

· 综述 ·

以病原菌群体感应系统为靶标的新型抗菌药物的研究进展

尹守亮, 常亚婧, 邓苏萍, 王清池, 于文功, 官倩红*

(中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 近年来, 日益严重的细菌耐药性成为全球关注的焦点, 尤其是南亚发现的新型“超级细菌”几乎对绝大多数抗生素都具有抗性, 在世界范围内引起了恐慌。对病原菌致病机制的研究发现, 许多病原菌的致病机制都依赖细菌群体感应系统的调节和控制。筛选高效的群体感应抑制剂有望成为解决细菌感染以及耐药性问题的一个有效途径。本文主要阐述了细菌群体感应信号调控系统、群体感应抑制因子体外筛选模型及体内动物模型评价, 群体感应抑制因子的研究近况等内容。

关键词: 细菌耐药性; 新型抗菌药物; 群体感应

中图分类号: R978

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0613-09

Research progress of new antibacterial drugs that target bacterial quorum sensing systems

YIN Shou-liang, CHANG Ya-jing, DENG Su-ping, WANG Qing-chi, YU Wen-gong, GONG Qian-hong*

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, College of Medicine and Pharmacy,
Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In recent years, antibiotic resistance of bacteria has become a global health crisis. Especially, the new class of “superbug” was found in South Asia, which is resistant to almost known antibiotics and causes worldwide alarm. Through the underlying mechanisms of bacterial pathogenicity, the expression of many pathogen virulence factors is regulated by the process of quorum sensing. Screening efficient quorum sensing inhibitors is an especially compelling approach to the future treatment of bacterial infections and antibiotic resistance. This article focuses on bacterial quorum sensing system, quorum sensing screening model for *in vitro* and evaluation of animal models *in vivo*, recent research of quorum sensing inhibitors and so on.

Key words: antibiotic resistance; new antibacterial drug; quorum sensing

细菌感染一直威胁着人类健康, 而抗生素的发现, 特别是青霉素, 作为最早的抗菌药物, 曾成功地解决了临床上的金葡菌等病原菌感染的难题。随后, 各种类型抗生素的开发及其临床上的广泛应用更是为人类健康做出了巨大的贡献。然而, 感染性疾病并未随着抗菌药物的不断发现和大量使用而减轻

或消失, 例如南亚新发现的“超级细菌”一般携带 NDM-1 基因, 其产物能对青霉素、头孢霉素等在内的大部分抗生素都产生极强的抵抗作用^[1]。这些具有极强抗药性的“超级细菌”的出现, 使人们意识到解决细菌耐药性的问题已迫在眉睫。目前临床上广泛使用的抗生素都是以细菌的蛋白质合成、细胞壁合成、叶酸合成等重要生命代谢过程为靶点, 直接杀死微生物或抑制微生物生长, 在这种生存压力的选择下, 病原微生物逐渐产生耐药性^[2]。这使得人们逐渐认识到以传统方法筛选获得的抗菌药物已无法从根本上解决细菌耐药性问题。通过寻找新的靶点开发新

收稿日期: 2010-12-20.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA09Z418); 中国海洋大学海洋药物教育部重点实验室开放基金资助项目 (KLMD (OUC) 200806).

*通讯作者 Tel: 86-532-82032067, Fax: 86-532-82033054,

E-mail: gongqh@ouc.edu.cn

型抗菌药物已成为生物医学领域的一项紧迫课题。近年来,细菌群体感应系统成为药物研究者关注的焦点。针对该信号系统筛选的抗菌药物与传统抗生素相比,优点在于它能有效阻断病原菌的毒力因子的生成,但不影响细菌的生长,因此不会对细菌耐药性产生选择性压力^[3]。

1 群体感应

Fuqua 等^[4]在 1994 年,首先提出细菌具有群体感应现象 (quorum sensing, QS)。QS 是细菌根据自身细胞密度变化进行自我协调的一种群体行为。许多细菌产生并释放一种自诱导物 (auto inducer, AI) 的信号分子,随着细胞密度的增加,信号分子逐渐积累,当达到一定浓度时则会与细胞浆或细胞膜上的受体蛋白结合,激活或抑制相关基因的表达,从而使细菌形成一种群体行为来有效地抵御环境压力、攻击宿主等^[5]。根据不同种属的 QS 调控机制,细菌信号分子主要分为 3 类^[6]: 第 1 类是革兰阴性菌的由酰化高丝氨酸内酯 (acyl-homoserine lactones, AHLs) 介导的 QS 系统,其信号分子为 AHL; 第 2 类是革兰阳性菌的由自诱导肽 (autoinducing peptide, AIP) 介导的 QS 系统,其信号分子为氨基酸或短肽; 第 3 类是革兰阴性菌和阳性菌中都存在的一类信号系统,其信号分子为喹啉酮二酯 (AI-2)。

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种常见的革兰阴性致病菌,是引起病人在住院期间发生感染的第三大致病菌^[7]。其 QS 系统主要由基于 AHL 的 *las* 系统和 *rhl* 系统以及 PQS (pseudomonas quinolone signal, PQS) 信号系统组成 (图 1)^[8, 9]。随着细胞密度的不断上升,首先引发 *las* 系统的启动, LasI 合成的信号分子 3-氧十二烷酰高丝氨酸内酯 (3-oxo-C12-HSL, 3-oxododecanoyl-homoserine lactone) 与胞浆受体蛋白 LasR 结合形成复合物 (LasR-AHL), 结合到靶基因 DNA 启动子区域,激活一系列毒力基因如弹性蛋白酶、胞外酶 S、氢氰酸等表达,同时也能够促进 3-oxo-C12-HSL 的合成,形成一个正反馈调节。*rhl* 系统中, *rhlI* 编码的丁基高丝氨酸内酯 (C4-HSL, butyl-homoserine lactone) 与 RhlR 结合形成复合物 (RhlR-AHL), 激活其他一些毒力因子包括稳定期 σ 因子、绿脓菌素、鼠李糖脂等的产生,同时也能够促进 C4-HSL 分子的合成。而 PQS 系统是以 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮 (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) 为信号分子的调控系统。PQS 系统不仅能够诱导弹性蛋白酶 *lasB* 基因表达,促进绿脓菌素等生成,同时也能够调节 *rhlR* 和 *rhlI* 的表达^[10, 11]。

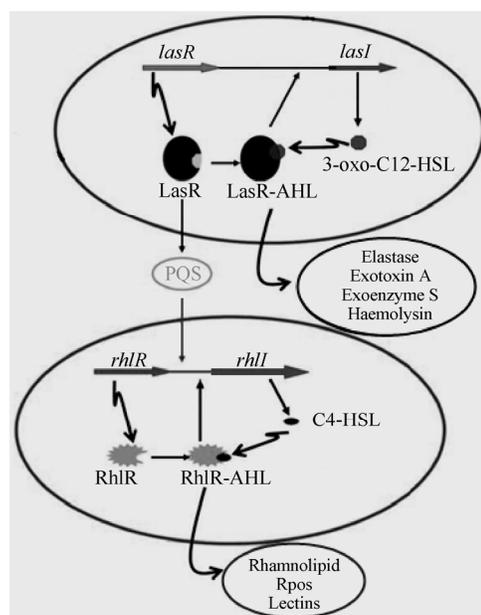


Figure 1 *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing system

许多病原菌的毒力因子都受到其相应 QS 系统的调节和控制,但细菌 QS 系统缺失或突变菌株的生长状况与野生型相比并不会发生显著变化。例如, *lasI* 突变, *rhlI* 突变或者 *lasI-rhlI* 双突变的铜绿假单胞菌在丰富培养基上 30 °C 和 37 °C 的生长速度与野生型相比无明显差异^[12]。然而,缺失 QS 系统的菌株其致病能力显著降低^[13]。如 Bjarnsholt 等^[14]用妥布霉素 (tobramycin) 分别在对野生型铜绿假单胞菌菌株和 QS 系统缺陷菌株所形成的生物被膜进行处理时,发现 QS 缺陷菌株所形成的生物被膜内的细菌几乎全部被抗生素杀死,而对野生型菌株来说则只有生物被膜表层的细菌被杀死。由此可见,细菌 QS 系统可作为研发新的抗感染药物的理想靶标,并且以细菌的 QS 系统为靶标筛选的抗菌药物,与传统抗生素的作用机制也不完全相同,因为它在不影响细菌生长的浓度范围内,能显著抑制细菌 QS 调控的致病行为,不会对致病菌的耐药性产生选择性压力^[3, 15]。

2 群体感应抑制因子的筛选

药物筛选模型构建是现代药物开发流程中检验和获取具有特定生理活性化合物的一个关键步骤,随着细菌 QS 机制的逐步阐明,国内外已有很多实验室致力于 QS 抑制因子的筛选与研究。目前认为抑制 QS 系统主要有 3 条途径: ① 促进 AHL 信号分子的降解,已在细菌中发现有两类降解 AHL 的酶: 酰基转移酶和内酯酶^[16, 17]; ② 抑制信号分子的合成,因为 AHL 信号分子的合成主要是酰胺链的合成,所以此途径的不足之处在于抑制信号分子的合成的同时

也影响到脂肪酸代谢过程, 干扰了细菌重要的生命活动, 不能达到只抑制细菌毒力因子的产生而不杀死细菌的目的; ③ 抑制信号分子与受体蛋白的结合, 干扰信号分子与其相应受体蛋白的结合是构建药物筛选模型的理想靶点, 当前报道的大多数 QS 筛选模型也主要基于这一途径。

2.1 群体感应抑制因子指示菌株 QS 调控系统在多种细菌以及真菌中普遍存在。如野生型海洋费氏弧菌依据自身细胞密度的变化调控发光基因的表达, 借助这一发光表型, 研究者们可以直观快速筛选出 QS 抑制因子^[18, 19]。同时, QS 也能够调控细菌某些色素基因的表达^[20]。McLean 等^[21]建立了一种简单快捷的可以从共培养的细菌、真菌或相关中草药组织中筛选 QS 抑制因子的方法, 这种方法主要利用紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) 产生的紫色菌素和生金假单胞菌 (*Pseudomonas aureofaciens*) 产生的橙色的异丙嗪类色素的特点。紫色菌素在紫色杆菌中是受 QS 严格调控的, 紫色杆菌 CV026 为信号分子缺失菌株, 只有在外源加入信号分子 C6-HSL 后, 才能够启动 QS 调控的紫色菌素的产生, 若有 QS 抑制因子的存在, 则能抑制紫色菌素的生成, 在琼脂板培养基的加样孔周围表现出浑浊而不透明的圆圈。同理橙色异丙嗪类色素的产生也是受生金假单胞菌 QS 系统严格调节的, 通过判断橙黄颜色的变化可以初步筛选 QS 抑制因子。因此, 紫色杆菌和生金假单胞菌通常可以作为一种简便、直观的 QS 抑制因子筛选模式菌株。

该类方法的优点是适合大量样品的粗筛, 也适合于经萃取得到的不同组分的活性分析或薄层色谱分离后的功能化合物初步鉴定, 筛选方法简便易行; 但其缺点为不能完全确定不产生色素部位为待测样品干扰了紫色杆菌 QS 系统, 还是抑制了紫色菌素基因的表达, 同时也有可能是样品对于菌体的生长有一定的抑制作用, 因此导致筛选出的结果假阳性率较高。

2.2 高通量 AHL 生物传感器模型及评价 应用于高通量筛选最有效的是 AHL 生物传感器模型。原理如图 2 所示, 它拥有编码信号分子受体蛋白的 DNA 序列 (*luxR*) 及相应的融合到报告基因 (*reporter: lacZ*、*gfp*、*luxCDABE* 以及 *sacB* 等) 上游的受 QS 调控的启动子 (*QS-promoter*)^[22-24]。当携带该种载体的筛选模型遇到 AHL 信号分子时, 受 QS 调控的启动子就会启动报告基因的表达。外源性 AHL 和 QS 抑制因子共

同存在时, AHL 诱导的基因转录水平降低, 进而报告基因的表达水平减少或消失, 即检测系统通过报告基因给出的报告信号的强弱来判断 QS 抑制因子的存在。

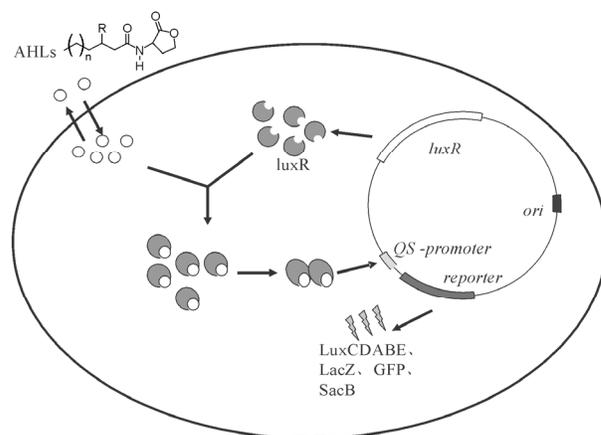


Figure 2 Construction and use of bacterial AHL biosensor

Shaw 等^[25]首先以 *lacZ* 为报告基因建立了一系列检测多种不同 AHL 信号分子的重组载体, 该模型借助薄层色谱 (TLC) 和质谱 (MS) 技术也能鉴定细菌的菌液中存在的一些未知信号分子或信号分子的类似物。Andersen 等^[26]利用 *gfp* 为报告基因构建了一系列针对多类 AHL 信号分子的报告菌株, 该类载体相对于 *lacZ* 模型来说, 具有较高的灵敏度, 可在单个细胞水平上检测荧光信号强度, 甚至对于低至 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-oxo-C6-HSL (*N*-3-oxohexanoyl-*L*-homoserine lactone), 仍能检测到。

荧光发光是通过外源激发光激发荧光基团到达高能状态后产生发射光。常用的有绿色荧光蛋白 (GFP)、红色荧光蛋白 (DsRed) 及其他荧光报告基团。使用 *luxCDABE* 为报告基因, 与荧光蛋白或者产色素 (如 *lacZ*) 的筛选菌株相比较有很多优点: 它不需要外源激发光或外加任何底物就能产生发光现象, 检测方便; 相对于绿色荧光蛋白, *luxCDABE* 操纵子的背景噪音很低, 而荧光发光在较长波长的发射光激发下, 细胞内很多物质也可能会发出荧光, 这种非特异性荧光产生很强的背景噪音, 而且很难完全消除; 产色素的模式细菌对基因的调节和表达一般只局限于定性研究, 不能反映出基因的实时定量表达情况, 以 *luxCDABE* 为报告基因的筛选模型能对反应物的检测起始时间缩短到 5 min, 进行连续的监测。西北大学段康民教授基于 *LuxCDABE* 构建了一系列筛选 QS 抑制因子的重组载体^[27-29], 如 *rhIA-luxCDABE*、*lasI-luxCDABE* 等, 利用这些筛选模型对西北的中草

药资源进行筛选,发现一种爵床科植物和一种萝藦科植物的提取物具有较强的 QS 抑制活性。但是培养基中的 pH 值、培养基的种类、抗菌物质和转入基因的大小有时可能会影响 *luxCDABE* 的表达。

Rasmussen 等^[2]构建了一系列高通量 QSI (quorum sensing inhibitor selectors) 筛选模型。其中 QSI2 模型的主要原理是在铜绿假单胞菌 QS 调控的 *lasB* 启动子后融入了蔗糖致死基因 *sacB* 作为报告基因,在有蔗糖底物存在的情况下,信号分子 3-oxo-C12-HSL 和 LasR 蛋白结合,启动 *lasB* 启动子下游致死基因 *sacB* 的表达,杀死菌体细胞,若存在 QS 抑制因子如阳性对照物呋喃酮 C30 (furanone),致死作用则会得到补救,通过向培养基中加入活菌染色剂 TTC (2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑) 可以直观地对活菌、死菌进行定性的检测和观察。

AHL 生物传感器模型的优点在于可以用于样品的高通量筛选,灵敏度高,节约样品量,无需破坏生物的生命,保证了在自然状态下研究活细胞(甚至动物)及其生理活动。研究者对 AHL 生物传感器模型的灵敏性进一步优化,筛选方法上进行扩展,直接利用 QS 信号分子合成酶基因 *lasI*、*rhII* 及 *luxI* 等启动子分别与 *luxCDABE*、*gfp*、*sacB*、*lacZ* 等报告基因融合构建筛选载体,由于直接使用 QS 信号转导系统的调控原件,使得筛选更加具有目的性,筛选结果更为准确^[30, 31]。但是对于以重组质粒载体构建的 QS 筛选模型,除了 QS 抑制因子,还包含其他一些因素也能引起信号的减少或降低。一些毒性化合物(如抗生素)在非致死浓度下,细菌生长受到一定限制,蛋白质表达量减少,相应传感器模型上报告基因生成的报告信号 (*luxCDABE*、*lacZ*、*gfp*) 也会减少,因此筛选时可能会出现假阳性结果。以 *sacB* 报告基因构建的筛选模型可以避免这一情况,因为筛选的阳性样品都能够使菌体复活,而不是杀死细菌,所以筛选的样品多为对菌体无毒的化合物。经反复实验验证,筛选一种 QS 抑制因子,可以首先使用 *sacB* 模型进行初筛,做初步定性的筛选,再利用 *luxCDABE*、*lacZ*、*gfp* 等模型进一步量化,充分保证筛选结果准确可靠。

用质粒做模型具有一定的局限性,如质粒的拷贝数在一定程度上会限制模型的灵敏度,因此 Hentzer 等^[32]将 *lasB-gfp* 基因整合入野生型铜绿假单胞菌 PAO1 基因组中,让报告基因在单拷贝水平上指示 QS 抑制因子的作用强度,并用该模型成功测试了呋喃酮 C56 的活性。最值得一提的是,Williamson 等^[33]建立了一个从宏基因组文库中高通量筛选 QS 抑制因

子的模型,该模型是将携带宏基因组片段的载体与 QS 抑制因子报告载体一起构建成库,当外源加入信号分子后,宏基因组片段如果产生 QS 抑制因子,则会降低报告基因的表达;相反,宏基因组片段如产生 QS 激活因子,则会促进报告基因的表达。该模型将抑制因子的表达与筛选同时在一个细胞内完成,有效地提高了筛选的灵敏度。但目前由于要求较高的实验设备条件和较为繁琐的操作步骤等因素使得该筛选方法并未得到广泛的应用。

2.3 计算机模拟药物筛选群体感应抑制因子 计算机辅助模拟药物设计 (computer aided drug design) 是以计算机、生物学、化学等为基础,通过计算机模拟、计算和预算药物与受体生物大分子(如蛋白质)之间的关系,设计和优化先导化合物的方法。目前,大多数信号分子受体蛋白(如 LasR、TraR)的三维立体结构得到阐释,研究者们根据蛋白结构及信号分子的物理化学性质等,模拟和计算受体蛋白与信号分子的这种相互作用。中山大学周世宁等^[34]利用 DOCK 5.3.0 软件对中国传统中药资源进行筛选,得到 5 个具有抑制铜绿假单胞菌 QS 的活性化合物,其中黄芩素对于细菌生物被膜的半数有效抑制浓度 (IC₅₀) 仅为 10 μmol·L⁻¹。Marsden 等^[35]通过对软腐欧文菌和铜绿假单胞菌信号分子受体蛋白的空间结构定位模拟,发现氯吡啶及其类似物具有较好的抑制活性,它对于铜绿假单胞菌 QS 调控表型具有明显的抑制作用,其 IC₅₀ 为 10~20 μmol·L⁻¹,而对于欧文菌,IC₅₀ 为 5 μmol·L⁻¹。计算机模拟药物筛选技术越来越受到广泛的关注,筛选成本较低,极大地提高了开发新型药物的效率,但是该方法需要建立一个具有包罗万象小分子化合物库的三维芯片辅助筛选平台。

2.4 群体感应抑制因子体内动物模型评价 在西方,铜绿假单胞菌引起的慢性肺部感染是一种高致死率疾病。据统计 20%~30% 院内感染的病原菌是铜绿假单胞菌,其中囊性纤维化和弥漫性支气管炎末期感染率分别能达到 90% 和 85%,是此类患者死亡的主要原因。建立一种简便高效的动物筛选模型,加强对该疾病药物的评价是非常重要的^[36]。国外较早建立了铜绿假单胞菌慢性肺部感染的动物模型。Cash 和 Pedersen 等^[37, 38]分别将细菌包裹于琼脂小珠或黏性藻酸盐中,接种于小鼠支气管上使小鼠患病;Yu 等^[39, 40]则采用的是吸入细菌气溶胶的方法。这些模型为研究慢性肺部感染的病因、治疗机制等提供了极大的便利。Hentzer 和 Rasmussen 等^[32, 41]将细菌通过藻酸盐介质植入到小鼠肺部形成类似于囊性纤维化

患者的肺部感染,在体内直接证明呋喃酮 C30、青霉素及棒曲霉素等 QS 抑制因子能很好地清除患病小鼠肺部组织的铜绿假单胞菌。目前,一些研究人员对该实验技术的操作方法进行了适当改进,使之更加简便易行^[42]。Imamura 等^[43]将包被细菌的塑料导管置入小鼠一侧支气管上来建立慢性感染模型。该模型优点在于小鼠患感染部位局限于肺部,其他器官组织不会受到影响,但操作较为困难。在国内,许多学者也进行了各种尝试。一些研究人员将培养好的菌液直接滴入到小鼠气管中,该方法很容易因操作者手法差异造成很大误差,而且菌液滴入的确切位置较难固定和控制。有研究者将动物颈部皮肤切开,暴露气管,用皮试针头将菌液注入气管内,这较前面的做法可以准确地将菌液接种到既定位置,但对动物创伤大,也不能完全避免“手术”引发的其他感染。

哺乳动物由于对无菌实验条件要求较高,操作步骤繁琐,而且感染周期较长。为了能够对 QS 抑制因子进行简便、快速、有效的体内评价,一些研究人员将目光转移到了模式生物——线虫模型和拟南芥模型上^[44]。秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 是一种微小的土壤线虫(自由生活),以细菌为食物,自胚胎发育成 1 mm 长的成虫只需 3 天,结构简单。在线虫整个发育过程中,身体几近透明,易于在光学显微镜下进行活体观察。Gallagher 等^[45]首先报道在(BHI) agar 板上生长的野生铜绿假单胞菌 PAOI 能够使线虫致死,然而,一些毒力因子突变株却大大降低了线虫的致死率。将野生型 PAOI 与线虫共培养,当 QS 抑制因子存在时,与对照相比线虫的致死率明显降低。Rasmussen 等用该模型进一步证明了大蒜提取物和 4-NPO 能明显降低铜绿假单胞菌 PAOI 对线虫的致死率。但是最值得一提的是,由于线虫的透明身体,该模型还便于观察细菌在线虫肠腔内的定植和生物被膜的形成。拟南芥属于拟南芥属十字花科,生命周期短,从播种到种子收获仅需 6~8 周,个体微小,适合实验室种植,一直作为模式生物广泛用于生物医学领域的研究。人们一直认为感染人类的致病菌是不能感染植物的,Rahme 等^[46]报道铜绿假单胞菌 PA14 除了能感染人体外,还能使多种植物叶面致病,并且通过对拟南芥叶面感染模型和小鼠皮肤全层烧伤模型比较,初步证明模式植物也可以作为致病菌感染模型。Walker 等^[47]进一步证明人类致病菌 PAOI 能够在试管和土壤中感染拟南芥根际,在根际释放毒力因子,形成生物被膜,且外观表型和致死率直接和毒力因子相关。Rudrappa 等^[48]首次成功利用了拟

南芥根际和叶面感染模型,证明姜黄的主要成分姜黄素在亚抑菌浓度范围内明显抑制铜绿假单胞菌 QS 调控的毒力基因的表达。

3 群体感应抑制因子研究近况

3.1 天然产物来源 人们首先从生态学的角度发现,澳大利亚红色巨藻 (*Delisea pulchra*) 通过产生一系列呋喃酮类化合物有效地抑制细菌黏附,阻止细菌定植在自身表面。研究人员对天然呋喃酮进行化学修饰,人工合成了一系列卤代呋喃酮类似物,其中呋喃酮 C30 和 C56 活性最好,无论在体内还是体外都表现出对铜绿假单胞菌 QS 系统调控的毒力因子有着明显的抑制作用^[49]。在北美,金缕梅提取物曾经被本土美国人用来缓解疼痛、感冒、发烧等各种炎症,Kiran 等^[50]由金缕梅的树皮和叶子中分离得到其活性组分——金缕梅单宁,它能够很好地干扰表皮葡萄球菌和耐甲氧西林金葡萄球菌的 QS 系统,实验表明金缕梅单宁能够显著降低细菌的黏附,抑制细菌生物被膜的形成。

自然环境中,多种微生物为了争夺生存空间和营养物质,彼此间存在着激烈的竞争,经过长时间的进化,微生物可能会产生多种多样的次级代谢产物来参与种群之间的信息交流,干扰或抑制其他微生物的正常生命活动^[51]。来源于青霉菌属 (*Penicillium*) 的两种次级代谢产物青霉酸 (penicillic acid) 和棒曲霉素 (patulin) 首先被鉴定为具有 QS 抑制活性^[41]。DNA 芯片分析表明,青霉酸和棒曲霉素均能够特异性作用于铜绿假单胞菌中受 QS 调控的基因表达。Teasdale 等^[18]由喜盐芽孢杆菌 (*Halobacillus salinus*) 发酵液中分离得到两种醋酸苯乙酯类化合物,该化合物在不影响致病菌生长的浓度范围内,抑制哈氏弧菌 QS 调控的发光基因的表达,同时也能够有效降低紫色杆菌 QS 调控紫色菌素的产量。

3.2 小分子化合物库筛选 受体蛋白一般半衰期很短或不稳定,只有与信号分子结合之后才能高效率地结合到靶基因启动子区,信号分子与受体蛋白特异性结合是细菌通过 QS 调节基因表达的一个关键步骤,因此,细菌信号分子在致病菌攻击宿主、引发感染的过程中发挥着重要的作用^[34]。研究者们根据信号分子化学结构,进行多种化学修饰和改造,合成大量的信号分子类似物。Swem 等^[19]发现,氯硫内酯 (chloro thiolactone) 和氯内酯 (chloro lactone) 具有紫色杆菌和哈氏弧菌两种致病菌的 QS 抑制活性。凝胶迁移率电泳分析表明,氯硫内酯及氯内酯能够和紫色杆菌的信号分子竞争性地与受体蛋白 CviR 结

合, 阻断受体蛋白结合到紫色菌素合成酶基因的启动子上, 降低靶基因的表达; 同时两种化合物也能够抑制哈氏弧菌 LuxN 调控的发光基因的表达。

研究者对一些已知的有机小分子化合物库进行随机筛选, 发现一系列有效抑制病原菌 QS 的单体化合物^[52]。Rasmussen 等利用 QSiS 系列筛选模型发现了多个能够阻断 lux 和 las 群体感应系统的化合物。如 4-硝基吡啶-N-氧化物 (4-NPO)、2, 4, 5-三溴咪唑、咪唑、三硝基苯磺酰胺等, 其中 4-NPO 最为有效。德克萨斯大学 (犹他州) 西南医学研究中心通过对 15 万个有机小分子化合物进行筛选^[53]发现, 4-[(苯胺基) 硫代甲基] 氨基-N-苯基苯磺酰胺 (LED209) 能够有效干扰大肠杆菌、沙门菌、弗朗西斯菌的 QSeC 调控系统^[54], 降低 QS 调控的毒力基因的表达, 由于 LED209 具有极低的细胞毒活性, 目前该化合物已经进入了前期临床研究阶段。

4 展望

病原菌释放毒力因子, 侵袭宿主细胞也并不仅仅依靠 QS 系统, 大多数细菌还能通过自身双组分信号转导系统^[55, 56]、III 型分泌系统^[57]、药物外排泵系统^[58, 59]以及形成生物被膜^[60]等方式来达到感染人体组织的目的, 例如耶尔森菌 (*Yersinia*) 主要通过自身的 III 型分泌系统来感染人体细胞, 瓦解人体免疫系统^[61, 62]。细菌 QS 调控系统与这些致病机制之间的复杂联系有待研究者进一步阐明, 通过对病原菌致病机制的充分研究有助于研究者进一步开发出更为新颖、更为有效的抗感染药物。一些机会致病菌(如铜绿假单胞菌、黏质沙雷菌、小肠结肠炎菌等), 其 QS 系统能够调控相关致病因子的产生, 如毒素的生成等^[13, 63]。但有学者研究^[64]显示, 从患囊性纤维化病人的肺部分离出大量铜绿假单胞菌 QS 系统缺失突变株, 说明一些 QS 调控系统缺失菌株仍然能够感染人体正常细胞, 对这一现象还需大量实验加以解释说明。从宏观角度, 对于细菌 QS 调控机制的研究, 一些研究者^[65-67]开始努力去揭示原核细菌的 QS 调控机制与生物的社会进化之间的复杂关系。

细菌 QS 系统的研究为确认特异性的细菌毒力因子控制位点, 以及合理设计抗毒力药物提供了靶点。阻断细菌 QS 调控系统的药物可以使病原菌失去致病能力而不对其生存产生选择压力, 因而在理论上产生抗药性的几率较小。近几年来, 许多专门研究抗细菌 QS 和生物被膜的生物医药公司相继出现, 如 QSi Pharma A/S (Lyngby, Denmark); Microbia (Massachusetts, USA); Quorex Pharmaceuticals Inc. (California,

USA) 和 4SC AG (Martinsried, Germany) 等^[68]。理想的 QS 抑制因子应该是导致受 QS 调控的基因的表达量明显降低的低分子量化合物, 并且对 QS 调控原件表现出高度特异性, 对菌体和真核宿主细胞都无副作用, 同时它们还应该具有稳定的化学结构, 能够抵抗高等宿主机体的新陈代谢和清除作用^[69]; 新型药物开发应借助多种手段, 既可以通过天然产物分离手段来获取天然活性化合物, 也可以通过小分子化合物库的随机筛选来获得已知药物, 近几年, 随着电子科学技术的飞速发展, 更应有目的性的借助计算机辅助模拟药物设计的方法来发掘新型 QS 抑制因子。

除了 LED209, 绝大多数 QS 抑制因子存在的缺点主要是还不能广泛应用于医药研究, 其主要原因是它们对真核宿主细胞具有一定的细胞毒性, 如来自青霉菌属的代谢产物 (青霉素、棒曲霉素等) 均已证明对人体细胞有毒, 开发新型 QS 药物应遵循安全性的原则。因此寻找对人体无毒的 QS 候选药物已成为筛选 QS 抑制因子的新要求。QS 抑制因子多为毒性较低或无毒的样品, 对于毒性较强的 QS 抑制因子也可以用化学的方法对其进行改造修饰, 降低毒性。Vattem 等^[70]建议从一些食源性植物、保健水果、蔬菜中寻找 QS 抑制因子, 并进行了一些初步探索, 证明了这一策略是筛选安全的 QS 抑制因子的一个全新理念。此外, 对于开发这种新型的抗感染药物还存在一些不利因素, 如不同种属的微生物利用不同类型化学结构信号分子, 并且其 QS 调控方式也存在着一定差别, 因此发现广谱的针对多种病原菌 QS 系统的抑制因子还存在一定困难。研究者可以试着用低剂量的抗生素和 QS 抑制因子联合给药, 这可能会起到更好的治疗效果。

中草药是我国丰富的医用化合物的宝藏, 例如姜黄 (*Curcuma longa*) 是我国的一种传统中药, 具有行气活血、通经止痛等多种功效。姜黄提取物中的酚类化合物姜黄素 (curcumin) 能够降低铜绿假单胞菌 QS 调控的多种毒力因子, 如生物被膜的形成、绿脓菌素、弹性蛋白酶甚至 AHL 信号分子的合成等^[47]。因此, 一些传统的抗细菌感染的中药资源应该引起人们的广泛关注^[71]。而近年来, 随着我国海洋活性物质研究的深入, 已从海洋动植物、微生物中发现了大量具有新颖化学结构和特异生理功能的化合物, 其中许多具有良好的抗菌、抗病毒、抗肿瘤等活性, 海洋微生物通过人工条件发酵培养, 可以提供稳定的天然产物来源。临床上广泛使用的抗感染药物也大多

来源于对天然活性化合物的修饰和改造, 因此, 从海洋生物资源中筛选具有 QS 抑制活性的次级代谢产物也是一条十分必要且有希望的途径^[72, 73]。

References

- [1] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10: 597–602.
- [2] Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187: 1799–1814.
- [3] Njoroge J, Sperandio V. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2009, 1: 201–210.
- [4] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176: 269–275.
- [5] Bassler BL. Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse [J]. *Harvey Lect*, 2004, 100: 123–142.
- [6] Platt TG, Fuqua C. What's in a name? The semantics of quorum sensing [J]. *Trends Microbiol*, 2010, 18: 383–387.
- [7] Bjarnsholt T, Jensen PO, Jakobsen TH, et al. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e10115.
- [8] Raina S, De Vizio D, Odell M, et al. Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54: 65–84.
- [9] Veselova MA. Quorum sensing regulation in pseudomonas [J]. *Genetika*, 2010, 46: 149–158.
- [10] Rasmussen TB, Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs [J]. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296: 149–161.
- [11] Williams P, Camara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12: 182–191.
- [12] Hartman G, Wise R. Quorum sensing: potential means of treating gram-negative infections? [J]. *Lancet*, 1998, 351: 848–849.
- [13] Hentzer M, Eberl L, Nielsen J, et al. Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections [J]. *BioDrugs*, 2003, 17: 241–250.
- [14] Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent [J]. *Microbiology*, 2005, 151: 373–383.
- [15] Kalia VC, Purohit HJ. Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37: 121–140.
- [16] Uroz S, D'Angelo-Picard C, Carlier A, et al. Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria [J]. *Microbiology*, 2003, 149: 1981–1989.
- [17] Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes [J]. *J Microbiol*, 2005, 43: 101–109.
- [18] Teasdale ME, Liu J, Wallace J, et al. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 567–572.
- [19] Swem LR, Swem DL, O'Loughlin CT, et al. A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity [J]. *Mol Cell*, 2009, 35: 143–153.
- [20] Chu W, Vattem DA, Maitin V, et al. Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum* [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 692: 3–19.
- [21] McLean RJ, Pierson LS 3rd, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 58: 351–360.
- [22] Rajamani S, Sayre RT. A sensitive fluorescence reporter for monitoring quorum sensing regulated protease production in *Vibrio harveyi* [J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 84: 189–193.
- [23] Jakobsen TH, van Gennip M, Christensen LD, et al. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro* [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 692: 253–263.
- [24] Rajamani S, Sayre R. FRET-based biosensors for the detection and quantification of AI-2 class of quorum sensing compounds [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 692: 31–46.
- [25] Shaw PD, Ping G, Daly SL, et al. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6036–6041.
- [26] Andersen JB, Heydorn A, Hentzer M, et al. *gfp*-based *N*-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 575–585.
- [27] Sun W, Wang Y, Shen L, et al. A novel screening system for *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2009, 25: 1173–1179.
- [28] Liang H, Li L, Kong W, et al. Identification of a novel

- regulator of the quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 293: 196–204.
- [29] Kong W, Liang H, Shen L, et al. Regulation of type III secretion system by *Rhl* and PQS quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2009, 49: 1158–1164.
- [30] Wang LN, Zou SS, Yin SL, et al. Construction of an effective screening system for detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors and its application in bioautographic thin-layer chromatography [J]. Biotechnol Lett, 2011, in press.
- [31] Alagely A, Rajamani S, Teplitski M. Luminescent reporters and their applications for the characterization of signals and signal-mimics that alter LasR-mediated quorum sensing [J]. Methods Mol Biol, 2011, 692: 113–130.
- [32] Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound [J]. Microbiology, 2002, 148: 87–102.
- [33] Williamson LL, Borlee BR, Schloss PD, et al. Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 6335–6344.
- [34] Zeng ZR, Qian L, Cao LX, et al. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79: 119–126.
- [35] Marsden DM, Nicholson RL, Skindersoe ME, et al. Discovery of a quorum sensing modulator pharmacophore by 3D small-molecule microarray screening [J]. Org Biomol Chem, 2010, 8: 5313–5323.
- [36] Yang QM, Zhang P, Shen C. Establishment and evaluation of a chronic pulmonary infection model due to *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Respir Care Me (中国呼吸与危重监护杂志), 2008, 7: 40–42.
- [37] Cash HA, Woods DE, McCullough B, et al. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 119: 453–459.
- [38] Pedersen SS. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis [J]. APMIS Suppl, 1992, 28: 1–79.
- [39] Yu H, Hanes M, Chrisp CE, et al. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: pulmonary clearance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and inflammation in a mouse model of repeated respiratory challenge [J]. Infect Immun, 1998, 66: 280–288.
- [40] Okimoto N, Kibayashi T, Mimura K, et al. *Coxiella burnetii* and acute exacerbations/infections in patients with chronic lung disease [J]. Respirology, 2007, 12: 619–621.
- [41] Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, et al. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species [J]. Microbiology, 2005, 151: 1325–1340.
- [42] Bjarnsholt T, van Gennip M, Jakobsen TH, et al. *In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect [J]. Nat Protoc, 2010, 5: 282–293.
- [43] Imamura Y, Yanagihara K, Tomono K, et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems in a mouse model of chronic respiratory infection [J]. J Med Microbiol, 2005, 54: 515–518.
- [44] Kaplan F, Badri DV, Zachariah C, et al. Bacterial attraction and quorum sensing inhibition in *Caenorhabditis elegans* exudates [J]. J Chem Ecol, 2009, 35: 878–892.
- [45] Gallagher LA, Manoil C. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning [J]. J Bacteriol, 2001, 183: 6207–6214.
- [46] Plotnikova JM, Rahme LG, Ausubel FM. Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2000, 124: 1766–1774.
- [47] Walker TS, Bais HP, Deziel E, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation [J]. Plant Physiol, 2004, 134: 320–331.
- [48] Rudrappa T, Bais HP. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 1955–1962.
- [49] Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors [J]. EMBO J, 2003, 22: 3803–3815.
- [50] Kiran MD, Adikesavan NV, Cirioni O, et al. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening [J]. Mol Pharmacol, 2008, 73: 1578–1586.
- [51] Schwenteit J, Gram L, Nielsen KF, et al. Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp. achromogenes and the effect of the autoinducer synthase AsaI on bacterial virulence [J]. Vet Microbiol, 2011, 147: 389–397.
- [52] Amara N, Krom BP, Kaufmann GF, et al. Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond [J]. Chem Rev, 2011, 111: 195–208.
- [53] Rasko DA, Moreira CG, Li de R, et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development [J]. Science, 2008, 321: 1078–1080.
- [54] Clarke MB, Hughes DT, Zhu C, et al. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 10420–10425.

- [55] Casino P, Rubio V, Marina A. The mechanism of signal transduction by two-component systems [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2010, 20: 763–771.
- [56] Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T, et al. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13: 232–239.
- [57] Tay DM, Govindarajan KR, Khan AM, et al. T3SEdb: data warehousing of virulence effectors secreted by the bacterial Type III Secretion System [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 4.
- [58] Long QX, Zhou PF, Wu ZH, et al. Advances in the study of the microbial efflux pumps and its inhibitors development [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2008, 43: 1082–1088.
- [59] Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, et al. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33: 430–449.
- [60] Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, et al. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes [J]. *Microbiology*, 2010, 156: 392–399.
- [61] Kauppi AM, Nordfelth R, Uvell H, et al. Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia* [J]. *Chem Biol*, 2003, 10: 241–249.
- [62] Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 17–27.
- [63] Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, et al. Quorum sensing in bacterial virulence [J]. *Microbiology*, 2010, 156: 2271–2282.
- [64] Sandoz KM, Mitzimberg SM, Schuster M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15876–15881.
- [65] Rumbaugh KP, Diggle SP, Watters CM, et al. Quorum sensing and the social evolution of bacterial virulence [J]. *Curr Biol*, 2009, 19: 341–345.
- [66] Brown SP, West SA, Diggle SP, et al. Social evolution in micro-organisms and a Trojan horse approach to medical intervention strategies [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2009, 364: 3157–3168.
- [67] Coenye T. Social interactions in the *Burkholderia cepacia* complex: biofilms and quorum sensing [J]. *Future Microbiol*, 2010, 5: 1087–1099.
- [68] Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1300–1307.
- [69] Rasmussen TB, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects [J]. *Microbiology*, 2006, 152: 895–904.
- [70] Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors [J]. *Fitoterapia*, 2007, 78: 302–310.
- [71] Vandeputte OM, Kiendrebeogo M, Rajaonson S, et al. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 243–253.
- [72] Shi XC, Gong QH, Yu WG, et al. A high efficient screening method for the identification of AHL quenching bacterial isolates [J]. *Period Ocean Univ China (中国海洋大学学报)*, 2007, 37: 728–732.
- [73] Wang WS, Zou SS, Yin SI, et al. Isolation and identification of marine actinomycetes with quorum sensing inhibitory activity [J]. *Microbiology (微生物学通报)*, 2009, 36: 1372–1377.