

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.03.018

二甲双胍抑制大肠杆菌生长和鞭毛马达转速

叶英香, 刘健, 王芳彬

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:文章运用光学显微成像技术和生物学统计模型等多种生物物理手段研究二甲双胍对大肠杆菌的生长、运动和趋化行为改变过程的影响。研究表明:二甲双胍能够抑制大肠杆菌的生长,并且大肠杆菌的形态受到生长的影响;利用倒置显微镜结合乳胶小球标记鞭毛法和微流控技术探究二甲双胍对大肠杆菌鞭毛马达转速的影响,结果发现,二甲双胍对鞭毛马达的转速具有抑制效果,且不同浓度的二甲双胍影响大肠杆菌对天冬氨酸趋化反应的恢复时间。

关键词:大肠杆菌;二甲双胍;生长形态;鞭毛马达转速;趋化反应

中图分类号:Q937 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2023)03-0397-05

Metformin inhibits *Escherichia coli* growth and flagellar motor speed

YE Yingxiang, LIU Jian, WANG Fangbin

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In this paper, multifarious biophysical methods such as optical microscopic imaging and biological statistical model were used to study the behavioral changes of *Escherichia coli* induced by metformin, including growth, motility and chemotaxis. It showed that metformin could inhibit the growth of *E. coli* and the morphology of *E. coli* was affected by the growth. The effect of metformin on the rotation speed of *E. coli* flagellar motor was investigated by using inverted microscope combined with latex bead assay and microfluidics. The results showed that metformin inhibited the rotation speed of *E. coli* flagellar motor, and different concentrations of metformin influenced the recovery time of *E. coli* chemotactic response to aspartic acid.

Key words: *Escherichia coli*; metformin; growth form; rotation speed of flagellar motor; chemotactic response

0 引言

作为原核生物的大肠杆菌,结构非常简单,其主要的增殖方式是二分裂^[1-2]。通过改变培养中营养物质的含量来调控大肠杆菌的生长,将增殖后的细菌数目经过计算绘制成生长曲线^[3],因为在每个时期内细菌数目不同,所以为了更加准确地测定大肠杆菌的生长过程,常用光学密度(optical density, OD)来表征细菌浓度。

大肠杆菌的鞭毛马达结构复杂且精细,能够驱动鞭毛进行运动^[4-5]。当胞内鞭毛马达沿逆时针(counterclockwise, CCW)旋转方向转动时,所有的鞭毛会变成一簇集束,即鞭毛束,进而驱动细菌向前游动;当多个鞭毛马达沿顺时针(clockwise, CW)旋转方向转动时,该集束会被打开,形成一个鞭毛个体,进而使细菌原地打转。要使细菌游动到某一固定位置,就需要调控鞭毛马达的运动方向。然而对鞭毛马达转动这一过程很难

收稿日期:2021-04-30;修回日期:2021-06-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11804072);安徽省自然科学基金资助项目(1808085QC64)

作者简介:叶英香(1996—),女,安徽舒城人,合肥工业大学硕士生;

刘健(1970—),男,安徽合肥人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师;

王芳彬(1989—),男,安徽芜湖人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail:fbwang@hfut.edu.cn.

直接观察到,利用乳胶小球标记法,将小球附着到鞭毛上^[6],其尺寸是微米级别的,在鞭毛马达的带动下,乳胶小球会进行转动,从而将大肠杆菌鞭毛马达的转动过程转换为乳胶小球的转动过程。

趋化行为在大肠杆菌运动中扮演着十分重要的角色^[7-8],尤其是在大肠杆菌获取营养物质的过程中,细菌以此趋化运动到含有高浓度营养物质的地方,或者趋化运动逃离含有有害物质的地方。大肠杆菌因体内趋化信号系统的存在,在感受到外来环境发生变化时能够迅速地做出应激反应,调控趋化系统中各蛋白的活性水平,使细菌的趋化系统具有很强的自适应性。

二甲双胍是一种双胍类分子,广泛用于治疗 2 型糖尿病。有研究表明,二甲双胍能够通过改变大肠杆菌的代谢来降低哺乳动物患癌症的风险和延长秀丽隐杆线虫的寿命,接受二甲双胍治疗后的患者体内的大肠杆菌发生了改变,其葡萄糖耐量也得到了改善^[9-12]。本文研究二甲双胍对大肠杆菌行为变化的影响,包括生长、运动和趋化,为以后深入了解和探索药物对大肠杆菌的作用机理提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

Ti-2 倒置显微镜(Nikon), CMOS 相机(Thorlabs),注射泵(保定兰格恒流泵有限公司),摇床(天津欧诺仪器有限公司),离心机(Eppendorf),高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂),电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),分光光度计(Eppendorf),AL104 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.2 实验材料

带有质粒 pKAF131 的大肠杆菌 JY26 ($\Delta fliC$) 由中国科学技术大学袁军华实验室提供。

1 μm 乳胶小球(Polysciences),琼脂、蛋白胍(BD 公司),磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司),天冬氨酸、蛋氨酸、乳酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、氯化钠、多聚赖氨酸、二甲双胍(Sigma 公司),氯霉素(GIBCO 公司),M 型油脂(APIEZON 公司)。

T-broth(TB)培养液的组分为 1 L 纯水、10 g 蛋白胍、5 g 氯化钠;Motility Medium(MM)溶液的组分为 3.9 mL 的 1 mol/L H_2KPO_4 、6.1 mL 的 1 mol/L HK_2PO_4 、0.2 mL 的 0.5 mol/L ED-

TA、0.1 mL 的 10 mmol/L 蛋氨酸、1 mL 的 10 mol/L 乳酸。将上述溶液混合后加纯水使溶液最终体积为 1 L,灭菌后冷却至室温,然后调节 pH 值至 7.0。

1.3 实验方法

1.3.1 大肠杆菌生长曲线的测定

(1) 首先在 4 个 50 mL 锥形瓶中分别加入 10 mL TB 培养液,再分别加入不同浓度的二甲双胍溶液,使其终浓度为 5、10、20 mmol/L,对照组为不加二甲双胍的 TB 培养液。

(2) 在每个锥形瓶中加入 100 μL 菌液(先前在 LB 培养液中过夜培养并稀释 100 倍),并加入相应的抗生素。

(3) 将锥形瓶置于 33 $^\circ\text{C}$ 、220 r/min 的摇床中,每 2 h 测量 1 次菌液的 OD,共测量 12 h。

1.3.2 大肠杆菌形态的测定

大肠杆菌菌液处理过程如下:将上述各组细菌菌液培养 12 h 后,取出 1 mL 的菌液离心(离心条件为 4 000g 下 1 min),然后去除上清液;向沉淀中加入 1 mL MM 溶液,震荡均匀,再次离心,去除上清液;然后向沉淀中加入 300 μL MM 溶液浓缩菌液。

切片的制备过程如下:取 1 片长为 75 mm、宽为 25 mm 的载玻片和 1 片正方形边长为 20 mm 的盖玻片依次用乙醇和纯水清洗干净,自然晾干;将盖玻片的一面通过两段双面胶(厚度为 100 μm)与载玻片相连,两段双面胶的间距要小于盖玻片的长度,盖玻片与载玻片之间形成了一个通道;向通道中加入 40 μL 处理过的菌液,立即用 M 型油脂将通道两端封住。

切片制备完成后,使用 60 倍的 Ti-2 倒置显微镜对其进行成像。

1.3.3 大肠杆菌运动性的测定

大肠杆菌菌液处理过程如下:取 1 mL OD 为 0.5~0.6 的菌液离心(离心条件为 4 000g 下 1 min),然后去除上清液;向沉淀中加入 1 mL MM 溶液,震荡均匀,再次离心,去除上清液;然后向沉淀中加入 1 mL MM 溶液,混合均匀后注入到用聚苯乙烯软管连接的 2 个注射器中,来回挤压注射器 50 次(剪切鞭毛,使其变短,减小鞭毛过长对实验的影响);将经过物理作用处理后的菌液再次进行离心,再加入 300 μL 的 MM 溶液来浓缩菌液;将处理后的菌液立刻用来标记乳胶小球和制备切片观察,剩余的菌液放入 $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 以便后续实验使用。

切片的制备过程如下:取1片长为75 mm、宽为25 mm的载玻片和1片正方形边长为20 mm的盖玻片依次用乙醇和纯水清洗干净,自然晾干;在盖玻片的一面加入100 μ L的多聚赖氨酸,涂抹均匀,静置3 min,再将两段双面胶粘于载玻片上;用纯水清洗盖玻片,晾干处理后将盖玻片经多聚赖氨酸处理后的一面朝载玻片方向粘住,形成一个通道;向通道中加入40 μ L处理过的菌液,将切片倒置处理3 min,即载玻片在上方;将切片正置放置好后,用100 μ L的MM溶液缓慢冲洗通道,将未粘到盖玻片上的细菌冲洗掉;再向通道中加入40 μ L的乳胶小球溶液至通道中,然后将切片倒置处理3 min;用100 μ L的MM溶液缓慢冲洗通道,将未粘到细菌鞭毛上的乳胶小球冲洗掉。用M型油脂将通道两端封住。

切片制备完成后,使用60倍的Ti-2倒置显微镜观察乳胶小球的旋转运动轨迹,并使用CMOS相机以500帧/s的速度记录。

1.3.4 大肠杆菌趋化性的测定

切片的制备过程如下:取1片长为75 mm、宽为25 mm的载玻片,中间部位打2个孔,半径大约为0.5 mm,再将2根2 cm长的聚乙烯软管通过结合胶固定在2个孔中,取出1片长为50 mm、宽为24 mm的盖玻片依次用乙醇和纯水清洗干净,自然晾干;在盖玻片的一面加入200 μ L的多聚赖氨酸,涂抹均匀,静置3 min,然后用纯水冲洗其表面;待晾干后将涂有多聚赖氨酸的一面通过长形的双面胶(厚度为100 μ m)与载玻片相连,这样盖玻片和载玻片之间形成了一个通道;用M型油脂封住通道两端,将处理好的菌液通过1 mL注射器注入到聚乙烯软管的一端,静置3 min,即载玻片在上方;随后在软管同一端通过1 mL注射器注入乳胶小球溶液,静置3 min。

切片制作完成后置于倒置显微镜下,通过注射泵的装置,将装有MM溶液的一端连接切片软管的一端,冲洗通道,去除在通道中呈悬浮状的乳胶小球,然后观察乳胶小球的旋转运动轨迹。并用CMOS相机以500帧/s的速度记录。

2 结果与分析

2.1 二甲双胍对大肠杆菌生长的抑制作用

本文研究了带有质粒pKAF131的大肠杆菌JY26(Δ fliC)在不同浓度(5、10、20 mmol/L)的二甲双胍下细菌的生长,在波长为600 nm处每2 h监测细菌的OD值,如图1所示。从图1可以

看出:在对数期生长阶段之前,几组的细胞生长速率几乎相同,约为0.5,可见二甲双胍在该阶段可能没有起作用或作用不明显;相反,在到达对数期生长阶段后,可以明显看到,随着二甲双胍浓度的增加,细胞的生长速率会逐渐下降;对照组的细胞在12 h后的OD值为1.63,而在20 mmol/L二甲双胍中生长细胞的OD值为1.05,与对照组相比下降了35.6%。结果表明,二甲双胍能够抑制大肠杆菌的生长,且该抑制作用与剂量有关。

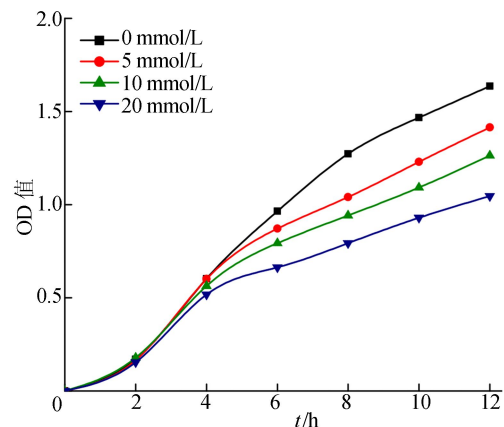


图1 大肠杆菌在二甲双胍下的生长曲线

有研究表明细菌的形态与生长有关,在上述研究中发现二甲双胍具有抑制大肠杆菌生长的作用,为了研究二甲双胍对大肠杆菌形态的影响。本文在不同浓度二甲双胍下培养细菌至12 h,然后观察其形态的变化,如图2所示。

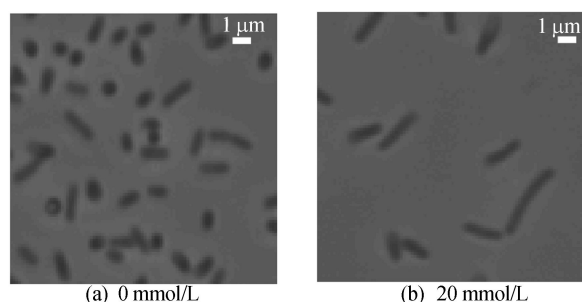


图2 大肠杆菌在不同浓度二甲双胍下的形态

从图2可以看出,在20 mmol/L二甲双胍中培养的细菌数目少于0 mmol/L培养的细菌数,而细菌长度大于无二甲双胍培养的细菌。表明二甲双胍的存在不仅能够抑制细菌的生长,同时还使胞体变长。本文统计了 2×10^4 个细菌长度,具体结果如图3所示,图3中,***表示与对照组相比显著性($P < 0.001$),由图3可知,加入二甲双胍培养的细菌长度明显大于对照组。

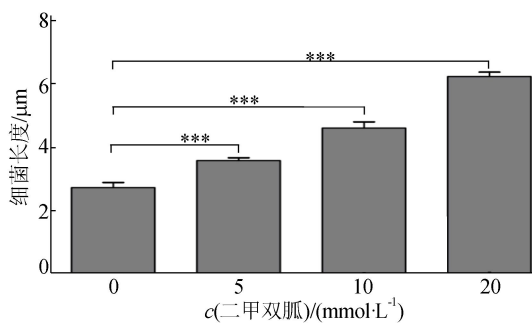


图3 不同浓度二甲双胍下的大肠杆菌胞体长度

2.2 二甲双胍对细菌鞭毛马达转速的抑制作用

在实验过程中,由于在显微镜下无法观察到大肠杆菌的鞭毛马达的转动,本文将直径为 $1\ \mu\text{m}$ 的乳胶小球标记到菌株的短鞭毛上,分别在 CCW 和 CW 方向测量鞭毛马达运动的转速,如图 4 所示。观察每个鞭毛马达的旋转约 180 s,使用 MATLAB (Mathworks) 软件分析鞭毛马达的转速,如图 4a 所示,图 4a 中,每组分别记录了 20 个鞭毛马达在不同细胞上的旋转轨迹,并对它们进行总体平均,以减小单个细胞引起的差异性。

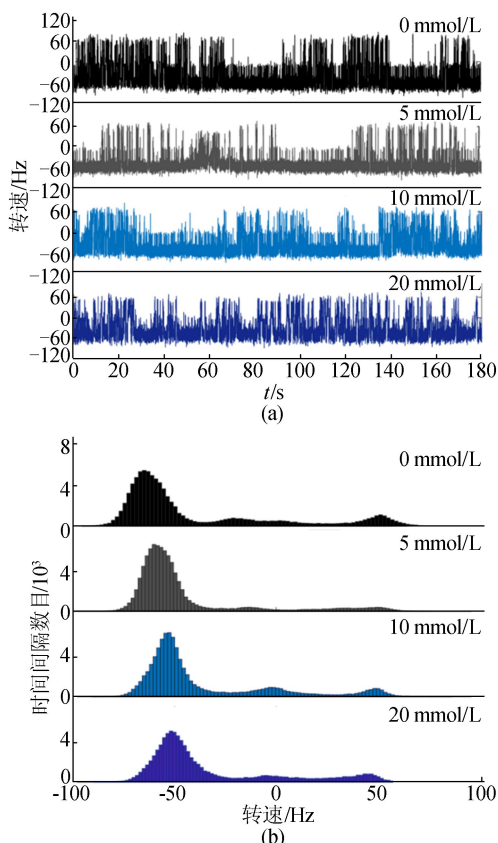


图4 大肠杆菌鞭毛马达在不同浓度二甲双胍下的转速分布

利用横道阈值 (threshold-crossing) 算法,将鞭毛马达的转速随时间的分布图转化为转动方向的分布图,可得鞭毛马达在 CCW 方向和 CW 方向旋

转的驻留时间间隔及其数目分布,如图 4b 所示。图 4b 中: CW 方向转速为正; CCW 方向转速为负。

经过统计后绘制出二甲双胍浓度与转速的关系如图 5 所示。从图 5 可以看出,随着二甲双胍浓度的增大, CCW 方向转速明显下降,而 CW 方向转速无显著变化,与未加二甲双胍相比, 20 mmol/L 二甲双胍培养下的细菌在 CCW 方向和 CW 方向上转速分别降低了 15.6% 和 5.76%。因此,二甲双胍对 CCW 转速的影响大于对 CW 转速的影响,且可以看出二甲双胍对大肠杆菌鞭毛马达的转速具有抑制作用。

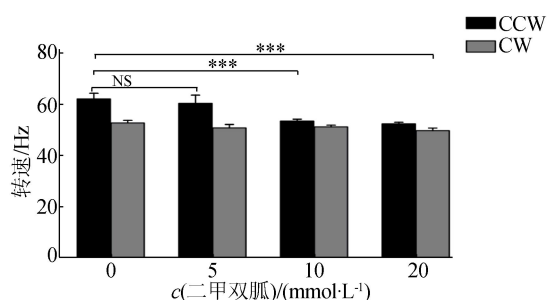


图5 大肠杆菌鞭毛马达在不同浓度二甲双胍下的转速

2.3 二甲双胍影响细菌对天冬氨酸的趋化反应

天冬氨酸是研究细菌趋化响应的一种常见引诱剂,为了测定在二甲双胍存在下,大肠杆菌对天冬氨酸的趋化反应恢复时间的影响,本文测量实验菌株在不同浓度二甲双胍 (5、10、20 mmol/L) 培养下的鞭毛马达顺时针偏差,如图 6 所示。

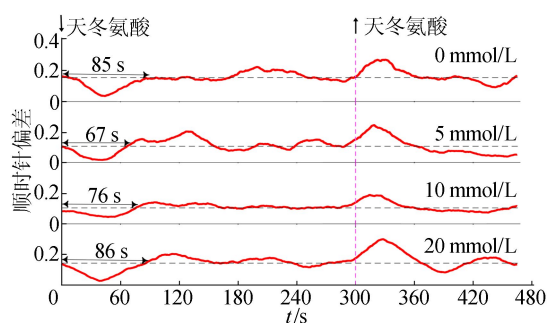


图6 不同浓度二甲双胍下的大肠杆菌对天冬氨酸的趋化响应

由图 6 可知,在 $t=0\ \text{s}$ 处通入 $2.5\ \mu\text{mol/L}$ 天冬氨酸作为刺激物,发现鞭毛马达顺时针偏差突然下降至 0,此后缓慢恢复到刺激前的水平并保持稳定;在 300 s 时去除天冬氨酸的逐步刺激后,马达顺时针偏差迅速增加到峰值,随后降低到其刺激前水平。恢复时间的定义为顺时针偏差从添加化学刺激物到恢复至刺激前水平的持续时间。

0、5、10、20 mmol/L 二甲双胍中培养的细胞,恢复时间分别为(85±4) s、(67±6) s、(76±7) s、(86±10) s,且二甲双胍浓度越高,恢复时间越长。鞭毛马达顺时针偏差恢复到刺激前水平后,还观察到过刺激现象。结果表明,二甲双胍的存在能够延长大肠杆菌对天冬氨酸趋化反应的恢复时间。

3 结 论

本实验研究了3种浓度(5、10、20 mmol/L)的二甲双胍对大肠杆菌 JY26/pKAF131 的生长、鞭毛马达的转动以及对天冬氨酸的趋化响应恢复时间的影响,发现二甲双胍能够抑制细菌的生长,使其胞体变长。几组大肠杆菌鞭毛马达的转速存在显著差异,且二甲双胍能够延长大肠杆菌对天冬氨酸趋化反应的恢复时间。文献[13]研究发现大肠杆菌鞭毛马达转速随质子驱动力(proton motive force, PMF)水平线性变化,当外部负载较大或较小时,鞭毛马达转速都与 PMF 水平成正比,如果通过固定数量的质子携带的鞭毛马达每旋转1次(鞭毛马达是紧密耦合的),那么旋转速度与 PMF 水平之间的线性关系将可能会被打破,使其对外部负载所做的功与质子流耗散的能量匹配。就目前的研究结果来看,上述线性关系的成立与一个额外的条件是分不开的,即鞭毛马达的结构;文献[14]发现大肠杆菌鞭毛马达转速与定子(由膜蛋白 MotA 和 MotB 组成)有关,定子单元通过离子移位固定在肽聚糖细胞壁上,与细菌鞭毛基部的 FliG 蛋白之间产生静电作用,在马达旋转中产生转矩,进而将力作用于 C 环外端,从而驱动鞭毛马达的旋转;在大肠杆菌中,环二鸟苷酸(c-di-GMP)水平变化时,能够与鞭毛马达相互作用,通过改变顺时针偏差和速度来抑制鞭毛运动^[15]。本文结果表明,二甲双胍抑制大肠杆菌鞭毛马达的转速可能与上述3个因素有关,针对二甲双胍对大肠杆菌趋化和运动的影响,需要进一步研究来阐明。

[参 考 文 献]

[1] ERIC J S, RICHARD M, GREGORY P, et al. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division[J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(2): 295-300.
 [2] THIEFFRY D, SALGADO H, HUERTA A M, et al. Prediction of transcriptional regulatory sites in the complete

genome sequence of *Escherichia coli* K-12[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(5): 391-400.

- [3] SALOUA H, AYSHAH S E A, ADNANE A. Pathogenic *Escherichia coli* biosensor detection on chicken food samples [J]. *Journal of Food Safety*, 2018, 38(5): e12510.
 [4] WANG F B, YUAN J H, BERG H C. Switching dynamics of the bacterial flagellar motor near zero load[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(44): 15752-15755.
 [5] FAN B, RICHARD W B, DAN V N, et al. Conformational spread as a mechanism for cooperativity in the bacterial flagellar switch[J]. *Science*, 2010, 327(5966): 685-689.
 [6] RICHARD M B, BERG H C. Absence of a barrier to backwards rotation of the bacterial flagellar motor demonstrated with optical tweezers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(26): 14433-14437.
 [7] 袁军华. 细菌运动及趋化信号转导网络的研究[J]. *中国科学技术大学学报*, 2014, 44(5): 382-388.
 [8] BERG H C, BROWN D A. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking[J]. *Nature*, 1972, 239(5374): 500-504.
 [9] GEMS D, FILIPE C, AU C, et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism[J]. *Cell*, 2013, 153: 228-239.
 [10] KRISTOFFER F, FALK H, TRINE N, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota[J]. *Nature*, 2015, 528: 262-266.
 [11] HAO W, EDUARDO E, VALENTINA T, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug [J]. *Nature Medicine*, 2017, 23: 850-858.
 [12] BAILEY C J, WILCOCK C, SCARPELLO J H. Metformin and the intestine[J]. *Diabetologia*, 2008, 51: 1552-1553.
 [13] GABEL C V, BERG H C. The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with protonmotive force[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(15): 8748-8751.
 [14] KOJIMA S, BLAIR D F. Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 26-34.
 [15] NIETO V, PARTRIDGE J D, PARKINSON J S, et al. Under elevated c-di-GMP in *Escherichia coli*, ycgR alters flagellar motor bias and speed sequentially, with additional negative control of the flagellar regulon via the adaptor protein RssB[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(1): e00578-19.

(责任编辑 闫杏丽)