 55-66
- [34] Dorsey-Oresto A, Lu T, Mosel M, et al. YihE kinase is a central regulator of programmed cell death in bacteria. *Cell Rep*, 2013, 3: 528-37
- [35] Pandey R, Rodriguez GM. A ferritin mutant of *Mycobacterium tuberculosis* is highly susceptible to killing by

- antibiotics and is unable to establish a chronic infection in mice. *Infect Immun*, 2012, 80: 3650-9
- [36] Frawley ER, Crouch ML, Binghamramos LK, et al. Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12054-9
- [37] Calhoun LN, Kwon YM. The ferritin-like protein Dps protects *Salmonella enterica* serotype enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 37: 261-5
- [38] Krawczykalska A, Marchlewicz J, Dudek D, et al. Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator of  $\beta$ -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. *BMC Microbiol*, 2012, 12: 278
- [39] Keren I, Wu Y, Inocencio J, et al. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 2013, 339: 1213-6
- [40] Liu Y, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*, 2013, 339: 1210-3
- [41] Ezraty B, Vergnes A, Banzhaf M, et al. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science*, 2013, 340: 1583-7
- [42] Fang FC. Antibiotic and ROS linkage questioned. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 415-6
- [43] Moronesramirez JR, Winkler JA, Spina CS, et al. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Sci Translat Med*, 2013, 5: 190ra81
- [44] Choi H, Lee DG. Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. *Res Microbiol*, 2012, 163: 479-86