

双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌毒性的分子机制

吴 双,秦华明*,叶锦韶 (暨南大学环境学院,广东省环境污染控制与修复材料工程技术研究中心,广州市环境暴露与健康重点实验室,广州 广东 510632)

摘要: 为研究双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌毒性的分子机制,使用基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学技术为主要的研究方法,通过精确定量苏云金芽孢杆菌蛋白质含量并进行差异分析.本研究结果表明,双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌的生长具有明显的抑制作用.分析得到了 17 个差异表达蛋白,其中有 5 个上调蛋白,主要参与脂肪酸生物合成、DNA 和 RNA 的合成,12 个下调蛋白,涉及氧化磷酸化、丙酮酸代谢、糖酵解途径、磷酸戊糖途径和氨基酸代谢等.功能分析显示,双氯芬酸钠通过影响细胞代谢过程、细胞组成和蛋白质催化等方式抑制苏云金芽孢杆菌生长.在差异表达蛋白相互作用网络中,RpoA、RplM、RplL、Tuf、InfA 5 个蛋白连接度较高,属于网络中的关键节点,可能起着重要的调控作用.研究结果表明双氯芬酸钠的处理影响了苏云金芽孢杆菌多条代谢途径,干扰不同的生物过程,揭示了双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌毒性的分子机制,为深入评价双氯芬酸钠对生态安全及人类健康的影响提供了重要的参考意义.

关键词: 双氯芬酸钠; 苏云金芽孢杆菌; 差异表达蛋白; 毒性; 分子机制

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2017)12-4763-08

Molecular mechanism of diclofenac sodium on the toxicity of *Bacillus thuringiensis*. WU Shuang, QIN Hua-ming*, YE Jin-shao (Key Laboratory of Environmental Exposure and Health of Guangzhou, Guangdong Provincial Research Center for Environment Pollution Control and Remediation Materials, School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China). *China Environmental Science*, 2017,37(12): 4763~4770

Abstract: To investigate the molecular toxicity of diclofenac sodium to *Bacillus thuringiensis*, the iTRAQ quantitative proteomics technique was used to identify and quantify the protein expression of this species. The results showed that diclofenac sodium had a significant inhibitory effect on the growth of *B. thuringiensis*. Seventeen proteins were differentially expressed. Among these proteins, 5 up-regulated ones were mainly involved in fatty acid biosynthesis, DNA and RNA synthesis, while 12 down-regulated proteins were primarily associated with oxidative phosphorylation, pyruvate metabolism, glycolytic pathway, pentose phosphate pathway and amino acid metabolism. Functional analysis revealed that diclofenac inhibited the growth of *B. thuringiensis* by affecting cell metabolism, cellular composition and protein catalysis. In the interaction network of differentially expressed proteins, RpoA, RplM, RplL, Tuf, InfA were the key nodes in the network interacting closely for cellular regulation. The results indicated that diclofenac sodium could affect multiple metabolic pathways and interfere with different biological processes. These findings revealed the molecular toxicity of diclofenac sodium, and provided important references for the further evaluation of diclofenac sodium on the ecological security and human health.

Key words: diclofenac sodium; *Bacillus thuringiensis*; differential expressed protein; toxic; molecular mechanism

非甾体抗炎药(NSAIDs)在全世界得到广泛的应用,但也是一类日益受到人们关注的新兴污染物,由其引起的环境污染问题受到越来越多的关注^[1].其中双氯芬酸(DCF)通常被公认为“世界上最受欢迎的止痛药”,是最常用的NSAIDs,主要以钠盐的形式存在,全球消费量已达上千吨^[2-3]. DCF 是一种持久性有毒污染物^[4],具有很强的环

境污染性,欧盟早在 2000 年就将 DCF 列为环境中优先控制的污染物^[5],它们可以通过多种途径进入环境,对水生生物造成严重的毒害作用^[6],并且通过食物链的富集会对其他生物和人体健康

收稿日期: 2017-05-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21577049)

* 责任作者, 副教授, huamingqin@163.com

造成重大威胁,有研究表明,DCF 对生物体产生毒性^[7-10],诱导小鼠肾细胞凋亡^[11],上调促炎细胞因子,并诱导肾组织中 NF- κ B 的活化^[12].有研究表明由于线粒体功能障碍导致的 ATP 合成损伤可能是 DCF 引起肝细胞毒性的关键原因^[13-15].由于双氯芬酸钠的用量大而降解效率低^[16-17],其残留物进入环境后对环境生态和人体健康存在风险,但目前对双氯芬酸钠毒理性质并未十分明确,尚无将 iTRAQ 技术应用于双氯芬酸的抑菌机理的研究报道,尚需进行更深入的研究.为此,本文选用模式微生物菌种革兰氏阳性菌苏云金芽胞杆菌为研究对象,基于 iTRAQ 的定量蛋白质组学技术^[18],检测鉴定了苏云金芽胞杆菌在双氯芬酸钠胁迫下差异表达的蛋白质,并对其进行了生物信息学分析,以期揭示双氯芬酸钠对苏云金芽胞杆菌细胞毒性的分子机制.本研究对于深入评价双氯芬酸钠对生态安全及人类健康的影响具有参考意义.

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

*B.thuringiensis*GIMCC1.817 为本实验室所有,储存在中国广东省微生物所.双氯芬酸钠购自 Sigma Aldrich(St.Louis, MO, USA).牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3g/L、蛋白胨 10g/L、NaCl 5g/L.无机盐体系(MSM): $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 4g/L、 KH_2PO_4 2g/L、 $(NH_4)_2SO_4$ 20g/L、KCl 2g/L、 $MgSO_4$ 1g/L.

1.2 菌体培养

将保存在斜面上的苏云金芽胞杆菌接种到 100mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中,置于 30℃、100r/min 的摇床中震荡培养 24h.随后,3500r/min 离心 10min,然后用磷酸盐缓冲溶液洗涤细胞 3 次.

1.3 生长抑制曲线的测定

将 1 μ mol/ μ L 的双氯芬酸钠溶液 20 μ L 和浓度为 1g/L 的苏云金芽胞杆菌加入装有 20mL 无机盐培养体系的 50mL 锥形瓶中,置于 30℃、100r/min 的摇床中震荡培养.以不使用双氯芬酸钠溶液的培养体系(其他条件不变)作为对照组.分别在培养 4,8,12,24,36,48,60,72,80h 时用酶标

仪于波长 600nm 处测定 OD 值并绘制生长曲线.

1.4 蛋白质提取

同生长抑制曲线测定培养条件,在双氯芬酸钠处理后,24h 后 3500r/min 离心 10min 并用磷酸盐缓冲溶液洗涤菌体 3 次进行全蛋白提取:将菌体悬浮在 1mL 裂解液中,裂解液配方为 15mmol/L Tris-HCl pH7.4、7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、4%CHAPS,使用前加 2mmol/L IPG 缓冲液,1mmol/L DTT 和 1mmol/L PMSF 混合物,冰上放置,每隔 2min 涡旋 10s.样品在液氮中冻融 3 次,每次 15min,然后超声破碎 20min,超声破碎后的样品加 1 μ L 核酸酶冰上放置 30min.4℃, 12000r/min 离心 30min,取上清为总蛋白,使用 Bradford 方法测量蛋白质的浓度^[19].

1.5 蛋白质还原和酶解

用 10mol/L DTT 或 2 μ L 还原剂将每个样品的蛋白质在 37℃ 下还原 1h.用 1 μ L 半胱氨酸锁定剂将半胱氨酸在室温下封闭 10min.将蛋白质样品加入 10KD(Amicon Ultra-0.5)超滤离心管中,用 100 μ L 溶解缓冲液洗涤,12000r/min 离心 20min,重复 3 次.除去收集管中的液体后,37℃ 下用 50 μ L 胰蛋白酶(Promega, V5280, USA)将过滤管中的样品酶解 14h 过夜.随后,12000r/min 离心 20min,将 1 μ g 胰蛋白酶加入到过滤管中二次酶解 2h.离心后,收集管中的液体,使用 Bradford 方法测定肽段的浓度^[20].

1.6 iTRAQ 标记和脱盐

根据制造商的说明书,用 iTRAQ reagent 多重试剂盒(Sigma, PN 4352135, USA)标记肽段.将 150 μ L 的乙醇加入到 116 和 117iTRAQ 试剂中,然后涡旋并用迷你离心机将溶液离心至管底.将肽段转移到新管后,用 116 的 iTRAQ 试剂标记对照组肽段,117 的 iTRAQ 试剂标记处理组肽段,2h 后向每个样品中加入 100 μ L 的水以终止反应.将 1 μ L 溶液通过 ABI 4800MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA)以检测标记效率.随后,将标记的样品与 Strata-X (Phenomenex, USA)混合,涡旋,脱盐,并通过强阳离子交换层析(SCX)分离,标记的肽段在真空浓缩仪中冷冻干燥.

1.7 蛋白质的 LC-ESI-MS/MS 分析

用溶液(2%乙腈,0.1%甲酸)复溶样品,12000r/min 离心 20min,使用 NanosprayIII 源(AB SCIEX)装有 AB SciexTripleTOF 5600 质谱仪(AB SCIEX,Framingham,MA,USA)检测,质谱检测方式为 MS/MS 扫描.将鉴定的蛋白质在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm>)进行内部 BLAST 检索匹配.使用 ProteinPilot TM Software 4.5(AB SCIEX)进行 Uniprot Database 中的蛋白质鉴定和相对 iTRAQ 定量.对于 iTRAQ 定量,通过 Pro GroupTM 算法自动选择肽段,计算报告峰面积,误差因子和 *P* 值.采用反向数据库搜索来估计肽段蛋白质阳性结果错误率 FDR.使用不低于 95%的肽段置信水平,变化倍数 1.2 倍以上作为鉴定标准,认为二者之间差异具有统计学意义.

1.8 生物信息学分析

将所得到的蛋白质通过蛋白质资源数据库(UniProt)(<http://www.uniprot.org/>)得到基因列表,利用 PANTHER 分类数据库(<http://www.pantherdb>)对变化倍数 1.2 倍以上的差异表达蛋白质进行 GO 分析(用于注释鉴定的蛋白质的生物过程,分子功能和细胞组分信息).通过 STRING(<http://www.string-db.org/>)构建差异表达蛋白质的相互作用网络,使用 KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/pathway>)对鉴定到的差异蛋白质进行匹配,挖掘由差异蛋白质表达变化导致发生改变的重要代谢信号通路($P < 0.05$,即显著富集)^[21].

2 结果与讨论

2.1 双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌生长和繁殖的影响

如图 1 所示,由生长抑制曲线,处理组的 OD 值从 4h 后持续比对照组 OD 值低,48h 内对照组 OD 值较稳定,而处理组 OD 值一直处于下降趋势.可以看出双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌的生长和繁殖具有明显的抑制作用.

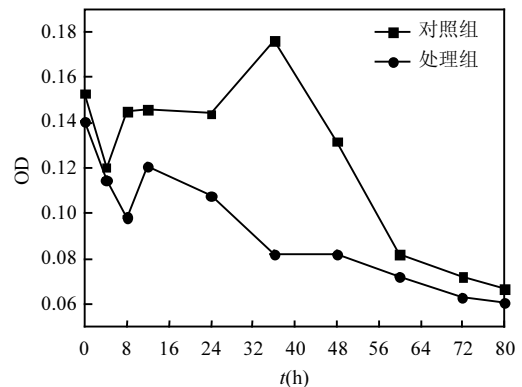


图 1 双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌的生长抑制
Fig.1 Inhibition of the growth of *Bacillus thuringiensis* by diclofenac sodium

2.2 蛋白质的鉴定

使用串联质谱(MS/MS)对苏云金芽孢杆菌总蛋白进行检测,并用 Mascot 软件共鉴定差异倍数大于 1.2、*P* 值小于 0.05 的差异蛋白质有 17 种,其中表达上调的蛋白质 5 种,表达下调的蛋白质 12 种.这些蛋白质的详细信息列见表 1.

表 1 双氯芬酸钠胁迫下苏云金芽孢杆菌差异表达蛋白

Table 1 Differential expressed proteins in *Bacillus thuringiensis* with diclofenac sodium treatment

表达情况	登录号	基因名称	蛋白名称	变异系数	肽段数(95%)	倍数
上调	Q32176	fadE	酰基辅酶 A 脱氢酶	20.2	2	1.3305
	Q81L15	infC	翻译起始因子 IF-3	25.8	1	1.2589
	Q81JY	upp	尿嘧啶磷酸核糖基转移酶	33	1	1.2474
	Q817Z6	greA	转录延伸因子 GreA	47.5	1	1.2134
	P37875	spoVR	第五阶段孢子形成蛋白	31.2	3	1.2023
下调	Q81VP9	rplM	50S 核糖体蛋白 L13	35.2	2	0.8166
	Q81JZ2	atpH	ATP 合成酶亚基 delta	28.9	1	0.787
	Q81KU5	nadK2	NAD 激酶 2	12	1	0.7727
	Q81VQ4	rpoA	RNA 聚合酶亚基 alpha	29.6	1	0.7516

续表 1

表达情况	登录号	基因名称	蛋白名称	变异系数	肽段数(95%)	倍数
下调	A7GT52	mtnN	5'-甲硫基腺苷/S-腺苷同位半胱氨酸核苷酸酶	16	1	0.7178
	Q81VZ0	prs	核糖磷酸焦磷酸激酶	27.4	1	0.6918
	Q81VT2	tuf	伸长因子 Tu	63.5	22	0.6855
	Q81VU0	rplL	50S 核糖体亚基 L7/L12	67.2	3	0.6486
	P24137	oppF	寡肽转运 ATP 结合蛋白 OppF	21.3	2	0.6081
	A9VT67	hslU	ATP 依赖性蛋白酶 ATP 酶亚基 HslU	45.8	7	0.4699
	Q4MTG	pdhA	丙酮酸脱氢酶 E1 组分亚单位 α	32.1	3	0.4325
	Q81VQ7	infA	翻译起始因子 IF-1	54.2	1	0.3499

2.3 蛋白质 GO 功能注释

通过蛋白质 GO 分析(图 2)可以看出,得到的 17 种蛋白质中对应到生物过程,其中 10 种蛋白参与代谢过程,占 58.82%,其次有 5 种蛋白参与细胞过程,占 29.41%,主要涉及到酰基辅酶 A 脱氢酶、尿嘧啶磷酸核糖基转移酶、核糖体蛋白、转运 ATP 结合蛋白.细胞组分类以细胞部分和细胞器为主,

分别占 62.5%和 25%,其中细胞部分主要包括翻译延伸因子、核苷酸激酶、磷酸核糖基转移酶.有 16 种差异蛋白对应分子功能,涉及结合(如酰基辅酶 A 脱氢酶、5'-甲基硫代腺苷/S-腺苷高半胱氨酸核苷酸酶、50S 核糖体蛋白)、催化活性(如寡肽转运 ATP 结合蛋白、核苷酸激酶、丙酮酸脱氢酶)、结构分子活性、翻译调节器活动和转运蛋白活性.

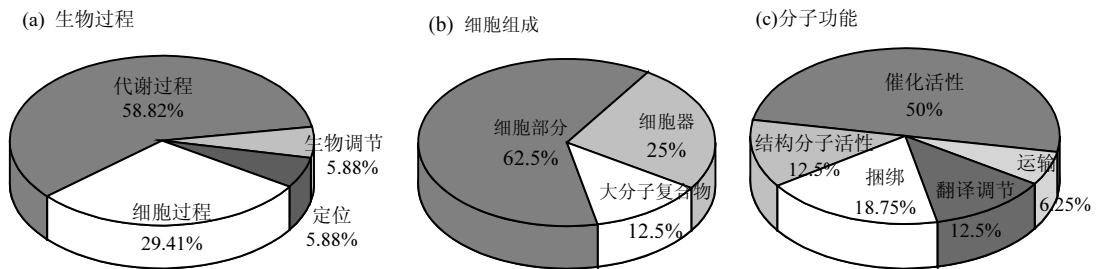


图 2 差异表达蛋白的 GO 分析

Fig.2 Protein GO analysis of *Bacillus thuringiensis* under diclofenac sodium stress

2.4 KEGG 代谢通路分析

使用 KEGG pathway 对差异表达蛋白质可能参与的信号通路进行分析发现,差异表达的蛋白质参与的代谢通路中,其中上调蛋白,Upp 涉及 DNA 和 RNA 的合成,核糖体蛋白 RplM 和 RplL 参与蛋白质的合成;下调蛋白,Prs、MtnN 和 PdhA 分别参与磷酸戊糖途径、甲硫氨酸代谢和丙酮酸代谢,RpoA 参与 DNA 和 RNA 的合成(图 3),AtpH 和 OppF 分别参与氧化磷酸化和群体感应.总体来看,差异蛋白质主要参与的代谢通路包含细胞核酸代谢、胞内蛋白质合成和能量代谢,这与 GO 功能注释结果类似,研究证实,双氯芬酸钠胁迫主要在细胞核心代谢网络

能量代谢中抑制 ATP 合成,蛋白质合成中在转录水平对功能蛋白质的合成造成了障碍,造成了有氧代谢受阻,直接影响到乙酰辅酶 A 的形成,继而影响三羧酸循环和随之的能量代谢,随之影响细胞中绝大部分的代谢活动,从而使细胞生长表现出受抑制.

2.5 差异表达蛋白质相互作用网络及其功能

通过 STRING 系统构建差异表达蛋白质的相互作用网络图(图 4),包含 10 个存在密切关系的相互作用蛋白质网络和位于整个网络周边的 7 个离散蛋白质.该蛋白质的相互作用网络以 RpoA、RplM、RplL、Tuf、InfA 5 个蛋白连接度较高,属于网络中的关键节点.

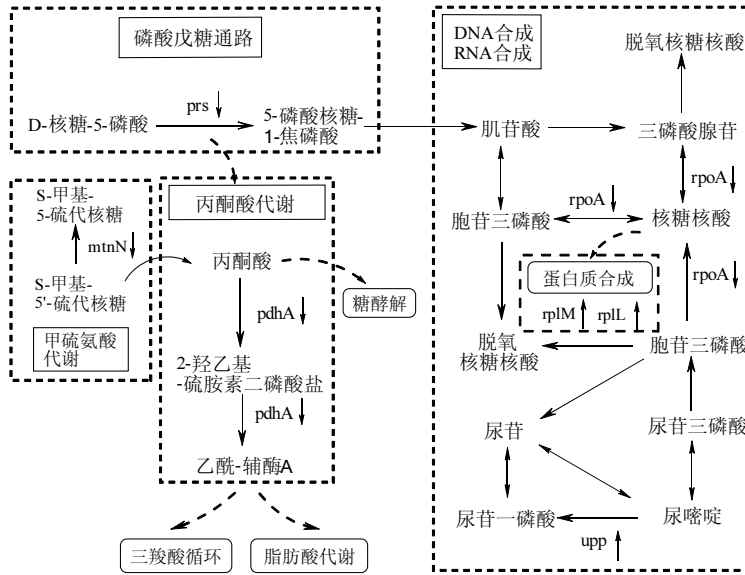


图 3 差异蛋白质代谢通路

Fig.3 Analysis of differential protein metabolism pathway

↑:表示上调蛋白, ↓:表示下调蛋白

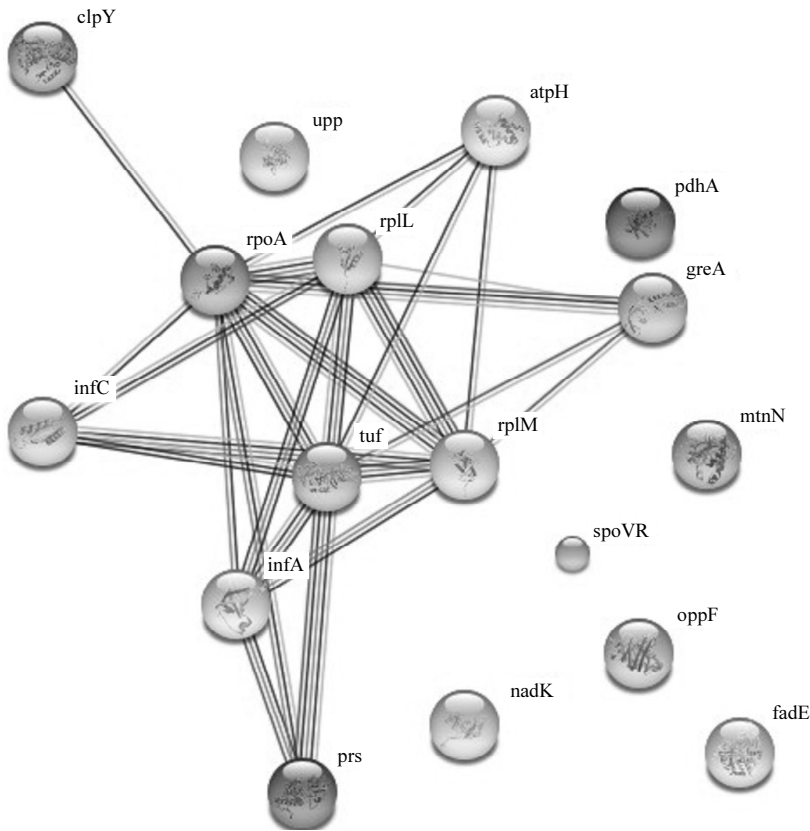


图 4 差异表达蛋白的相互作用网络

Fig.4 Interaction between differentially expressed proteins

在这个网络中,节点是蛋白质,线代表蛋白质之间的功能关联

芽孢杆菌的一个重要特性是能够产生对不利条件具有特殊抵抗力的芽孢,而在营养丰富的环境中又能够重新萌发成营养细胞.SpoVR 是芽孢形成过程中的关键酶^[22-23],参与芽孢皮质的形成^[24].此外,微生物在胁迫耐受中生物膜的形成会显著加强^[25-26],5'-甲硫基腺苷/S-腺苷高半胱氨酸核苷酶(MtnN)间接减少生物膜的形成^[27].本研究中,芽孢形成蛋白 SpoVR 上调,说明双氯芬酸钠可能诱导了苏云金芽孢杆菌的芽孢形成以抵抗不利环境.同时,菌体细胞通过下调 MtnN 加强了苏云金芽孢杆菌生物膜的形成,以此来降低双氯芬酸钠对菌体细胞的毒性.

在细胞核酸代谢中,核糖磷酸焦磷酸激酶(Prs)可将 ATP 和核糖 5 磷酸 R5P 催化转化为 AMP 和磷酸核糖焦磷酸(PRPP),PRPP 是众多生化反应的共同底物,作为关键的节点代谢物,对于嘌呤、嘧啶和吡啶核苷酸的合成具有重要意义^[28-30].在嘧啶的合成途径中,PRPP 是尿苷一磷酸合成酶 UMPS 的重要辅因子.PRPP 也为合成吡啶核苷酸 NAD⁺和 NADP⁺提供了核苷部分.除此之外,PRPP 也在嘌呤的补救合成途径中确保了嘌呤碱基和核苷的有效重新利用,该补救途径合成 PRPP 仅需 1mol ATP,而从头合成 1mol 核苷酸需消耗 7mol ATP^[31].本研究中,双氯芬酸钠处理后,细胞中 Prs 的下调不仅对正常的 DNA 及 RNA 的合成代谢造成了负面影响,也可能对能量代谢产生影响.

在细胞内蛋白质合成过程中,核糖体蛋白质在蛋白质合成中起关键作用,包括催化肽键形成活性,提供 G 蛋白因子的结合位点(辅助起始、延伸和终止),帮助合成后的蛋白质正确折叠等^[32-33].RNA 聚合酶亚基 α (RpoA)是 RNA 聚合酶在细菌中高度保守并且是基因转录中的关键酶,它有助于稳定转录复合物,启动子识别,并调节启动基因转录.抑制 RpoA 会导致 RNA 聚合酶复合物不稳定,从而会直接干扰 mRNA 的形成^[34-35].除此之外,核糖体蛋白 RplM 和 RplL 也参与蛋白质的合成.本研究中,菌体细胞中 RpoA、RplM 和 RplL 均表现出下调,说明双氯芬酸钠胁迫在转录水平对功能蛋白质的合成造成了障碍.

三羧酸循环是生物细胞最重要的基础代谢过程之一.细胞丙酮酸脱氢酶(PDH)复合体(PdhA、PdhB、PdhC、PdhD)的 E1 组分亚单位 α (PdhA)将糖酵解/葡萄糖醛酸代谢与三羧酸循环连接,其功能是产生乙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 不仅参与各种生物合成途径,如氨基酸、脂肪酸、聚酮化合物,并作为生长信号起到关键作用^[36],还可以帮助细胞在三羧酸循环中产生 NAD⁺/NAD,作为细胞生长和营养供给的信号^[37].PdhA 是催化丙酮酸氧化脱羧反应的起始酶,在整个氧化脱羧反应过程中,其所催化的反应是唯一的不可逆步骤.PdhA 的下调,使得苏云金芽孢杆菌的有氧代谢受阻,直接影响到乙酰辅酶 A 的形成,继而影响三羧酸循环和随之的能量代谢^[34],随之影响细胞中绝大部分的代谢活动,从而使细胞生长表现出受抑制.

生物细胞的能量代谢是整个代谢网络的核心,在有氧呼吸中,能量代谢主要产生过程是三羧酸循环释放出的电子经过电子传递链而产生.NadK(NAD⁺激酶)催化 NAD⁺进行磷酸化反应生成 NADP⁺,在这个过程中与 ATP 的生成相偶联,在细胞能量代谢中扮演关键角色.FadE 是酰基辅酶 A 脱氢酶(ACAD)的一种,酰基辅酶 A 脱氢酶是含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的酶家族,黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)作为辅因子,催化酰基辅酶 A 在脂肪酸和一些氨基酸分解代谢第一步中关键的酶^[38],ACAD 将电子从其相应的辅酶 A 酯底物转移到电子转运蛋白(ETF),伴随 ATP 的生成^[39].无论是 NAD 还是 FAD 介导的电子传递,最终 ATP 的生成需 ATP 合成酶的催化才能完成,而 FOF1-ATP 合成酶是与 ATP 合成相关的主要膜蛋白复合物,其中 AtpH(ATP 合成酶亚基 delta)是 FOF1-ATP 合成酶中 F1 的主要组成部分^[40],AtpH 下调直接影响到 ATP 的合成.有文献报道^[11-13]真核细胞中,ATP 合成损伤可能是双氯芬酸钠引起肝细胞毒性的关键原因.在本研究中,也观察到与 ATP 合成直接相关的 AtpH 及间接相关的 NadK、PdhA 均下调表达,说明双氯芬酸钠也抑制苏云金芽孢杆菌的 ATP 合成.但同时也发现,FadE 作为与 ATP 合成相关蛋白,却表现出上

调,意味着双氯芬酸钠对苏云金芽孢杆菌甚至对原核生物的 ATP 代谢的影响是非常复杂的,需要进一步深入研究.另外,在能量合成受损的情况下,催化反应需消耗 ATP 的 Prs 也相应下调,使得菌体细胞嘌呤、嘧啶和吡啶核苷酸合成代谢所需的 PRPP 转向消耗更少能量的补救途径进行,以适应受胁迫的环境.

3 结论

3.1 在双氯芬酸钠的处理下,苏云金芽孢杆菌的生长受到明显抑制.

3.2 蛋白质组分析共检测到 108 个蛋白,其中有 17 个差异表达蛋白,包括 5 个上调蛋白和 12 个下调蛋白,主要涉及到脂肪酸生物合成、DNA 和 RNA 的合成、氧化磷酸化、丙酮酸代谢、糖酵解途径、磷酸戊糖途径和氨基酸代谢等代谢通路.

3.3 差异表达蛋白相互作用网络中,RpoA、RplM、RplL、Tuf、InfA 5 个蛋白连接度较高,属于网络中的关键节点,可能起着重要的调控作用.

参考文献:

- [1] Ji K, Liu X, Lee S, et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013,254:242-251.
- [2] Acuna V, Ginebreda A, Mor J R, et al. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: diclofenac as an example [J]. *Environment International*, 2015,85:327-333.
- [3] 史 瑞,张付申.碱催化水热氧化法处理废弃双氯芬酸钠类药物 [J]. *中国环境科学*, 2017,37(4):1386-1393.
- [4] Yu H, Nie E, Xu J, et al. Degradation of diclofenac by advanced oxidation and reduction processes: kinetic studies, degradation pathways and toxicity assessments [J]. *Water Research*, 2013, 47(5):1909-1918.
- [5] Lepper P. Manual on the methodological framework to derive environmental quality standards for priority substances in accordance with Article 16of the Water Framework Directive (2000/60/EC) [C]//Schmallenberg, Germany: Fraunhofer-Institute Molecular Biology and Applied Ecology, 2005.
- [6] 王 月,熊振湖,周建国.杯[4]芳烃修饰 Amberlite XAD-4 树脂去除水中双氯芬酸 [J]. *中国环境科学*, 2012,32(1):81-88.
- [7] Oaks J L, Gilbert M, Virani M Z, et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan [J]. *Nature*, 2004,427(6975):630-633.
- [8] Triebkorn R, Casper H, Heyd A, et al. Toxic effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004,68(2): 151-166.
- [9] Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects [J]. *Toxicology Letters*, 2003, 142(3):185-194.
- [10] Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004,59(3):309-315.
- [11] Ungprasert P, Cheungpasitporn W, Crowson C S, et al. Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2015,26(4): 285-291.
- [12] Fattori V, Borghi S M, Guazelli C F S, et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF-kappaB activation in mice [J]. *Pharmacological research*, 2017,120:10-22.
- [13] Syed M, Skonberg C, Hansen S H. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: possible role in drug induced liver injury (DILI) [J]. *Toxicology in Vitro*, 2016,31:93-102.
- [14] Hickey E J, Raje R R, Redd V E, et al. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001,31(2):139-152.
- [15] Ng L E, Vincent A S, Halliwell B, et al. Action of diclofenac on kidney mitochondria and cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006,348(2):494-500.
- [16] Fatta-Kassinos D, Hapeshi E, Achilleos A, et al. Existence of pharmaceutical compounds in tertiary treated urban wastewater that is utilized for reuse applications [J]. *Water Resources Management*, 2011,25(4):1183-1193.
- [17] Zorita S, Martensson L, Mathiasson L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden [J]. *Science of the Total Environment*, 2009,407(8):2760-2770.
- [18] Kambiranda D, Katam R, Basha S M, et al. iTRAQ-based quantitative proteomics of developing and ripening muscadine grape berry [J]. *Journal of Proteome Research*, 2014,13(2):555-

- 569.
- [19] 张留辉. 锌离子对肺炎链球菌影响的蛋白质组学研究 [D]. 广东: 暨南大学, 2010.
- [20] 黄莹莹, 白羽, 王燕, 等. 基于 iTRAQ 技术的加拿大一枝黄花提取物作用下铜绿微囊藻细胞差异表达蛋白 [J]. 中国环境科学, 2015, 35(6): 1822-1830.
- [21] McKenney P T, Driks A, Eichenberger P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat [J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(1): 33-44.
- [22] Ozin A J, Henriques A O, Yi H, et al. Morphogenetic proteins SpoVID and SafA form a complex during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(7): 1828-1833.
- [23] Chen F C, Shen L F, Tsai M C, et al. The IspA protease's involvement in the regulation of the sporulation process of *Bacillus thuringiensis* is revealed by proteomic analysis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 312(3): 708-715.
- [24] Huang J C, Wang X R, Cao Q, et al. ClpP participates in stress tolerance and negatively regulates biofilm formation in *Haemophilus parasuis* [J]. Veterinary Microbiology, 2016, 182: 141-149.
- [25] Dorel C, Lejeune P, Rodrigue A. The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities [J]. Research in Microbiology, 2006, 157(4): 306-314.
- [26] Silva A J, Parker W B, Allan P W, et al. Benitez. Role of methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase in *Vibrio cholerae* cellular communication and biofilm development [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 461(1): 65-69.
- [27] Shimaoka M, Takenaka Y, Kurahashi O, et al. Effect of amplification of desensitized purF and prs on inosine accumulation in *Escherichiacoli* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 103(3): 255-261.
- [28] Shi S B, Shen Z, Chen X, et al. Increased production of riboflavin by metabolic engineering of the purine pathway in *Bacillus subtilis* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 46(1): 28-33.
- [29] Yin Y L, Ashihara H. Phosphate levels and expression of phosphoribosylpyrophosphate synthetase isozymes in suspension-cultured *Arabidopsis thaliana* cells [J]. Phytochemistry Letters, 2009, 2(3): 126-129.
- [30] 陈朋. 人类磷酸核糖焦磷酸合成酶 PRS1 及其相关蛋白的结构与功能研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2013.
- [31] Kovacs D, Rakacs M, Agoston B, et al. Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins [J]. Febs Letters, 2009, 583(1): 88-92.
- [32] Kim T Y, Ha C, Huh W K. Differential subcellular localization of ribosomal protein L7paralogs in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Molecules and Cells, 2009, 27(5): 539-546.
- [33] Husnain S I, Meng W M, Busby S J W, et al. *Escherichia coli* can tolerate insertions of up to 16 amino acids in the RNA polymerase alpha subunit inter-domain linker [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression, 2004, 1678(1): 47-56.
- [34] Abushahba M F N, Mohammad H, Seleem M N. Targeting multidrug-resistant *staphylococci* with an anti-rpoA peptide nucleic acid conjugated to the HIV-1TAT cell penetrating peptide [J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2016, 5:e339. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.53>.
- [35] Cai L, Sutter B M, Li B, et al. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes [J]. Molecular Cell, 2011, 42(4): 426-437.
- [36] 李艳. 重组苏云金芽孢杆菌丙酮酸脱氢酶表达条件的优化及结构预测 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2008.
- [37] Fleige T, Pfaff N, Gross U, et al. Localisation of gluconeogenesis and tricarboxylic acid (TCA)-cycle enzymes and first functional analysis of the TCA cycle in *Toxoplasma gondii* [J]. International Journal for Parasitology, 2008, 38(10): 1121-1132.
- [38] Battaile K P, Molin-Case J, Paschke R, et al. Crystal structure of rat short chain acyl-CoA dehydrogenase complexed with acetoacetyl-CoA - Comparison with other acyl-CoA dehydrogenases [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(14): 12200-12207.
- [39] Le W P, Abbas A S, Sprecher H, et al. Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000, 1485(2/3): 121-128.
- [40] Trchounian A. *Escherichia coli* proton-translocating F0F1-ATP synthase and its association with solute secondary transporters and/or enzymes of anaerobic oxidation-reduction under fermentation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 315(4): 1051-1057.

作者简介: 吴双(1993-), 女, 湖北黄石人, 暨南大学硕士研究生, 主要从事环境微生物的相关研究. 发表论文 1 篇.