

螺旋霉素对金黄色葡萄球菌耐药突变体的转录组特征分析

姚健¹, 邵雷², 陈代杰^{2*}, 张玉彬^{1**}⁽¹⁾中国药科大学生命科学与技术学院生物化学教研室, 南京 210009;⁽²⁾上海医药工业研究院新药制药重点实验室, 上海 200040

摘要 螺旋霉素 I 是一类重要的大环内酯类抗生素, 但由于耐药菌的产生限制了临床使用。为了在转录水平上全局性的了解细菌耐药前后对抗生素响应上的变化和机制, 通过基于 RNA-seq 方法对螺旋霉素敏感菌株 *Staphylococcus aureus* ATCC29213 和其诱导耐药突变菌株 *S. aureus* ATCC29213-R 在抗生素压力诱导前后菌体的转录组表达变化进行了分析。研究结果证明了螺旋霉素 I 可诱导 *S. aureus* ATCC29213 产生耐药菌株, 并通过测序发现该菌的 23S rRNA 2089 位 A→C 颠换, 该突变位点在 *S. aureus* 中是首次报道。此外, 还发现螺旋霉素 I 能使 *S. aureus* ATCC29213-R 菌株的 322 个基因上调, 82 个基因下调, 其中涉及精氨酸降解的基因 *arcA*, *arcC* 和 *argF* 表达水平分别上调 35, 18.05 和 30.84 倍, 涉及精氨酸合成的基因 *argH* 和 *argG* 分别下调 13.51 和 21.45 倍, 其综合作用减少精氨酸的内源性合成; 因此, 精氨酸代谢途径可能成为治疗 23S RNA 突变耐药金黄色葡萄球菌感染新的潜在靶点。

关键词 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 螺旋霉素 I; 转录组分析; 精氨酸; 代谢途径

中图分类号 R771 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)06-0738-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170617

引用本文 姚健, 邵雷, 陈代杰, 等. 螺旋霉素对金黄色葡萄球菌耐药突变体的转录组特征分析[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6): 738-744.

Cite this article as: YAO Jian, SHAO Lei, CHEN Daijie, et al. Transcriptomic analysis of a spiramycin I-resistant *Staphylococcus aureus* mutant[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(6): 738-744.

Transcriptomic analysis of a spiramycin I-resistant *Staphylococcus aureus* mutantYAO Jian¹, SHAO Lei², CHEN Daijie^{2*}, ZHANG Yubin^{1**}

¹Department of Biochemistry, School of life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009; ²State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

Abstract The clinical utility of macrolide antibiotics has declined due to the appearance of resistant isolates. A spiramycin I-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC29213-R was induced and isolated with increasing the concentration of spiramycin I, which exhibits an A→C transversion at position 2089 in the 23S rRNA gene, which is first reported in the *S. aureus*. A RNA-seq based transcriptomic analysis was performed to understand the overall response of resistant bacteria to spiramycin I treatment with subinhibitory dosage. In this study, There are a total of 322 up-regulated and 82 down-regulated genes in spiramycin I-treated *S. aureus* ATCC29213-R and 426 up-regulated, 838 down-regulated in spiramycin I-treated *S. aureus* ATCC29213, which were identified differentially expressed compared to their control with a minimum 2-fold change ($Q < 0.05$). Interestingly, The data showed that *argH* and *argG* transcripts, in the arginine biosynthetic pathway, were decreased by 13.51-fold and 21.45-fold, respectively, compared to the control, while the expression level of three genes involved in arginine catabolism, *arcA*, *arcC*, and *argF*, increased by 35-fold, 18.05-fold and 30.84-fold, respectively. The results revealed

收稿日期 2017-05-16 **通信作者** * Tel: 021-20572000 E-mail: hccb001@163.com

** Tel: 025-83271300 E-mail: ybzhang@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81573329)

that spiramycin I could trigger the up-regulation of the genes of ACME-Arc system which allows *S. aureus* to survive in acidic environments of human skin. This suggested the arginine-deiminase pathway may be a potential target for treatment of the resistant *S. aureus*.

Key words *Staphylococcus aureus*; antibiotic resistance; spiramycin I; transcriptome analyses; arginine metabolic pathways

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81573329)

金黄色葡萄球菌属于革兰阳性球菌,在美国,医院感染中有很高比例是由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)引起的,MRSA 已对几乎所有种类的抗生素都产生了耐药性^[1]。大环内酯类抗生素螺旋霉素曾被用于对慢性气道炎症的长期治疗,如慢性鼻窦炎和弥漫性细支气管炎^[2]。这类抗生素是通过与革兰阳性细菌核糖体 50S 亚基上的 23S rRNA 结合^[3-4],抑制蛋白质的合成从而达到抑菌目的。过去的 20 年间,由于耐药菌病原体出现,大环内酯类抗生素的临床使用有所下降。金黄色葡萄球菌对大环内酯类抗生素有两种常见的耐药机制。第 1 种是金黄色葡萄球菌 23S rRNA 基因的突变导致其与抗生素结合的相互作用力减小。如大肠埃希菌 A2058 突变为 G,C,U,或其附近其他的核苷酸的结合位点发生突变,这些位点属于大环内酯与 23S rRNA 中央环结合的重要成分^[5]。第 2 种是许多耐药菌株含有可使 23S rRNA 基因 2058 位点腺嘌呤上 6 位氮原子发生单甲基化或双甲基化,这大大降低了大环内酯类抗生素对核糖体的亲和力。

环境中的抗生素可以诱导细菌产生耐药性并富集耐药细菌,然而螺旋霉素是如何使敏感型的金黄色葡萄球菌产生耐药性,以及耐药突变株对螺旋霉素的反应,人们并不是非常清楚。最近的研究表明,暴露于抗生素的细菌会发生一个全局性的反应,而不仅仅是影响到直接参与抵抗抗生素的特定基因,还有许多看似无关的基因起着不可代替的作用。转录组学的出现有利于从整体角度对细菌在抗生素压力下 mRNA 的变化进行研究,结果发现抗生素可以引发细菌广泛的转录水平变化,它们包括许多基本的代谢途径,转录调控元件^[6-7],还包括一些参与细胞壁合成和生物膜形成蛋白等^[8-9]。

本研究借鉴了前人的方法^[10-11],从出发菌株 *S. aureus* ATCC29213 经不断提高培养基中螺旋霉素 I 浓度条件下,连续诱导并最终产生稳定耐药菌株 *S. aureus* ATCC29213-R,之后从转录组学的角

度,研究了敏感菌和耐药菌在螺旋霉素 I 压力下的转录方式的转变,较系统地分析和阐述金黄色葡萄球菌对螺旋霉素 I 的抵抗和耐受机制。用亚抑制浓度的螺旋霉素 I (1/8 MIC) 处理细菌,使细菌在低浓度的抗生素压力下可以继续生长。即使其处在相对比较正常的生长状态下,从而可以比较客观地分析抗生素对细菌转录表达谱的影响。同时也模拟了细菌在自然水域或接受治疗时患者体内低剂量抗生素的情况。

1 材 料

1.1 药品和试剂

阳离子调整肉汤培养基剂、溶葡萄菌素 (lyso-staphin) (美国 Sigma 公司);螺旋霉素 I (中国河南天方药业股份有限公司);细菌基因组 DNA 纯化试剂盒 (北京天根生化科技有限公司);*Taq* 酶 (日本 TaKaRa 公司);RNA 保护剂 (RNA protector)、RNA 提取试剂盒、无 RNA 酶 DNA 酶 (RNase-Free DNase Set) (德国 Qiagen 公司);RNA 清洗试剂盒 (RNA Clean XP Kit, 美国 Beckman 公司);RNA 裂解试剂盒 (美国 Ambion 公司);双链 cDNA 合成试剂盒 (Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit, 美国 Invitrogen 公司)。

1.2 细菌菌株

金黄色葡萄球菌菌株 ATCC29213, 来自美国菌种保藏中心 (ATCC)。

2 方 法

2.1 最小抑制浓度的检测

肉汤法,根据美国临床和实验室标准 (CLSI) 的方法对细菌抗生素敏感性进行测定^[12]。

2.2 螺旋霉素 I 耐药菌株的获得

一个连续的细菌培养装置被设计用于诱导和获得突变菌株。挑取单落的金黄色葡萄球菌培养过夜后,按 1:1 000 稀释接种在连续培养罐中。细

菌在逐渐增加螺旋霉素 I 浓度下进行培养^[13]。每 4 天取样测定总体 MIC,菌落形成单位(CFU)和发酵罐内螺旋霉素 I 浓度(HPLC)测定。

2.3 亚抑制剂量螺旋霉素 I 扰动金黄色葡萄球菌出发菌株 *S. aureus* ATCC29213 和经螺旋霉素 I 诱导产生稳定耐药菌株 *S. aureus* ATCC29213-R 在加或不加螺旋霉素 I (1/8 MIC,敏感菌和耐药

菌的处理质量浓度分别为 0.5 和 32 μg/mL) 的浓度处理。

2.4 DNA 扩增和测序

利用细菌基因组 DNA 纯化试剂盒分离样品 DNA。然后以 *S. aureus* ATCC29213 和 *S. aureus* ATCC29213-R 基因组 DNA 为模板进行常见耐基因菌的扩增,使用引物见表 1。

Table 1 PCR primers list of macrolide resistance genes for *S. aureus*

Primer	Sequence(5'→3')	Gene	NCBIID	Length
<i>ermA</i> -S	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	rRNA adenine N-6-methyltransferase	LC146992.1	645 bp
<i>ermA</i> -A	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT			
<i>ermB</i> -S	GAAAAAGTACTCAACCAAATA	rRNA adenine N-6-methyltransferase	LC146993.1	639 bp
<i>ermB</i> -A	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
<i>ermC</i> -S	ACAGAGGTGTAATTTCGTAACCTGCC	rRNA adenine N-6-methyltransferase	AB982225.1	538 bp
<i>ermC</i> -A	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT			
yj-23s-S	TTCCTTGTCTGGGTAAGTTCC	domain V of the 23S rRNA	CP012409.1	769 bp
yj-23s-A	GTTGGCACGACAACCTGGTACAC			

2.5 细菌总 RNA 的提取

使用 RNA 提取试剂盒进行后续 RNA 提取工作。使用 RNA 清洗试剂盒和无 RNA 酶 DNA 酶对总 RNA 质量进一步优化。

2.6 cDNA 文库构建与测序

每个 RNA 样品取 3 μg,去核糖体 RNA 后,使用 RNA 裂解试剂盒将 mRNA 裂解约 300 bp 的大小。再使用双链 cDNA 合成试剂盒生成双链 cDNA 文库。送上海伯豪生物技术公司,利用 hiseq 2500 高通量测序仪对每个样本测序。

2.7 差异基因表达结果和生物信息学分析

为使不同基因、不同样本间的基因表达水平具有可比性,将 Reads 转化成 FPKM(每 100 万个 map 上的 Reads 中 map 到外显子的每 1 000 个碱基上的 reads 个数)进行基因表达量的标准化^[14],再根据 edgeR 方法计算并选择 $Q < 0.05$ (调整后的 P 值)和 $|\text{fold change}| > 2$ 基因为差异表达基因^[15]将这些差异表达的基因同 *S. aureus* NCTC 8325 的基因组比对,通过 DAVID 网站进行富集分析,STRING 分析差异表达基因间互作关系^[16],另外用 Cytoscape 3.4 实现可视化。

3 结果与讨论

3.1 耐药突变株的获得及其耐药谱和基因型分析

用连续培养装置模拟环境中抗生素压力对致病菌的作用来诱导耐药菌株产生,采用螺旋霉素 I

敏感的金黄色葡萄球菌的 *S. aureus* ATCC29213 为出发菌株,该菌株不含已经检测过常见大环内酯类耐药基因,如 *ermABC*。在连续培养和逐步加大螺旋霉素 I 浓度的条件下,经过 18 d 的诱导,获得并分离耐药菌株,命名为 *S. aureus* ATCC29213-R,如图所示,细菌在第 13 天和第 18 天的 MIC 浓度分别为 2 和 128 μg/mL(图 1A)。从第 13 天和第 18 天培养基中分离出的 80 株单菌中,螺旋霉素耐药菌株的比例也从 0% 变为 100%。第 18 天挑取的 80 株单菌在无抗生素条件下连续培养 5 代后,所有分离株的耐药性均无变化,表明获得的耐药菌株遗传学上稳定。

6 种大环内酯类抗生素和另外 5 种其他类型的抗生素(表 2)被用来测试菌株的药敏性。结果表明 *S. aureus* ATCC29213-R 是大环内酯类抗生素交叉耐药菌株,但对其他类型的抗生素仍然敏感。

对出发菌株 *S. aureus* ATCC29213 和筛选到的耐药菌株 *S. aureus* ATCC29213-R 进行常见耐药基因扩增,两株细菌中已知常见耐药基因 *ermABC* 均为阴性。而对 23S rRNA 测序结果表明诱导耐药菌株发生 A2089C 突变(A2062C *E. coli* 编码)(图 1-B)。共晶结构显示,螺旋霉素 I 的 C6 位置乙醛取代基和 23S rRNA A2062 之间可形成(A2062, *E. coli* 编码)可逆的共价键^[17]。此外,Furneri PM 研究人员报道在人支原体和肺炎支原体 2062 位置的碱基改变与 16 元大环内酯类、链阳霉素的抗性

相关^[18-20]。Weisblum^[21]称 A2062C 突变赋予了菌体耐氯霉素和耐碳霉素和链阳性菌素 B 抗性。因此,23S rRNA A2089C 突变是 *S. aureus* ATCC29213 转变为耐药菌 *S. aureus* ATCC29213-R 的主要原因,这是第 1 次在甲氧西林敏感型金黄色葡萄球菌(MSSA)中发现该特异突变位点。

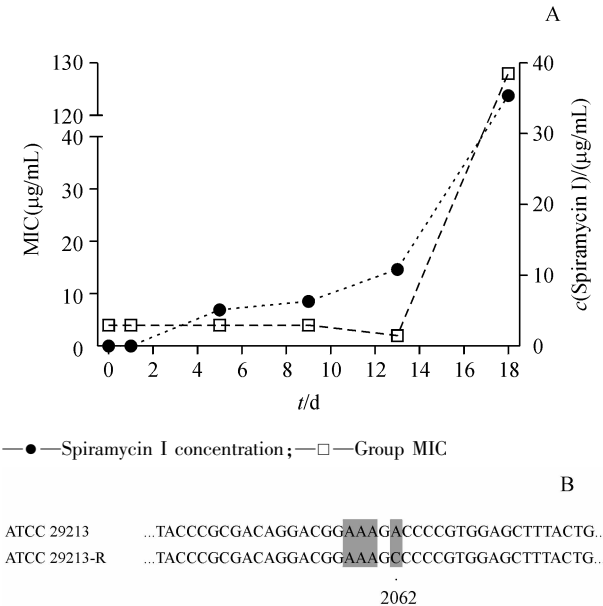


Figure 1 Continuous culture experiment of *S. aureus* ATCC29213 with spiramycin I. (A) The spiramycin I concentration dynamic and the MIC for the groups during the inducing process; (B) The schematic of the 23S rRNA mutation site of *S. aureus* ATCC29213-R

Table 3 Summary of the transcriptome sequencing data

Sample	Sample ID	All reads	Mapped reads	Mapped Unique reads	Mapped Multi reads	Mapping ratio/%
29213_control	X1A	10 985 440	10 940 776	10 895 655	5 393	99.59
29213_SPMI	X2B	13 376 748	13 324 764	13 302 286	4 506	99.61
29213-R_control	X3C	13 812 926	13 765 720	13 709 329	7 145	99.66
29213-R_SPMI	X4R	14 888 422	14 840 285	14 798 641	6 760	99.68

Note:“SPMI” means “Spiramycin I treated group”;“control” means “control group”

数据显示,在 4 组样品检测到的 2 668 个基因中,螺旋霉素 I 对 ATCC29213 处理同其无抗对照组相比,及螺旋霉素 I 对 ATCC29213-R 处理相对于对照上调基因分别是 426 个和 322 个,它们之间共同上调的基因只有 123 个(图 2-C),占总上调基因数的 19.7%;另外,螺旋霉素 I 对 ATCC29213 处理相对于对照下调基因有 838 个,而螺旋霉素 I 对 ATCC29213-R 处理相对于对照相比下调基因只有

Table 2 MIC of *S. aureus* ATCC29213-R and *S. aureus* ATCC29213 to a panel of antibiotics

Group	MIC-ATCC29213	MIC-ATCC29213-R	Fold change
Erythromycin	>0.5	>32	—
Clarithromycin	≤0.5	4	>8
Spiramycin I	4	>32	>16
Medemycin	0.5	>32	>64
Azithromycin	1	8	8
Telithromycin	2	2	1
Oxacillin	0.5	≤0.25	≤0.5
Gentamicin	1	0.5	0.5
Vancomycin	1	1	1
Ciprofloxacin	≤0.25	≤0.25	—
Tetracycline	≤0.25	≤0.25	—

3.2 螺旋霉素 I 对 *S. aureus* ATCC29213-R 和 *S. aureus* ATCC29213 表达谱的作用

S. aureus ATCC29213-R 和出发敏感菌株 *S. aureus* ATCC29213 在转录水平上对亚抑制浓度的螺旋霉素 I 响应的实验流程图请见图 2-A,结果显示了敏感型金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC29213 在 0.5 μg/mL 螺旋霉素 I 压力下和耐药型金黄色葡萄球菌 *S. aureus* ATCC29213-R 在 32 μg/mL 螺旋霉素 I 压力下同它们的无抗对照组相比,转录表达谱的变化情况。测序后 Reads 从 10.98×10^6 到 14.88×10^6 (表 3),同时,螺旋霉素 I 暴露后,*S. aureus* ATCC29213-R 被扰动的基因数比 *S. aureus* ATCC29213 少(图 2-B)。

82 个(图 2-D);说明它们之间对螺旋霉素 I 响应方式有很大的不同。这个结果可能是因为螺旋霉素 I 对敏感型的 ATCC29213 核糖体功能的抑制影响了多数蛋白质的合成;而 ATCC29213-R 因对螺旋霉素 I 产生特异的耐药机制,从而规避了螺旋霉素 I 的抑菌效应,同时减少了其对细菌转录过程的扰动。

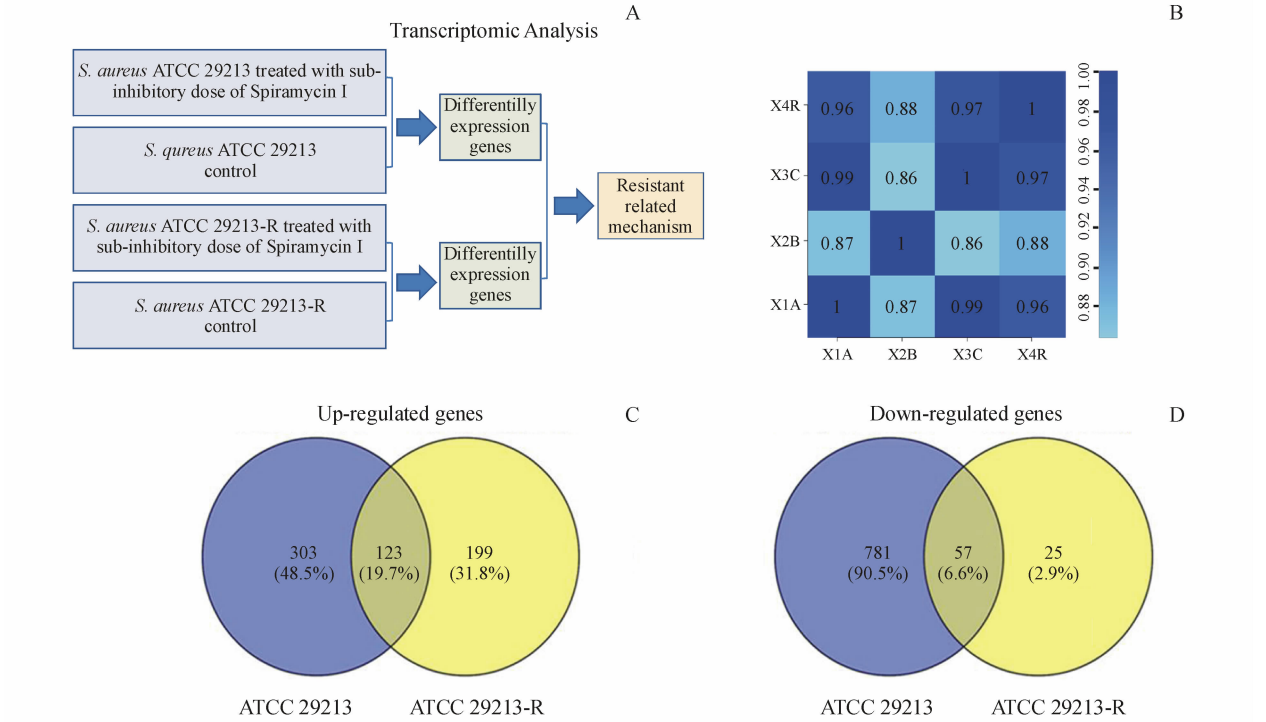


Figure 2 (A) Experimental workflow of the transcriptomic analysis; (B) The correlation analysis of sequencing results of four samples; (C) The Venn diagrams for the up-regulated genes of *S. aureus* ATCC29213 and *S. aureus* ATCC29213-R treated with spiramycin I compared to the control are shown; (D) The Venn diagrams for the down-regulated genes of *S. aureus* ATCC29213 and *S. aureus* ATCC29213-R treated with spiramycin I compared to the control are shown. Note: $Q < 0.05$; $|\text{Fold-change}| \geq 2$

3.3 差异基因互作关系及重要的生物代谢通路

对低剂量螺旋霉素 I 作用前后细菌的差异表达基因互作关系分析结果显示,经过螺旋霉素 I 处理的 *S. aureus* ATCC29213-R 和其无抗对照组相比,精氨酸合成途径和精氨酸脱亚氨途径被强列的扰动。其中基因 *argH* 和 *argG* 表达产物则被分别下调 13.51 和 21.45 倍,它们分别编码精氨酸合成途径中的精氨酸琥珀酸裂解酶 (argininosuccinate lyase[EC:4.3.2.1]) 和精氨基琥珀酸合酶 (argininosuccinate synthase[EC:6.3.4.5]) (图 3 和表 4),而编码精氨酸分解代谢相关的 3 个基因:精氨酸脱亚氨酶 (*arcA*, arginine deiminase [EC:3.5.3.6]),氨基甲酸激酶 (*arcC*, carbamate kinase [EC:2.7.2.2]),和鸟氨酸氨甲酰基转移酶 (*argF*, ornithine carbamoyltransferase[EC:2.1.3.3]) 表达水平分别上调 35 倍,18.05 倍和 30.84 倍。另外 SAOUHSC_02967 为一个推测的蛋白精氨酸鸟氨酸转运体 (*arcD*, arginine/ornithine antiporter),也在转录水平上调了 25.03 倍(表 4)。其他相关基因:

argR 上调 2.56 倍, *ArgR* (Arginine repressor proteins,同 *Bacillus subtilis* 中的 *AhrC*) 是一个多功能的酶,广泛存在于革兰阳性菌和革兰阴性菌中,具有抑制精氨酸合成和激活精氨酸代谢途径的作用^[22]。

综上,亚抑制剂量的螺旋霉素 I 特异的激活 *S. aureus* ATCC29213-R 中的精氨酸脱亚氨基酶途径。文献[23-25]报道,精氨酸脱亚氨基酶途径可以在厌氧条件下和存在电子传递链缺陷的小菌落变种中将外源的精氨酸转变为氨甲酰磷酸、二氧化碳、水、氨和 ATP(图 3)。而精氨酸脱亚氨基酶途径可能和细菌 pH 稳态及生物膜的形成相关^[26-28]。Thurlow 等^[29]报道某些 MRSA 菌,如 USA300 CA-MRSA 中存在的 ACME-Arc (arginine catabolic mobile element-Arc) 系统的增强可能和细菌适应人体酸性皮肤表面和增强的毒力相关,但在 MSSA 中很少有报道。本研究中发现 MSSA 来源的 23S rRNA SNP 突变株在亚抑制剂量的螺旋霉素 I 条件下,可激活精氨酸脱亚氨基酶途径。

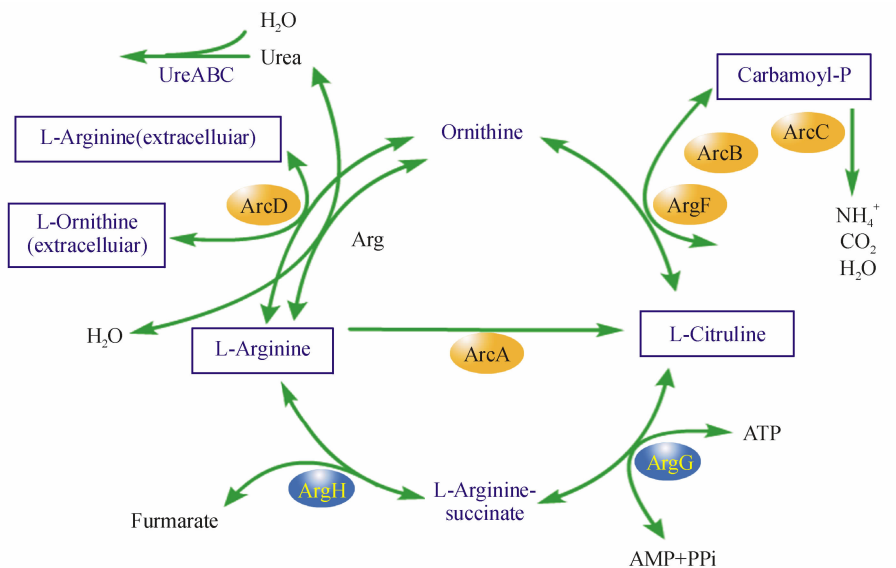


Figure 3 Differentially expressed arginine metabolism-related genes^[27] in spiramycin I-treated *S. aureus* ATCC29213-R compared to the control. Note: The red colour represents up-regulated genes, and green represents down-regulated genes

Table 4 Arginine metabolism-related genes that were differentially expressed in spiramycin I-treated *S. aureus* ATCC29213-R compared to the control

Gene	Protein name	29213-R_Control_FPKM	29213-R_SPMI_FPKM	Fold-change	-lg(<i>Q</i> value)
<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase (ASAL) (EC 4. 3. 2. 1) (Argininosuccinase)	158. 11	11. 71	- 13. 51	53. 98
<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase (EC 6. 3. 4. 5) (Citrulline--aspartate ligase)	121. 18	5. 65	- 21. 45	61. 72
<i>arcA</i>	Arginine deiminase (ADI) (EC 3. 5. 3. 6) (Arginine dihydrolase) (AD)	75. 00	2 624. 91	35. 00	87. 41
<i>arcC</i>	Carbamate kinase 2 (EC 2. 7. 2. 2)	247. 63	4 469. 61	18. 05	62. 22
<i>arcR</i>	HTH-type transcriptional regulator ArcR	287. 20	4 792. 47	16. 69	59. 35
<i>argF</i>	Ornithine carbamoyltransferase (OTCase) (EC 2. 1. 3. 3)	115. 75	3 569. 87	30. 84	82. 73
<i>argR</i>	Arginine repressor	7. 44	19. 03	2. 56	2. 01
<i>SAOUHSC_02967</i> (<i>arcD</i>)	Arginine/ornithine antiporter, putative	140. 01	3 504. 06	25. 03	74. 81

螺旋霉素 I 处理后 *S. aureus* ATCC29213 的核糖体蛋白基因表达强烈上调,这可能是由于螺旋霉素 I 对蛋白质合成缺陷的正反馈调节。另外,核糖体功能缺陷使生命活动相关的各种酶缺乏,包括转录酶系,进一步导致 *S. aureus* ATCC29213 基因表达的大规模下调。那些下调的基因参与了许多主要的代谢途径,如糖酵解和糖异生过程。DAVID 数据反映的 *S. aureus* ATCC29213 的代谢通路富集情况可以用螺旋霉素 I 抑菌原理解释,进一步确定了本方法的可行性,并从侧面验证了本研究的其他结论。

4 结 论

抗生素污染和细菌耐药性是本世纪严重的公共卫生问题。在本研究中,本实验室模拟了暴露在

抗生素环境中细菌,结果发现 16 元环大环内酯类抗生素螺旋霉素 I 可导致其在敏感型金黄色葡萄球菌 23S rRNA 的作用靶位 A2062C 突变,这一位点突变在金黄色葡萄球菌中是首次报道。另外,转录组分析数据表明,螺旋霉素 I 可显著上调 A2062C 突变菌株精氨酸脱亚氨途径的上调表达,此通路的上调表达在 MSSA 菌株中亦是首次报道,通过过往文献可预测此通路上调可使该耐药菌株更适应其在人体皮肤定植和逃避人体免疫,具体机制还需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Jarvis WR, Schlosser J, Chinn RY, et al. National prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients at US

- health care facilities[J]. *Am J Infect Control*, 2007, **35**(10):631–637.
- [2] Wallwork B, Coman W, Mackay-Sim A, *et al.* A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis[J]. *Laryngoscope*, 2006, **116**(2):189–193.
- [3] Gaynor M, Mankin AS. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance[J]. *Curr Top Med Chem*, 2003, **3**(9):949–961.
- [4] Starosta AL, Karpenko VV, Shishkina AV, *et al.* Interplay between the ribosomal tunnel, nascent chain, and macrolides influences drug inhibition[J]. *Chem Biol*, 2010, **17**(5):504–514.
- [5] Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics[J]. *J Infect Chemother*, 1999, **5**(2):61–74.
- [6] Fajardo A, Martinez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, **11**(2):161–167.
- [7] Qin N, Tan X, Jiao Y, *et al.* RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol[J]. *Sci Rep*, 2014, **4**:5467.
- [8] Scherl A, Francois P, Charbonnier Y, *et al.* Exploring glycopeptide-resistance in *Staphylococcus aureus*: a combined proteomics and transcriptomics approach for the identification of resistance-related markers[J]. *BMC Genomics*, 2006, **7**:296.
- [9] Fischer A, Yang SJ, Bayer AS, *et al.* Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, **66**(8):1696–1711.
- [10] Bernardo K, Pakulat N, Fleer S, *et al.* Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(2):546–555.
- [11] Yun SH, Choi CW, Kwon SO, *et al.* Quantitative proteomic analysis of cell wall and plasma membrane fractions from multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Proteome Res*, 2011, **10**(2):459–469.
- [12] Joung DK, Joung H, Yang DW, *et al.* Synergistic effect of rhein in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Exp Ther Med*, 2012, **3**(4):608–612.
- [13] Lee HH, Molla MN, Cantor CR, *et al.* Bacterial charity work leads to population-wide resistance[J]. *Nature*, 2010, **467**(7311):82–85.
- [14] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nat Methods*, 2008, **5**(7):621–628.
- [15] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, **26**(1):139–140.
- [16] Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, *et al.* The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, **39**:561–568.
- [17] Hansen JL, Ippolito JA, Ban N, *et al.* The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit[J]. *Mol Cell*, 2002, **10**(1):117–128.
- [18] Depardieu F, Courvalin P. Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, **45**(1):319–323.
- [19] Furneri PM, Rappazzo G, Musumarra MP, *et al.* Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of *Mycoplasma hominis*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, **45**(10):2958–2960.
- [20] Pereyre S, Guyot C, Renaudin H, *et al.* *In vitro* selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(2):460–465.
- [21] Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. antimicrob agents[J]. *Chemother*, 1995, **39**(3):577–585.
- [22] Charlier D. Arginine regulation in *Thermotoga neapolitana* and *Thermotoga maritima*[J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, **32**(2):310–313.
- [23] Hubscher J, Jansen A, Kotte O, *et al.* Living with an imperfect cell wall: compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus*[J]. *BMC Genomics*, 2007, **8**:307.
- [24] Kohler C, Eiff C, Peters G, *et al.* Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach[J]. *J Bacteriol*, 2003, **185**(23):6928–6937.
- [25] Seggewiss J, Becker K, Kotte O, *et al.* Reporter metabolite analysis of transcriptional profiles of a *Staphylococcus aureus* strain with normal phenotype and its isogenic *hemB* mutant displaying the small-colony-variant phenotype[J]. *J Bacteriol*, 2006, **188**(22):7765–7777.
- [26] Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, *et al.* Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. *J Bacteriol*, 2004, **186**(14):4665–4684.
- [27] Resch A, Rosenstein R, Nerz C, *et al.* Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(5):2663–2676.
- [28] Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms[J]. *J Infect Dis*, 2005, **191**(2):289–298.
- [29] Thurlow LR, Joshi GS, Clark JR, *et al.* Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, **13**(1):100–107.