

喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素胁迫下外膜蛋白 AhCirA 对嗜水气单胞菌耐药性的影响

赵心锐^{1,2,3#}, 谢于悦^{1,2,3#}, 黄雅雯^{1,2,3}, 刘彦楷^{1,2,3}, 林向民^{1,2,3*}

1 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州

2 福建农林大学, 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福建 福州

3 福建农林大学, 作物生态与分子生理重点实验室, 福建 福州

赵心锐, 谢于悦, 黄雅雯, 刘彦楷, 林向民. 喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素胁迫下外膜蛋白 AhCirA 对嗜水气单胞菌耐药性的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2339-2351.

ZHAO Xinrui, XIE Yuyue, HUANG Yawen, LIU Yankai, LIN Xiangmin. Effects of outer membrane protein AhCirA on antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* under quinolone and aminoglycoside stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(5): 2339-2351.

摘要:【目的】外膜蛋白 CirA 作为特异性儿茶酚酸盐铁载体的转运通道, 参与铁载体及其他营养物质的转运过程, 在细菌生理功能中发挥着重要作用, 但其对细菌耐药性的影响尚不明确。本研究探究 *ahcirA* 在抗生素胁迫下对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 耐药机制的影响, 为深入解析 *ahcirA* 调控细菌耐药性的分子机制提供理论基础。【方法】以嗜水气单胞菌 ATCC 7966 为研究对象, 构建 *ahcirA* 基因缺失株($\Delta ahcirA$), 并测定其对多种喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素的敏感性。进一步采用定量蛋白质组学技术, 比较 $\Delta ahcirA$ 菌株在有/无抗生素胁迫条件下的蛋白表达差异, 并通过生物信息学方法对差异表达蛋白进行功能分析。【结果】在含恩诺沙星和诺氟沙星的培养基中 $\Delta ahcirA$ 菌株的生长状况显著低于野生型菌株; 而在含卡那霉素和链霉素的培养基中 $\Delta ahcirA$ 菌株的生长状况优于野生型菌株。蛋白质组学与生物信息学分析表明, *ahcirA* 缺失可能通过影响与小分子代谢过程等多种生物过程相关的蛋白及耐药基因的表达, 从而改变细菌的耐药性。【结论】外膜蛋白 CirA 在嗜水气单胞菌耐药性中具有重要作用, 其缺失可通过调控多种功能蛋白及耐药基因的表达影响细菌对不同类型抗生素的敏感性。

关键词: 嗜水气单胞菌; 外膜蛋白 AhCirA; 喹诺酮类; 氨基糖苷类; 耐药性

资助项目: 国家级大学生创新创业训练计划(202510389041, 202510389036)

This work was supported by the National College Students Innovation Training Program (202510389041, 202510389036).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

Received: 2025-12-04; Accepted: 2026-01-19; Published online: 2026-01-29

Effects of outer membrane protein AhCirA on antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* under quinolone and aminoglycoside stress

ZHAO Xinrui^{1,2,3#}, XIE Yuyue^{1,2,3#}, HUANG Yawen^{1,2,3}, LIU Yankai^{1,2,3}, LIN Xiangmin^{1,2,3*}

1 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

2 Key Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

3 Key Laboratory of Crop Ecology and Molecular Physiology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

Abstract: [Objective] The outer membrane protein CirA serves as a specific transporter for catecholate-type siderophores and is involved in the uptake of siderophores and other nutrients, playing a crucial role in bacterial physiology. However, its impact on bacterial antibiotic resistance remains unclear. This study aimed to investigate the role of *ahcirA* in the antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 under antibiotic stress, thereby providing a theoretical basis for elucidating the molecular mechanism by which *ahcirA* regulates bacterial resistance. [Methods] With *A. hydrophila* ATCC 7966 as the model organism, an *ahcirA* knockout strain (Δ *ahcirA*) was constructed, and its susceptibility to multiple quinolones and aminoglycosides was assessed. Quantitative proteomics was further employed to compare protein expression profiles of Δ *ahcirA* with and without antibiotic stress. Bioinformatic approaches were adopted for the functional analysis of differentially expressed proteins. [Results] In the media containing enrofloxacin and norfloxacin, the growth of Δ *ahcirA* was significantly impaired compared with that of the wild-type strain. In contrast, Δ *ahcirA* exhibited enhanced growth in the media supplemented with kanamycin and streptomycin. Proteomic and bioinformatic analyses revealed that the deletion of *ahcirA* may alter bacterial antibiotic resistance by affecting the expression of proteins involved in multiple biological processes, such as small molecule metabolism, and by modulating the expression of antibiotic resistance genes. [Conclusion] CirA plays a significant role in the antibiotic resistance of *A. hydrophila*. Its absence influences bacterial susceptibility to different classes of antibiotics by regulating the expression of diverse functional proteins and antibiotic resistance genes.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; outer membrane protein AhCirA; quinolones; aminoglycosides; antibiotic resistance

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种广泛分布于多种水体的革兰氏阴性菌,属于气单胞菌属^[1-2]。该菌是自然水域中常见的条件致病菌,当水体环境或宿主体内环境发生剧烈变化时可引发鱼类患出血性败血症,还能同时感

染人类、鱼类及两栖动物等多种宿主^[3-4]。细菌外膜在维持细胞生存与致病过程中起着关键作用,它既能提供有效保护,又允许生命活动所必需的物质进行交换^[5]。目前,抗生素的作用机制大多依赖于进入细胞内干扰生物过程,因此

外膜蛋白直接影响细菌对抗生素的敏感性^[6-7]。

Colicin I receptor (CirA)是嗜水气单胞菌中的一种外膜蛋白,同时也是一种重要的铁载体转运蛋白^[8]。它能够在外膜形成特异性通道,负责将儿茶酚酸盐类铁载体从胞外转运至周质空间,该过程依赖 TonB 系统提供能量;随后,铁载体进一步通过内膜上的 ABC 转运蛋白进入胞内,从而参与维持细胞内的铁稳态^[9]。除铁载体转运功能外, CirA 在细菌毒力、生物膜形成以及抗生素耐药性等方面也发挥着重要作用。例如,肠道沙门氏菌中 *cirA* 基因的缺失会导致生物膜形成能力显著下降,并削弱抗生素耐药性^[10]。多项研究还表明,在抗生素胁迫、铁限制、氧化应激及胆盐应激等外界压力条件下,多种细菌中 CirA 同源物的表达会显著上调^[11]。

尽管已有研究显示嗜水气单胞菌的耐药性问题日趋严峻,且对其部分耐药机制有所阐明,然而其内在分子机制仍存在诸多未解之处,有待进一步深入探索^[12-13]。值得注意的是,喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素可通过降低膜通透性影响细菌耐药性,是两类常用的抗菌药物^[14]。AhCirA 作为嗜水气单胞菌中关键的铁载体转运蛋白和主要外膜通道蛋白,不仅影响生物膜形成和细菌运动能力,还可能参与调控多种抗生素耐受性。

本研究旨在探究 AhCirA 蛋白在嗜水气单胞菌耐药性形成中的作用机制。通过定量蛋白质组学方法分析 Δ *ahcirA* 在多种抗生素胁迫下的蛋白表达谱,可系统比较该缺失菌株与野生型菌株的响应差异。进一步结合生物信息学分析,有助于揭示差异表达蛋白所涉及的生物过程与分子功能,从而为阐明 AhCirA 是否通过调控外膜通透性等机制影响细菌耐药性提供线索。该研究可为深入理解嗜水气单胞菌的耐药机制提供新视角,并为后续防控策略及新型抗菌药物的研发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用菌株包括嗜水气单胞菌野生型 ATCC 7966、课题组先前研究中构建的 *ahcirA* 基因缺失菌株(Δ *ahcirA*)^[15]和 Δ *ahcirA* 基因回补菌株^[16]。前期已对 Δ *ahcirA* 突变株和回补株的基础生理表型进行了系统性验证,实验结果显示 Δ *ahcirA* 菌株回补后其生理功能也得到恢复^[16]。

1.2 抗生素抗性测定

本研究选用 2 种喹诺酮类抗生素(恩诺沙星、诺氟沙星)和 2 种氨基糖苷类抗生素(卡那霉素、链霉素)进行 *ahcirA* 基因的抗生素敏感性检测。配制含有不同终浓度抗生素的 LB 液体培养基,将 4 种待测菌株接种后,于 30 °C、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 1.0。将菌液进行 10 倍梯度稀释(共 8 个梯度),使用多通道移液器将各菌株不同稀释度的样品点至普通 LB 平板上,30 °C 倒置培养 12 h 后拍照记录。

1.3 最低抑菌浓度和生长曲线测定

采用二倍稀释法,用 LB 培养基对抗生素进行梯度稀释。将活化过夜的菌液稀释后,并分别加入含有抗生素的 LB 培养基中,以不含抗生素的 LB 培养基作为阴性对照。然后,于 37 °C 静置培养 16 h,记录最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值。根据测得的 Δ *ahcirA* 菌株对卡那霉素(kanamycin, KAN)、链霉素(streptomycin, SM)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)和诺氟沙星(norfloxacin, NOR)的 MIC 值,用 LB 培养基对上述抗生素进行梯度稀释,浓度梯度为 1/8、1/4、1/2 MIC。将培养至稳定状态的 Δ *ahcirA* 菌株以 1:100 的比例分别转入添加/不添加抗生素的 LB 培养基中,再转移至生长曲线板中,每个样品重复 3 次,最后使用全自动生长曲线分析仪于 30 °C 下连续监测 16 h,每小时记录 1 次 OD_{600} 值。

1.4 蛋白质样品制备

将过夜菌以 1:100 比例转接到 50 mL 的 LB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至 $OD_{600}=1.0$ 时, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min 收集所有菌体, 用预冷的 PBS 溶液洗涤 2 次, 再于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min。接着加入 1 mL 的 Lysis buffer [6 mol/L 尿素和 2 mol/L 硫脲溶解于 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.6) 溶液, 并加入蛋白酶抑制剂] 混匀, 置于冰上, 在超声破碎仪(30% 功率)中超声破碎 15 min 至菌液呈现透明, 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 然后将上清液转移到新的离心管中测定蛋白浓度。每组的 50 μ g 蛋白质样品, 在 56 °C 下用 10 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)还原 40 min, 然后在室温黑暗环境中使用 50 mmol/L 碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)烷基化 30 min。接着加入胰蛋白酶(1:50), 在 37 °C 下过夜酶解以获得多肽样品。然后用 C18 柱对得到的肽进行脱盐, 并进行质谱鉴定。

1.5 质谱鉴定

脱盐后的肽样品使用 EASY-nano-LC 系统, 以 600 nL/min 的流速进行分离。分离梯度设置为: 0–12 min, 10%–14% 的流动相 B (乙腈含 0.1% 的 FA); 12–57 min, 14%–26% 的流动相 B, 随后在 10 min 内将流动相 B 的比例从 26% 上升至 42%。利用 Q Exactive HF 质谱仪(ThermoFisher Scientific 公司)进行数据非依赖性采集(data-independent acquisition, DIA)数据库构建与分析。全扫描设置为 350–1 500 m/z 范围内, 分辨率 60 000; DIA 扫描分辨率设置为 30 000; NCE: 28%; AGC 目标: 3×10^6 , 最大注入时间为 auto。为 DIA 采集设置了 45 个可变 DIA 窗口。将通过质谱收集的原始 DIA 数据与使用 Maxquant 软件版本 v.1.6.3.4 的数据库进行比较, 该数据库包含嗜水气单胞菌 ATCC 7966 的蛋白质组序列。在肽和蛋白质水平上的错误发现率(false discovery rate, FDR)设置为 1%。

1.6 生物信息学分析

生物信息学分析使用 David (<https://david.ncifcrf.gov/>)在线数据库对差异蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析。此外, 本研究还使用 TBtools 软件^[17]进行相关性分析及 UpSet 分析, 综合抗生素耐药数据库 CARD 在线网站(<https://card.mcmaster.ca/>)预测耐药基因, 然后使用 Cytoscape 3.9.1 进行可视化。

1.7 RNA 提取

将过夜菌转接培养至 $OD_{600}=1.0$, 预冷离心机后, 以 5 000 \times g 离心 10 min 收集菌体, 加入 1 mL TRIzol, 充分吹打混匀, 静置 2–3 min。氯仿抽提: 加入 200 μ L 氯仿(所有试剂全部提前预冷), 涡旋振荡 1 min 充分反应至淡粉色、微黏稠, 室温静置 5 min, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 取上清并移至新的 RNA free 1.5 mL EP 管中(约为 600 μ L), 加入体积分数为 60% 预冷的异丙酮(约为 480 μ L), 涡旋振荡 1 min 充分反应, 室温静置 5–10 min; 洗涤: 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 留沉淀(尽量吸干)加入 75% 乙醇 1 mL (无水乙醇 750 mL+DEPC 水 250 μ L, 现用现配), 轻轻吹打混匀, 4 °C、7 500 r/min 离心 15 min, 重复 1 次, 4 °C、7 500 r/min 离心 15 min, 弃上清, 留沉淀(将残留液体吸净), 无菌台吹 3–5 min 至无乙醇味; 加入 30 μ L 的 DEPC 水, 溶解沉淀, 置于冰上测定其浓度。按照反转录试剂盒说明书(TaKaRa 公司)进行反转录获得 cDNA。

1.8 实时荧光定量 PCR

采用 TRIzol-氯仿法提取细菌总 RNA, 并逆转录成 cDNA 作为实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)模板。使用 SYBR Premix *Ex Taq* II (TaKaRa 公司)试剂, 在 CFX96 Touch Deep Well 实时荧光定量 PCR 系统 (Bio-Rad 公司)上检测目标基因(表 1)的相对表达水平。以 16S rRNA 基因作为内参, 反应体系

表1 荧光定量PCR引物

Table 1 The fluorescence quantitative primers of PCR

| Gene names | Sequences (5'→3') |
|--------------------|-----------------------|
| <i>ppsA</i> -F | GTGGTGGGTTGTGGTGATGC |
| <i>ppsA</i> -R | GGCGAAGTCGAACGCTCTGT |
| <i>AHA_1804</i> -F | GGGGAAGAGTTCAGCAAGCG |
| <i>AHA_1804</i> -R | CAGCCAGATGACGAGAGGCA |
| <i>AHA_3092</i> -F | CTGGTTTCCGTTTCGCAACAT |
| <i>AHA_3092</i> -R | TGCACCCGGCCATACATCTC |
| <i>AHA_2989</i> -F | CGCTGATCGCCAGAACAAC |
| <i>AHA_2989</i> -R | CGCCTCCTGCCTGAACATCT |
| <i>AHA_1647</i> -F | GGCGTCCCCGACTATTTGC |
| <i>AHA_1647</i> -R | AAAGCGTCCCCCTGCTCCT |
| <i>AHA_4253</i> -F | CCGTTTGCTGATTATTTTCC |
| <i>AHA_4253</i> -R | GAGTCGCAGTCGAGCTTGTT |
| <i>cysA</i> -F | TCGGGTGGTGCTGATGAACG |
| <i>cysA</i> -R | TGGGTAGCAGCGGGTGATG |
| <i>AHA_4258</i> -F | CGGCTGCTTTCTCTATGCTG |
| <i>AHA_4258</i> -R | GACCACCGAGTAGGTTTCCC |
| <i>AHA_0854</i> -F | CCCCACTTCTTGACAAAAG |
| <i>AHA_0854</i> -R | CTTCGTAGCCATCCATCTTC |

(25 μ L): 2 \times Phanta Max Mix (p515) 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。反应结束后, 对扩增曲线与溶解曲线进行质量评估。基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 并使用 TBtools (v2.109) 软件进行数据分析与可视化。

2 结果与分析

2.1 *ahc1A* 缺失菌株对嗜水气单胞菌抗生素耐药性的影响

将含有不同终浓度的恩诺沙星、诺氟沙星、卡那霉素和链霉素的液体 LB 培养基, 按 1% 的比例接种野生型菌株 (wild-type strain, WT) 和 Δ *ahc1A* 菌株, 于 30 $^{\circ}$ C 培养 3 h, 利用稀释点板法分别将上述培养好的 WT 和 Δ *ahc1A* 菌株进行 10 倍稀释, 并接种到普通 LB 平板上。结果如图 1 所示, 在正常液体 LB 培养基中培养 3 h 后, WT 和 Δ *ahc1A* 菌株在平板上的生长状况无

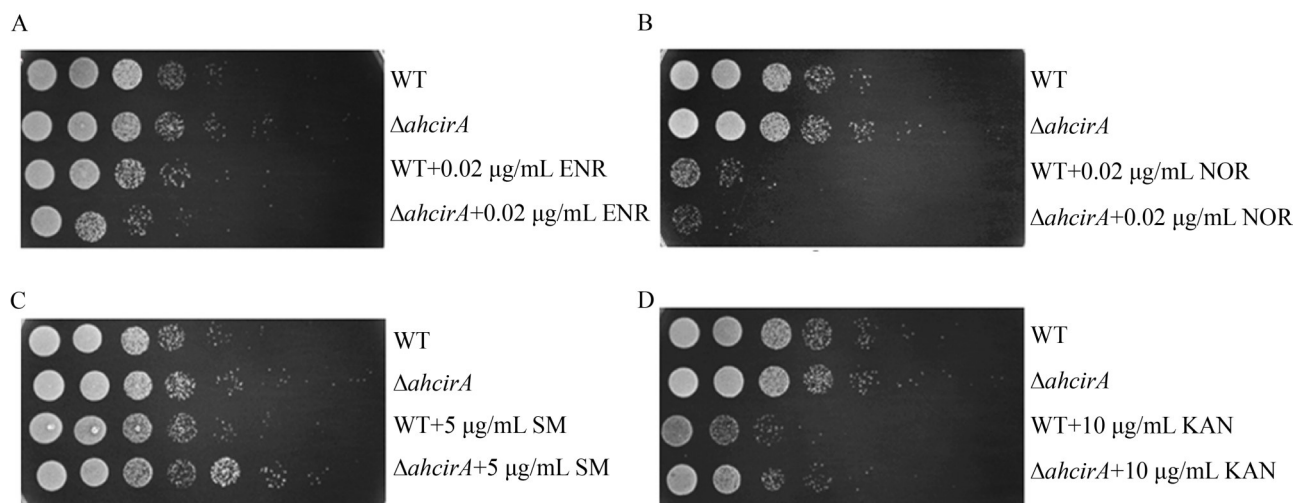
图1 野生菌和 Δ *ahc1A*菌株的抗生素敏感性测定结果

Figure 1 Antibiotics sensitivity assays of WT and Δ *ahc1A* strains. A–D: Show the spot assay results of WT and Δ *ahc1A* strains after 3 h of culture in media supplemented with the following antibiotics at the indicated final concentrations: 0.02 μ g/mL ENR, 0.02 μ g/mL NOR, 5 μ g/mL SM, and 10 μ g/mL KAN, respectively.

差异；在诺氟沙星培养基中培养 3 h 后， $\Delta ahcira$ 菌株的生长状况明显低于野生菌株，恩诺沙星抗性测定中也出现同样情况(图 1A、1B)，而在卡那霉素和链霉素培养基中培养 3 h 并稀释点板的结果则相反，缺失菌株的生长状况优于野生菌株，如图 1C、1D 所示。

2.2 $\Delta ahcira$ 菌株对 SM、KAN、ENR 和 NOR 的 MIC 值和生长曲线

根据 $\Delta ahcira$ 菌株在不同浓度的 SM、KAN、ENR 和 NOR 下的生长情况，测得其对 SM、KAN、ENR 和 NOR 的 MIC 值分别为 20、

3.12、0.031 2、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。依据测定的 MIC 值，利用生长曲线仪测定 $\Delta ahcira$ 菌株分别在 1/8、1/4、1/2 MIC 的 SM、KAN、ENR 和 NOR 条件下的生长曲线。如图 2A–2D 所示，当 SM、KAN、ENR 和 NOR 的浓度分别为 5、0.781 25、0.007 8、0.012 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，与未加抗生素处理的对照相比，加抗生素处理的 $\Delta ahcira$ 菌株的生长受到显著抑制。因此，本研究分别选择 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SM、0.781 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KAN、0.007 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ENR 和 0.012 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NOR 作为处理浓度进行后续研究。

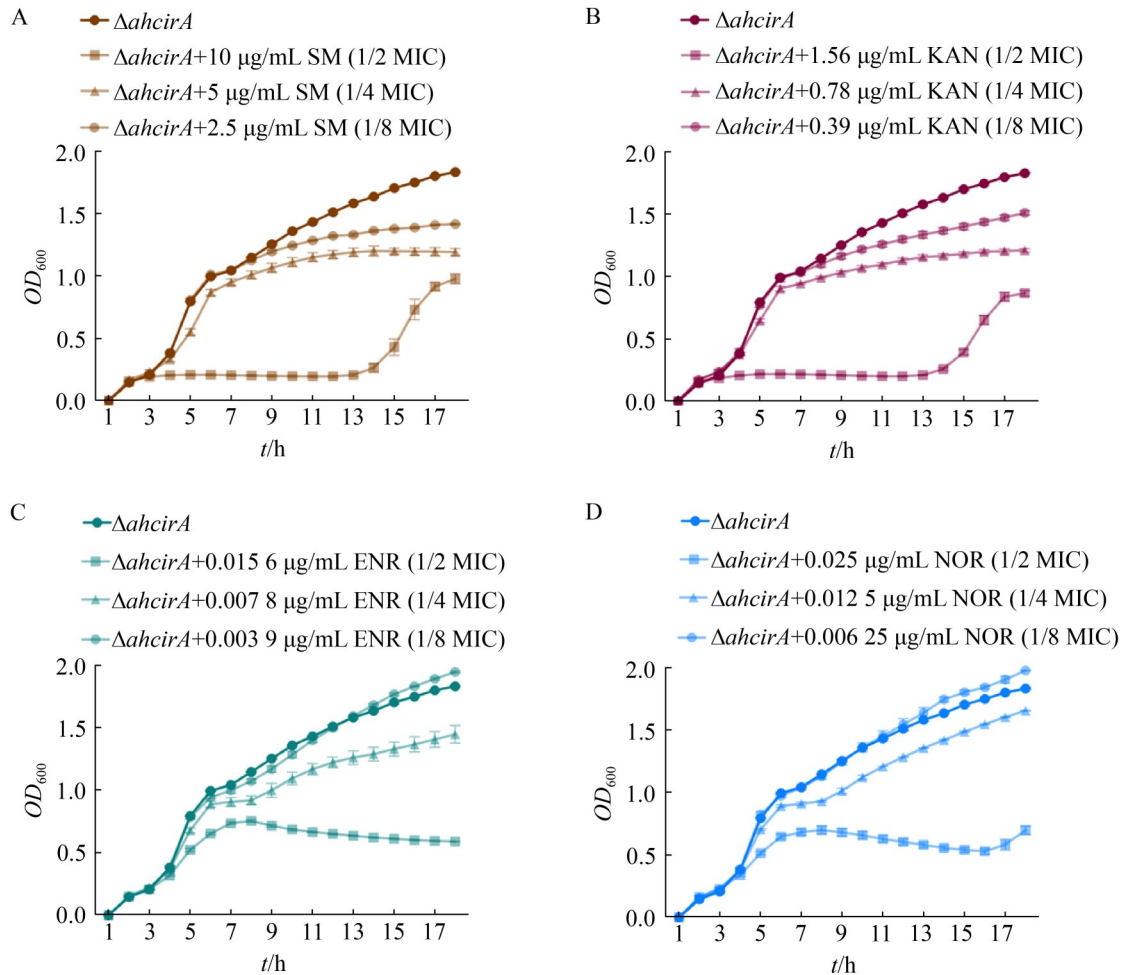


图2 不同浓度抗生素胁迫下 $\Delta ahcira$ 菌株的生长曲线

Figure 2 Growth curves of $\Delta ahcira$ under different concentrations of antibiotics stress. A–D represent SM, KAN, ENR, and NOR, respectively.

2.3 Δ ahc*irA* 在抗生素胁迫下的蛋白表达差异

为全面了解抗生素对 Δ ahc*irA* 菌株生理功能的影响, 本研究分别用 SM、KAN、ENR 和 NOR 处理 Δ ahc*irA* 菌株后进行蛋白质组学分析。通过 PCA 主成分分析(图 3A)结果显示, 同一处理组内的生物学重复紧密聚集, 表明实验具有良好的重复性。然而, 当将抗生素处理的缺失样本与 Δ ahc*irA* 进行比较时组间表现出更大的分离趋势, 且同一类抗生素的分散性相近, 表明同类型抗生素存在一定程度上的系统性差异。

此外, 密度图显示抗生素处理的缺失样本与 Δ ahc*irA* 菌株之间的蛋白质比率分布无显著差异(图 3B)。随后, 采用 P 值 <0.05 , 且变化倍数 >1.5 倍的标准来鉴定差异蛋白。与 Δ ahc*irA* 相比, Δ ahc*irA* 在 SM 处理下共鉴定出 522 个差异蛋白, 其中 209 个蛋白表达上调, 313 个蛋白表达下调; 同样, Δ ahc*irA* 在 KAN 处理下共鉴定出 678 个差异表达蛋白, 包括 251 个上调蛋白和 427 个下调蛋白; Δ ahc*irA* 在 ENR 处理下共鉴定出 480 个差异蛋白, 其中 125 个蛋白上调, 355 个蛋白下调; Δ ahc*irA* 在 NOR 处理下有 614 个

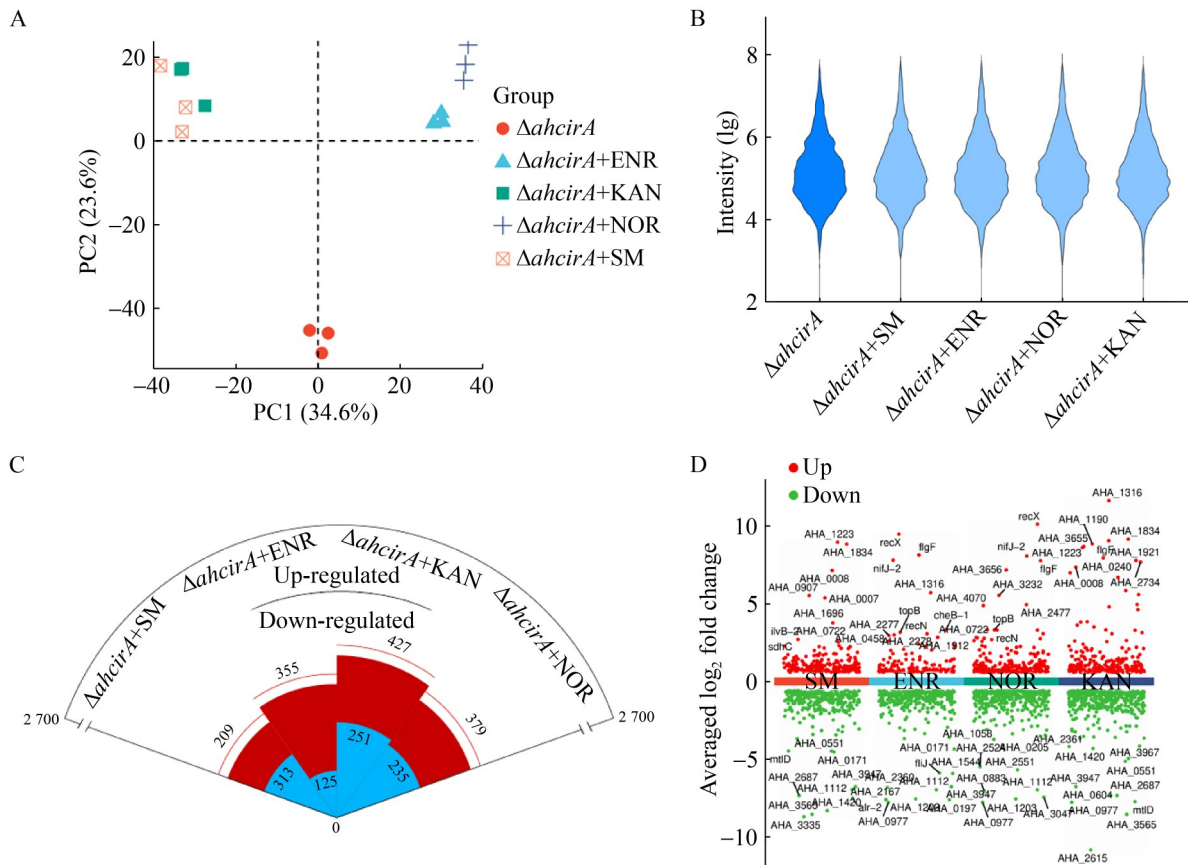


图3 定量蛋白质组学数据分析

Figure 3 Analysis of quantitative proteomics data. A: Principal component analysis (PCA) plot (Each color represents a distinct sample, with triplicate data points of the same color indicating three biological replicates); B: Density plot showing the distribution of protein expression ratios across different groups; C: Statistical summary of the number of DEPs in each group compared to the control; D: Distribution of differential proteins across groups.

差异蛋白, 包括 235 个上调蛋白和 379 个下调蛋白(图 3C)。此外, 通过火山图(图 3D)可以直观了解这些差异蛋白的分布情况。

2.4 差异表达蛋白的代谢途径分析

本研究通过 GO 富集分析了解抗生素胁迫下差异表达蛋白对代谢途径的富集情况。结果显示, 在被显著富集的前 10 个生物过程中, 卡那霉素和链霉素胁迫组中有 8 个是完全相同的生物过程, 分别是 α -氨基酸代谢过程、小分子代谢过程、蛋白质源性氨基酸代谢过程、氨基酸代谢过程、L-氨基酸代谢过程、氧酸代谢过程、有机酸代谢过程和羧酸代谢过程; 恩诺沙星和诺氟沙星胁迫组中有 6 个是完全相同的, 分别是氨基酸代谢过程、小分子代谢过程、细胞分解代谢过程、有机酸分解代谢过程、芳香氨基酸家族的分解代谢过程和小分子分解代谢过程。可见在相同类型抗生素胁迫下的差异表达蛋白所富集到的生物过程高度重合, 所富集到的分子功能也较为类似。此外, 在这些抗生素处理组中 DEPs 的生物过程富集程度最高的途径是小分子代谢过程, 其富集程度显著, P 值较低。同样, 在分子功能中小分子结合代谢途径也显示出大量富集的 DEPs (图 4)。总的来说, 抗生素胁迫下影响了 $\Delta ahcirA$ 菌株的生物功能和各种代谢途径。

2.5 差异表达蛋白分析

根据蛋白质组学结果比较处理组和对照组之间的差异蛋白。图 5 中的重叠图表明, KAN 和 NOR 处理下的差异蛋白数量最多。此外, 在不同抗生素胁迫下, 各组共同差异表达上调和下调的蛋白分别有 12 个和 126 个。这 12 个共同差异表达上调的蛋白分别是 SecD-2、RpoH、TrmA、AHA_0044、AHA_3652、AHA_4271、AHA_0458、TrpS-1、AHA_3005、AHA_0035、DeoD-2、Tpx, 这表明抗生素胁迫下的调控模块具有一定的相似模式。

2.6 耐药基因

本研究还将差异蛋白的氨基酸序列与 CARD 数据库进行比对, 以确定本研究中已知的抗性基因(antibiotic resistance gene, ARGs)蛋白。如图 6 所示, 共鉴定出 93 个 ARGs, 其中 30 个耐药基因为卡那霉素组和链霉素组所共有, 19 个耐药基因为恩诺沙星组和诺氟沙星组所共有, 而 6 个耐药基因为卡那霉素组、链霉素组、恩诺沙星组和诺氟沙星组所共有, 这 6 个耐药基因分别是 *ppsA* (phosphoenolpyruvate synthase)、*AHA_1804* (major facilitator family transporter)、*AHA_3092* (histidine kinase)、*AHA_1684* (histidine ABC transporter, ATP-binding protein)、*AHA_3291* (DNA-binding response regulator) 和 *AHA_3230* (glycerate dehydrogenase)。

2.7 qPCR 验证相关基因

为验证抗生素胁迫下 $\Delta ahcirA$ 菌株差异表达蛋白结果的准确性, 本研究在 4 种抗生素胁迫下的差异表达蛋白中随机各挑选 6 个耐药基因, 利用 qPCR 技术验证其表达量。结果如图 7 所示, 在卡那霉素或链霉素胁迫下, *AHA_1804*、*AHA_3092*、*ppsA* 均表达下调, *AHA_2989*、*AHA_1647*、*AHA_4253* 均表达上调(图 7A、7B); 在恩诺沙星或诺氟沙星胁迫下, *AHA_1804*、*AHA_3092*、*ppsA* 均表达下调, *cysA*、*AHA_4258*、*AHA_0854* 均表达上调(图 7C、7D), 转录结果与定量蛋白质组学数据基本一致。

3 讨论

AhCirA 蛋白是嗜水气单胞菌中重要的铁载体转运蛋白, 同时也是大肠杆菌素 I 的受体^[18-19]。先前研究发现作为外膜重要的通道蛋白, AhCirA 还是多功能蛋白, 对嗜水气单胞菌的铁摄取、生长繁殖、生物膜形成以及营养物质的跨外膜运输均具有显著影响^[16]。然而, AhCirA 是否直接参与嗜水气单胞菌的耐药机

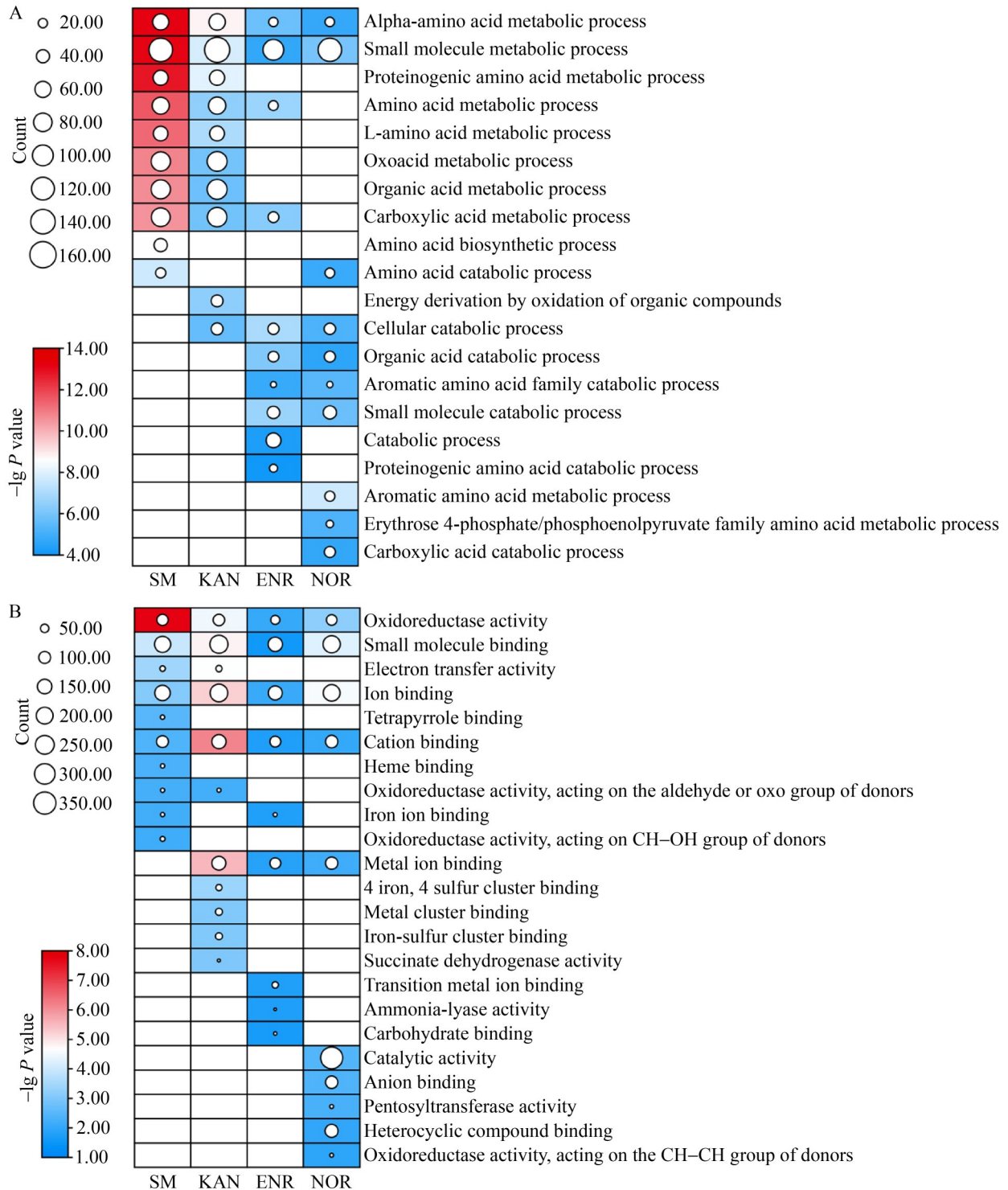


图4 GO富集分析

Figure 4 GO enrichment analysis. A: Biological processes; B: Molecular functions. The circles represent the number of differentially expressed proteins involved in the relevant pathways, and the colored squares indicate the $-\lg P$ value.

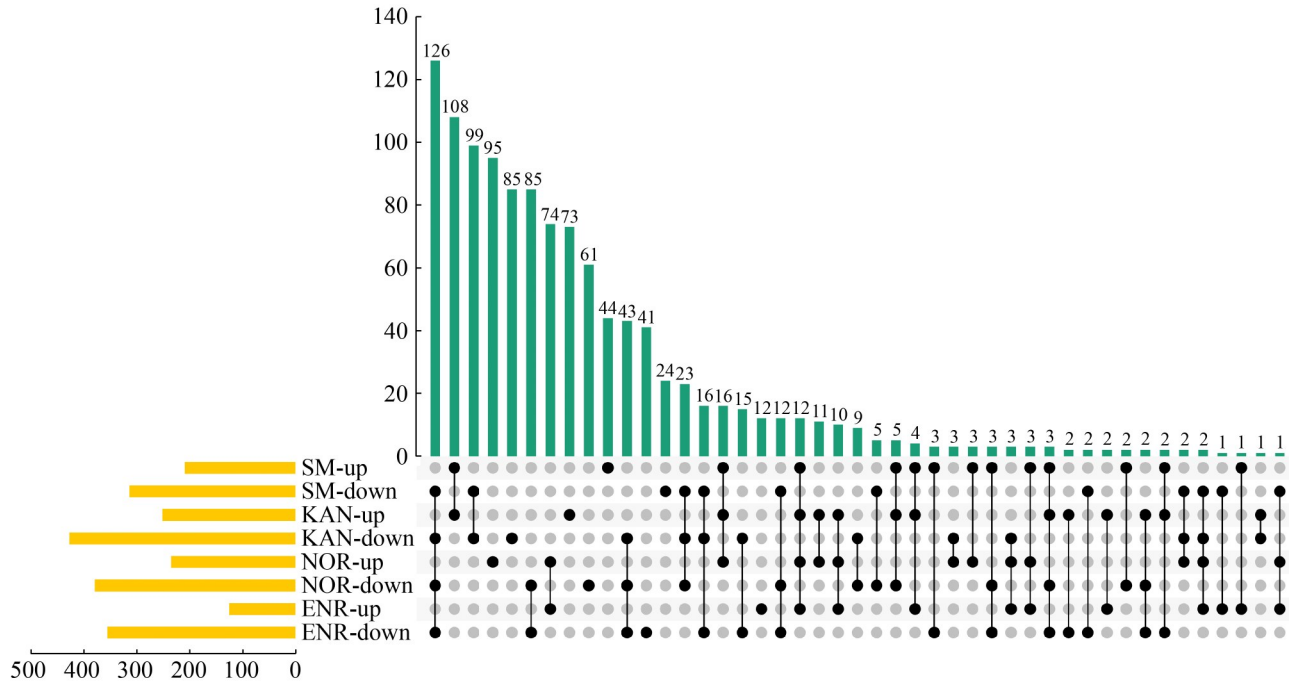


图5 Upset图表示不同组之间差异蛋白的重叠

Figure 5 The upset plot illustrating the overlap of differentially expressed proteins among different groups. Bottom yellow bars: Total differential proteins per comparison; Top green bars: Group intersections (Numbers show overlap count). Central matrix: Single points denote group-unique elements; Connecting lines indicate shared elements.

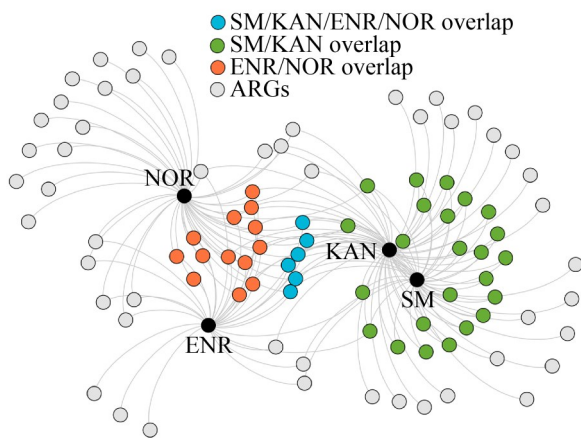


图6 耐药基因筛选

Figure 6 Screening of antibiotic resistance genes.

制，目前尚未有系统研究。本研究通过系统评估 $\Delta ahcira$ 缺失株在喹诺酮类(恩诺沙星、诺氟沙星)和氨基糖苷类(卡那霉素、链霉素)抗生素

胁迫下的表型变化及蛋白质组响应，初步揭示 AhCirA 在调控嗜水气单胞菌耐药性中的潜在作用。

研究结果显示， $\Delta ahcira$ 菌株对喹诺酮类抗生素的敏感性增强，而对氨基糖苷类抗生素的耐受性反而提高，表明 AhCirA 对不同类型抗生素的耐药性具有差异性调控作用。这一现象可能与 AhCirA 作为外膜蛋白对不同抗生素的渗透性调控有关。李永慧等^[20]在大肠杆菌中的研究也发现，*cirA* 基因缺失会导致菌株对多种抗生素的敏感性发生变化，提示 CirA 同源物在细菌耐药性中具有保守功能。

为进一步探究其分子机制，本研究采用定量蛋白质组学技术，并分析 $\Delta ahcira$ 菌株在 4 种抗生素胁迫下的蛋白表达谱。PCA 分析显示，同一类型抗生素处理下蛋白表达模式高度相似，

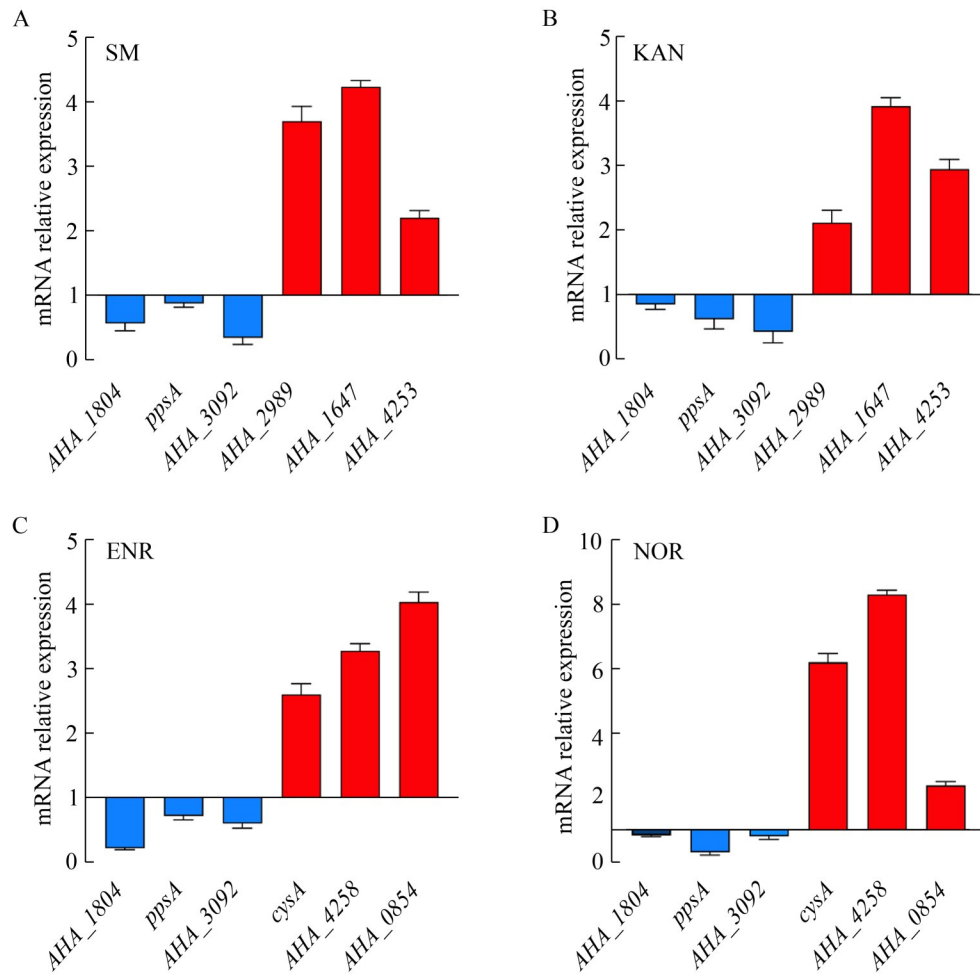


图7 qPCR验证 Δ ahcirA菌株在不同抗生素胁迫下的基因表达情况

Figure 7 qPCR verification results of differentially expressed genes of Δ ahcirA strains under different antibiotic stresses. A–D: Show the up- and down-regulation of six randomly selected drug-resistance genes under treatment with streptomycin, kanamycin, enrofloxacin, and norfloxacin, respectively.

说明 AhCirA 可能通过调控一组共同的代谢通路来影响细菌的耐药性。GO 富集分析进一步表明, 差异表达蛋白主要富集于小分子代谢过程、氨基酸代谢过程及相关分解代谢途径, 提示 AhCirA 缺失可能通过干扰细胞的基础代谢状态, 间接影响细菌对抗生素的应激反应。此外, 通过 CARD 数据库比对, 本研究共鉴定出 93 个与抗生素耐药性相关的基因, 其中多个基因在氨基糖苷类和喹诺酮类抗生素处理下共同表达。例如, *ppsA*、*AHA_1804*、*AHA_3092* 等 6 个基

因在 4 组处理中均出现差异表达, 值得注意的是, *AHA_1804* (主要易化子超家族转运蛋白) 作为一种多药外排泵, 在结核分枝杆菌等临床病原体的耐药性形成中起关键作用^[21]。上述结果表明, 这些共同响应的基因可能构成 AhCirA 调控嗜水气单胞菌耐药性的核心靶标群。qPCR 验证结果进一步证实了蛋白质组数据的可靠性, 表明 AhCirA 缺失确实影响了这些耐药相关基因的转录水平。

综上所述, AhCirA 可能通过调控外膜通透

性、代谢重编程以及耐药基因表达等多重机制影响嗜水气单胞菌对喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素的敏感性。本研究为深入解析 AhCirA 在细菌耐药性中的功能提供了新的实验依据和理论支持。同时需要指出, 本研究在抗生素种类覆盖上存在一定局限性, AhCirA 可能同样参与其他类别抗生素的耐药机制, 这将是未来研究的重要方向。

4 结论

本研究以嗜水气单胞菌 ATCC 7966 为研究对象, 系统分析 *ahcirA* 在喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素胁迫下的功能。研究发现 *ahcirA* 缺失显著增强菌株对恩诺沙星和诺氟沙星的敏感性, 但提高对卡那霉素和链霉素的耐受性, 说明 *ahcirA* 对不同类型抗生素的耐药性具有特异性调控作用。蛋白质组学分析显示, $\Delta ahcirA$ 菌株在抗生素胁迫下出现大量差异表达蛋白, 主要富集于小分子代谢、氨基酸代谢等生物过程, 提示 AhCirA 可能通过影响细胞代谢状态参与耐药调控。此外, 通过 CARD 数据库筛选及 qPCR 验证, 鉴定出多个共同响应不同类型抗生素的耐药基因, 如 *ppsA*、*AHA_1804*、*AHA_3092* 等, 这些基因可能构成 *ahcirA* 调控网络的核心组成部分。本研究从蛋白质组水平揭示了 AhCirA 在嗜水气单胞菌抗生素耐药性中的多重调控功能, 为理解外膜蛋白在细菌耐药机制中的作用提供了新视角, 也为后续开发针对嗜水气单胞菌的新型抗菌策略奠定了理论基础。

作者贡献声明

赵心锐: 实验设计与验证、数据整理、原稿撰写与修改; 谢于悦: 实验设计与验证、方法学、原稿撰写; 黄雅雯: 概念化、方法学、数据整理; 刘彦楷: 原稿撰写; 林向民: 概念化、监督、项目管理、稿件审阅与编辑。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 马世林, 李继红, 马倩倩, 吴志豪, 陈愿, 张永安, 周洋. 嗜水气单胞菌双组分系统 EnvZ/OmpR 功能探究[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(6): 161-167.
Ma SL, Li JH, Ma QQ, Wu ZH, Chen Y, Zhang YA, Zhou Y. Functional analysis of two component systems (TCS) EnvZ/OmpR in *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(6): 161-167 (in Chinese).
- [2] El-Gammal GA, Ali GIE, Saif AS, Elbaz S, Fadl SE, Abu-Zahra NIS. The immunomodulatory and antioxidative effects of curcumin-supplemented diets against the isolated *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2025, 157: 110077.
- [3] Miryala KR, Swain B. Advances and challenges in *Aeromonas hydrophila* vaccine development: immunological insights and future perspectives[J]. Vaccines, 2025, 13(2): 202.
- [4] Hoa DT, Duc VA, Ghi NH, Duong Le X, Anh DD. Fatal septic shock due to *Aeromonas hydrophila* in a cirrhotic patient; a case report[J]. Archives of Academic Emergency Medicine, 2024, 12(1): e37.
- [5] Choi U, Lee CR. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 953.
- [6] Golla VK, Prajapati JD, Kleinekathöfer U. Millisecond-long simulations of antibiotics transport through outer membrane channels[J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2021, 17(1): 549-559.
- [7] Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians[J]. Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology, 2017, 33(3): 300-305.
- [8] Liu ZQ, Zhang LS, Song QL, Song HH, Xu YQ, Lu JL, Xu QZ, Tang YZ, Liu YL, Wang GB, Lin XM. Quantitative proteomics reveal the inherent antibiotic resistance mechanism against norfloxacin resistance in *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Proteome Research, 2023, 22(4): 1193-1200.
- [9] Maurakis SA, O'Donnell AC, Botos I, Ghirlando R, Davies BW, Buchanan SK. Structural insights into Cir-mediated killing by the antimicrobial protein microcin V[J]. Communications Biology, 2025, 8: 1449.
- [10] Zhang ZQ, Du WN, Wang M, Li YH, Su SQ, Wu TL, Kang YH, Shan XF, Shi QM, Zhu GQ. Contribution of the colicin receptor CirA to biofilm formation, antibiotic resistance, and pathogenicity of *Salmonella enteritidis*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(1): 72-81.
- [11] Kang A, Tan MH, Ling H, Chang MW. Systems-level

- characterization and engineering of oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* under anaerobic conditions[J]. *Molecular BioSystems*, 2013, 9(2): 285-295.
- [12] Zhang LS, Chen XM, Wang GB, Yao JD, Wei J, Liu Z, Lin XM, Liu YL. Quantitative proteomics reveals the antibiotics adaptation mechanism of *Aeromonas hydrophila* under kanamycin stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2022, 264: 104621.
- [13] Zhang S, Yang WX, Xie YY, Zhao XR, Chen HY, Zhang LS, Lin XM. Quantitative proteomics investigating the intrinsic adaptation mechanism of *Aeromonas hydrophila* to streptomycin[J]. *Proteomics*, 2024, 24(19): e2300383.
- [14] Khondker A, Bider RC, Passos-Gastaldo I, Wright GD, Rheinstädter MC. Membrane interactions of non-membrane targeting antibiotics: the case of aminoglycosides, macrolides, and fluoroquinolones[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2021, 1863(1): 183448.
- [15] Li ZQ, Wang YQ, Li XY, Lin ZP, Lin YX, Srinivasan R, Lin XM. The characteristics of antibiotic resistance and phenotypes in 29 outer-membrane protein mutant strains in *Aeromonas hydrophila*[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(12): 4614-4628.
- [16] Song QL, Zhang LS, Wang GB, Song HH, Zhang S, Yao JD, Lin XM. Proteomics analysis reveals that CirA in *Aeromonas hydrophila* is involved in nutrient uptake[J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25(5): 977-989.
- [17] Chen CJ, Wu Y, Li JW, Wang X, Zeng ZH, Xu J, Liu YL, Feng JT, Chen H, He YH, Xia R. TBtools-II: a “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [18] Jakes KS, Finkelstein A. The colicin Ia receptor, Cir, is also the translocator for colicin Ia[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(3): 567-578.
- [19] Lan P, Lu Y, Jiang Y, Wu XQ, Yu YS, Zhou JC. Catecholate siderophore receptor CirA impacts cefiderocol susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2022, 60(4): 106646.
- [20] 李永慧, 苏硕青, 杨楠, 吴同垒, 孔庆山, 赵飞, 张志强. 大肠杆菌 *cirA* 基因缺失对耐药性影响[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(5): 420-423.
Li YH, Su SQ, Yang N, Wu TL, Kong QS, Zhao F, Zhang ZQ. Antibiotic resistance effect of *cirA* gene knock-out in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2018, 34(5): 420-423 (in Chinese).
- [21] Li P, Gu YZ, Li J, Xie LX, Li X, Xie JP. *Mycobacterium tuberculosis* major facilitator superfamily transporters[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2017, 250(6): 573-585.