

铜绿假单胞菌群体感应系统调控生物膜形成及应对策略研究进展*

赵方建,刘 唯 综述,陈 键[△] 审校

湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院检验二部,湖南长沙 410000

关键词:铜绿假单胞菌; 群体感应系统; 生物膜; 应对策略

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)24-3444-04

铜绿假单胞菌(PA)是一种革兰阴性的条件致病菌,同时也是常见的医院内感染菌,在 2020 年中国细菌耐药监测研究中位于非发酵菌分离率首位^[1]。其产生的外毒素、弹性蛋白酶、绿脓素等多种致病产物,可引起包括呼吸系统、循环系统、皮肤伤口和手术切口在内的多方式多部位的感染,在儿童重症血流感染中病死率甚至可达到 76%^[2]。研究表明 PA 可通过形成生物膜逃避宿主免疫系统的清除和抗菌药物的杀伤,生物膜中细菌抗性甚至比浮游菌高 1 000 倍^[3],而群体感应(QS)系统是调控 PA 生物膜形成和毒力因子产生的最重要的因素之一, QS 系统相关基因的表达,直接或间接导致了细菌生物膜的形成和毒力增强。近年来各类广谱抗菌药物及导管、内镜等侵入性操作的大量应用,更是加重了这一效应,因此对铜绿假单胞菌群体感应(PA-QS)系统调控生物膜的进一步研究尤为必要,本文就 QS 系统调控 PA 生物膜形成的机制,综合国内外相关课题研究工作和成果,寻找更多可能的应对策略,为临床治疗 PA 感染提供理论依据。

1 QS 系统

1.1 QS 系统的定义 QS 系统广泛存在于各类细菌中,PA-QS 系统调控生物膜形成则是在 1998 年由 DAVIES 等^[3]首次报道,发现 LasI-RhlI 双突变体 PA 菌株生物膜厚度仅为野生型菌株的 20%,野生型菌株生物膜为成熟的蘑菇状,而突变型菌株生物膜为片状且不连续^[3]。PA-QS 系统主要通过细菌生长过程中分泌自体诱导分子(AI)实现,细菌将此类信号分子分泌至胞外环境中,当细菌繁殖到一定密度,信号分子积聚到一定的阈值时可激发细菌 QS 系统相关基因的表达和正反馈通路,诱导细菌对特定环境条件作出反应,包括群集运动、毒力基因的表达、形成生物膜,进而导致细菌侵袭性、耐药性、免疫逃逸性的增强。

1.2 QS 系统的组成 QS 系统已知主要由 Las 系统、Rhl 系统和喹诺酮信号系统这 3 种子系统组成,研究表明 3 种子系统存在级联调控,其中 Las 系统处

于系统调节的上游位置,是整个 QS 系统的主控因子, Las 系统由 LasI 基因与受体蛋白 LasR 组成, LasI 指导酰基高丝氨酸内酯(AHL)分子 N-3-氧代-十二烷酰基-高丝氨酸内酯的合成, AHL 与受体蛋白 LasR 结合形成转录调节复合物,激活 LasI 基因自身相关毒力因子包括 LasA 蛋白酶、LasB 弹性蛋白酶、碱性磷酸酶等下游靶基因的表达。另一方面,与 Las 系统类似, Rhl 系统由 RhlI 基因和受体蛋白 RhlR 两部分组成, RhlI 指导合成信号分子 N-丁酰基高丝氨酸内酯(C4-HSL), C4-HSL 则与转录调节因子 RhlR 结合作为转录调节复合物,参与调控 RhlAB 等相关基因表达,指导鼠李糖脂、氰化物、绿脓菌素的合成^[4]。而喹诺酮系统是由信号分子 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(PQS)和其受体蛋白 PqsR 组成,先是由 MvfR 作为转录调节因子激活操纵子 PqsABCDE 基因的转录,其转录产物指导合成 PQS 的直接前体 4-羟基-2-庚基-喹诺酮(HHQ), HQ 通过单加氧酶催化成为 PQS,继而与 PqsR 结合形成转录调节复合物,指导绿脓菌素等毒力因子的表达。其中 MvfR 和单加氧酶的操纵子均受上游 Las 系统的正向调控,同时 Pqs-ABCDE 基因转录产生操纵子 PqsE,而 PqsE 可以激活 Rhl 系统的表达,故可视喹诺酮系统为 Las 系统与 Rhl 系统的桥梁,其直接受 Las 系统、Rhl 系统的调控,同时又调控着 Rhl 系统^[5-6]。随着研究深入,越来越多新的子系统和调控旁路被发现,例如一种新的 IQS 系统子系统,其 AI 结构为 2-(2-羟基苯基)-噻唑-4-碳醛。在缺乏磷酸盐的环境下 IQS 系统可以替代部分 Las 系统的功能,接管喹诺酮系统和 Rhl 系统的表达,其可以将 QS 系统与环境应激反应结合起来调节下游基因的表达^[7]。由此可以得知, QS 系统的几个子系统相互交织,控制着数百个靶基因的表达,也受多个信号旁路调控。同时 Las 系统的失活不一定会造成毒力因子表达的瘫痪,这为研究提供了新的思路,那就是 Rhl 系统及喹诺酮系统同样在 QS 系统中同样扮演重要角色,需从 QS 系统全局出发寻找更多

* 基金项目:湖南省教育厅计划项目(19C1174)。

△ 通信作者, E-mail: chenjian9240@126.com。

群感抑制的替代方案。

2 生物膜

2.1 生物膜的形成 PA 生物膜的形成是一个动态过程,初期是由浮游细菌黏附在宿主或物体表面形成微菌落状态,细菌通过Ⅳ型菌毛的蹭行运动聚集形成群落状态,其中细菌的黏附、群集及Ⅳ型菌毛均受 Las/Rhl 系统基因的调控。群落状态的细菌产生并分泌胞外多聚物(EPS),利用 EPS 形成较稳定的立体结构直至生物膜成熟。EPS 主要由胞外多糖、鼠李糖脂、胞外 eDNA、蛋白质组成^[8],形成的生物膜含有微米大小的微孔水通道用于物质交换,包括空气、水分和营养物质的传输,代谢废物的排出,细菌可以利用孔道进行信息交换^[9]。胞外多糖主要由藻酸盐、psl 多糖、pel 多糖组成,psl 和 pel 多糖均由相关基因编码的酶系合成。而 QS 系统调控合成的藻酸盐作为胞外多聚物的主要成分,是细菌生物膜物理结构的基础,起到生物膜“支架”的作用^[10],同时藻酸盐具有抗原性,能限制巨噬细胞的吞噬和炎症因子介导,干扰宿主的免疫反应^[11]。这也是黏液型 PA 更能抵抗药物和宿主的攻击,引起感染迁延不愈的原因。

2.2 生物膜的耐药机制 生物膜细菌耐药性是多因素共同作用导致的,生物膜为细菌提供了物理屏障,抗菌药物难以渗透,当药物作用于细菌时,其浓度已经远小于体外药敏实验所需的抑制浓度^[12]。同时生物膜中的酶类可以将抗菌药物酶解,使生物膜局部的药物浓度降低,以达到保护细菌的目的。加之生物膜深部细菌代谢废物的积聚,局部理化性质改变,例如 pH 值的下降和低氧环境,抗菌药物的作用环境恶劣,限制了其抗菌活性^[13]。此外,因为 EPS 组成成分使生物膜具有携带负电荷的属性,当多黏菌素 B 和妥布霉素此类带有正电荷的药物与生物膜接触时可被其阻滞在表面而降低效能^[10,14]。最后,生物膜的厚度增加使得下层细菌处于缺氧、营养物质缺乏的环境,细菌可以诱导自身进入“休眠状态”,对外界刺激的敏感性下降,耐药性增强,这也是造成 PA 慢性感染和定植的重要原因^[15]。上述机制说明, QS 系统所表达的产物对生物膜的功能实现起到支撑作用,同时也揭示了体外药敏试验提示细菌敏感,但临床抗菌治疗时却往往效果较差的真相,这与生物膜对细菌的多重保护有着密不可分的关系,需从生物膜生成的源头解决问题。

3 QS 的应对策略

3.1 群体感应系统抑制剂(QSIs) QSIs 是一类可以靶向作用于 QS 系统并抑制其功能表达的一类物质,相较于传统的抗菌药物,其通过阻断细菌之间的通讯机制发挥作用而不直接杀死细菌和对其生长造成影响,因此该策略产生的选择压力较低并降低了治疗过程中细菌耐药性发展速度。

3.2 植物提取物的 QSIs 活性 因为自然界植物种

类的多样性,植物中可提取出对 QS 系统具有抑制作用的化合物,该类物质具有安全、低毒、环保的特点。国内外研究者开始致力于寻找植物中潜在的 QSIs,近年来发现生姜、大蒜、甘草、绿茶、羌活、鼠尾草、亚油酸等多种植物中的提取物具有 QSIs 活性,可抑制 PA-QS 系统毒力因子的表达和生物膜的形成^[15-23]。其中研究较多的是生姜的提取物,研究发现生姜中具有姜黄素、姜油醇、姜辣素、棉子糖等多种 QSIs 活性物质,并进行了姜黄素与阿奇霉素联用^[15]、与金属铜结合^[24]、与纳米材料结合^[19]对 QS 系统抑制作用的研究,发现姜黄素具有良好的 QSIs 性能。上述天然提取物的 QSIs 作用机制也有所不同,其中大蒜中二烯丙基硫化物携带的硫醚基团可抑制 3 个子系统的 AI 受体活性^[16],亚油酸调控了细菌第二信使环二鸟苷酸的降解^[18],而姜辣素衍生物竞争性抑制了 AHL 和 C4-HSL 与受体的结合^[20],减少生物膜形成和毒力因子的产生。但除此之外的大多数研究仅停留在转录层面,仅对 QS 系统基因的表达和毒力因子的产生进行分析,而对具体作用机制的探索较少,同时仅有少数研究进行了秀丽隐杆线虫或小鼠的体内实验,天然 QSIs 的体内活性和不良反应尚未明确,这都是今后的重点研究方向。

3.3 抗菌药物作为 QSIs PA 作为产生物膜的典型菌种具有多重耐药特点,抗菌药物的滥用更是加重了细菌的选择压力,所以需要更合理的抗菌药物应用策略,而临床常用的大环内酯类抗菌药物如阿奇霉素、红霉素和克拉霉素已被证明具有良好的 QSIs 活性。研究显示,在亚抑菌浓度阿奇霉素的处理下,实验组的临床分离菌均未能产生 C4-HSL 分子,其鼠李糖脂、蛋白酶、生物膜的产生均大幅减少^[21],而红霉素同样有类似的作用,其原理是抑制了 LasR、PqsA 等基因的表达和细菌的群集^[25],同时阿奇霉素和克拉霉素在与庆大霉素等药物联用时表现出较强的协同作用^[26]。而对于 β 内酰胺类抗菌药物相关研究较少,有研究者将头孢哌酮与金属铁、钴结合,其衍生物表现出对 QS 系统的抑制作用,原理是药物与 AI 受体结合使其失活^[23]。还有研究发现头孢他啶在亚抑菌浓度下可减少凝集素 LecA、LecB、Pel、Psl 基因的表达^[27]。与之相反,国内一项研究却发现在治疗 PA 慢性感染时头孢他啶使 QS 系统基因表达增加^[24],这或许是细菌对于不良刺激的应激反应所致,值得进一步研究。此外近年来还有少数对于氨基糖苷类和喹诺酮类药物的研究,例如庆大霉素、左氧氟沙星在亚抑菌浓度下降低了 QS 系统相关毒力因子的表达^[28]。在环丙沙星与阿米卡星联用时,可以杀灭低耐药浮游菌,但对细菌生物膜的根除效益不明显^[29]。综上所述,各类抗菌药物均被证实具有不同程度的 QSIs 活性。其中大环内酯类抑制作用显著,并且与其他药物联用时起到协同作用,增强抗菌效能,故临床对 PA 感

染的治疗过程中可考虑联用此类抗菌药物及延长给药时间以达到更好的抗菌效能,而头孢他啶因为其 QSIs 作用尚未明确,在治疗慢性 PA 感染时应谨慎使用,以延缓 PA 耐药性的发展。

3.4 人工合成的 QSIs 通过对天然 QSIs 分子结构的了解,让人工合成 QSIs 成为可能,而广泛存在于各类植物中的卤代呋喃酮就是典型代表,卤代呋喃酮的 QSIs 活性于 1993 年首次在红藻中被发现^[30],其具有与 AHL 类似的结构,可竞争性结合 lasR 受体抑制 QS 系统,但天然呋喃酮对 QS 系统的抑制作用极为有限,因此对其进行化学修饰以提高 QSIs 活性成为研究的焦点,其中对于溴化呋喃酮(C-30)的研究较多,既往的研究普遍认为 C-30 主要通过抑制 LasR 受体来发挥 QSIs 作用,但最近研究发现,C-30 可独立于 LasR 抑制 Rh1R 并同样具有显著活性,同时 C-30 对的 QS 系统的抑制可能不在基因水平,而可能在转录后水平^[31],这超出了人们既往的认知,也说明呋喃酮衍生物潜力还有待发掘。与此同时,受呋喃酮的启发,有研究者通过引入硫醚基团或苯基脒基团合成了四类新型 L-高丝氨酸内酯类似物,发现侧链末端连接有苯基脒基团的 11f 化合物对 QS 系统基因的表达、毒力因子的产生和细菌群集的抑制作用均强于 C-30,有着优异的 QSIs 活性^[25]。上述研究再一次说明, QSIs 的功能往往是由其特有的分子结构所实现的,通过对于 AI 的活性基团和靶受体功能位点的剖析,可以人为修饰甚至创造所需要的 QSIs,此类物质相较于天然提取物更具有针对性和高效性,具有广泛的前景。但另一方面,人工合成 QSIs 少有体内实验的报道,其体内毒性和人体的安全性还有待论证。

3.5 其他类型的 QSIs 近年来随着药物的研发难度愈发增大,“老药新用”成为一个新的研究策略,研究者发现了一些非抗菌药物同样具有 QSIs 活性,西格列汀作为治疗 2 型糖尿病的一线用药,被发现具有结合 AI 受体的特性,在 2 mg/mL 浓度下显著抑制了 PA 生物膜、绿脓素、弹性蛋白酶等毒力因子的生成和 QS 系统相关基因的表达^[32]。别嘌呤醇在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下也具有和西格列汀类似的作用,其机制同样是与 QS 系统相关受体结合起到抑制作用^[26]。而非甾体类药物的研究则更多,其中布洛芬^[33]、美洛昔康^[27]、扑热息痛^[34] 均被证明存在 QSIs 活性,布洛芬在 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 QS 系统相关基因表达最为明显,而如果要绿脓素、鼠李糖脂等毒力因子的显著抑制则需要达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甚至更高,美洛昔康在 15.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下发挥 QSIs 作用,并表现出对于抗菌药物的协同作用。上述药物在亚抑菌浓度下对细菌的生长均没有抑制作用,所以不会对细菌产生选择压力,具有广泛的应用前景,通过进一步药理研究和体内实验,或许能给 PA 的临床治疗提供新的选择,同时节省了研制新药所需的大量时间、金钱和

精力。

4 小 结

随着近年来 QS 系统调控 PA 生物膜形成机制研究的深入,虽然种类繁多的 QSIs 被发现,但仍然没有找到能有效根除体内 PA 生物膜的办法,细菌耐药性问题日益加剧,抗菌药物的作用也在快速弱化,所以寻找新的 QS 抑制策略十分急迫,目前所发现的 QSIs 仍然存在体内毒性未知,起效浓度过高,稳定性差,易降解等诸多问题,限制了 QSIs 的进一步研究,但近年细菌环二鸟苷酸信使分子, sRNA 调控旁路和外排泵的研究已有较大进展,同时结合计算机对接分析、分子动力学模拟,以及化学成分的吸收、分布、代谢、排泄、毒性进行分析等新兴技术可对 QSIs 进行筛选和处理^[33-34],继续加大对已有药物的研究和中医药的发掘,相信不久的将来会有更多优异的 QSIs 和 QS 抑制策略被发现,并应用于临床。

参考文献

- [1] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2021,21(4):377-387.
- [2] 郭张妍,王娟,楚建平. 25 例儿童社区获得性铜绿假单胞菌血流感染的临床特点及预后影响因素[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2021,15(2):117-123.
- [3] DAVIES D G, PARSEK M R, PEARSON J P, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm[J]. Science,1998,280(5361):295-298.
- [4] PAPPENFORTH K, BASSLER B L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. Nat Rev Microbiol,2016,14(9):576-588.
- [5] LEE J, ZHANG L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Protein Cell,2015,6(1):26-41.
- [6] DIGGLE S P, CORNELIS P, WILLIAMS P, et al. 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives[J]. Int J Med Microbiol,2006,296(2/3):83-91.
- [7] AHATOR S D, ZHANG L. Small is mighty-chemical communication systems in *pseudomonas aeruginosa*[J]. Annu Rev Microbiol,2019,73:559-578.
- [8] CHANG C Y. Surface sensing for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Front Microbiol,2017,8:2671.
- [9] JU X, CHEN J, ZHOU M, et al. Combating *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by a chitosan-PEG-peptide conjugate via changes in assembled structure[J]. ACS Appl Mater Interfaces,2020,12(12):13731-13738.
- [10] ROY R, TIWARI M, DONELLI G, et al. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action[J]. Virulence,2018,9(1):522-554.
- [11] MALHOTRA S, HAYES D, WOZNIAK D J. Cystic fibrosis and *pseudomonas aeruginosa*: the host-microbe in-

- terface[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(3):e00138-18.
- [12] BIRK S E, HAAGENSEN J A J, JOHANSEN H K, et al. Microcontainer delivery of antibiotic improves treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9(10):e1901779.
- [13] LIN Q, PILEWSKI J M, DI Y P. Acidic microenvironment determines antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Front Microbiol, 2021, 12:747834.
- [14] BAHARI S, ZEIGHAMI H, MIRSHAHABI H, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 10: 21-28.
- [15] FLEMMING H C, WINGENDER J, SZEZYK U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(9):563-575.
- [16] LI W R, ZENG T H, YAO J W, et al. Diallyl sulfide from garlic suppresses quorum-sensing systems of *Pseudomonas aeruginosa* and enhances biosynthesis of three B vitamins through its thioether group[J]. Microb Biotechnol, 2021, 14(2):677-691.
- [17] KANNAN S, SATHASIVAM G, MARUDHAMUTHU M. Decrease of growth, biofilm and secreted virulence in opportunistic nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 by glycyrrhetic acid[J]. Microb Pathog, 2019, 126:332-342.
- [18] KIM H S, CHA E, HAM S Y, et al. Linoleic acid inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by activating diffusible signal factor-mediated quorum sensing[J]. Biotechnol Bioeng, 2021, 118(1):82-93.
- [19] PRATEEKSHA, RAO C V, DAS A K, et al. ZnO/Curcumin nanocomposites for enhanced inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence via LasR-RhlR quorum sensing systems[J]. Mol Pharm, 2019, 16(8):3399-3413.
- [20] HAM S Y, KIM H S, JO M J, et al. Combined treatment of 6-gingerol analog and tobramycin for inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Microbiol Spectr, 2021, 9(2):e0019221.
- [21] ELSHEREDY A, EL-SOUDANY I, ELSHERBINI E, et al. Effect of azithromycin and phenylalanine-arginine beta-naphthylamide on quorum sensing and virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Iran J Microbiol, 2021, 13(1):37-49.
- [22] GBIAN D L, OMRI A. The impact of an efflux pump inhibitor on the activity of free and liposomal antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(4):577.
- [23] NAGA N G, EL-BADAN D E, RATEB H S, et al. Quorum sensing inhibiting activity of cefoperazone and its metallic derivatives on *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:716789.
- [24] 李琬琛, 宋林, 李立艳, 等. 头孢他啶对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响与机制的探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(6):1212-1215.
- [25] LIU H, GONG Q, LUO C, et al. Synthesis and biological evaluation of novel l-homoserine lactone analogs as quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2019, 67(10):1088-1098.
- [26] SAQR A A, ALDAWSARI M F, KHAFAGY E S, et al. A novel use of allopurinol as a quorum-sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(11):1385.
- [27] SHE P, WANG Y, LUO Z, et al. Meloxicam inhibits biofilm formation and enhances antimicrobial agents efficacy by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiologyopen, 2018, 7(1):e00545.
- [28] KHAN M F, HUSAIN F M, ZIA Q, et al. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of zinc oxide nanospikes [J]. ACS Omega, 2020, 5(50):32203-32215.
- [29] SOARES A, ALEXANDRE K, LAMOUREUX F, et al. Efficacy of a ciprofloxacin/amikacin combination against planktonic and biofilm cultures of susceptible and low-level resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(11):3252-3259.
- [30] DE NYS R, WRIGHT A D, KÖNIG G M, et al. New halogenated furanones from the marine alga *Delisea pulchra* (cf. *fimbriata*) [J]. Tetrahedron, 1993, 49(48):11213-11220.
- [31] MARKUS V, GOLBERG K, TERALI K, et al. Assessing the molecular targets and mode of action of furanone C-30 on *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing [J]. Molecules, 2021, 26(6):1620.
- [32] ABBAS H A, SHALDAM M A, ELDAMASI D. Curtailing quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by sitagliptin[J]. Curr Microbiol, 2020, 77(6):1051-1060.
- [33] DAI L, WU T Q, XIONG Y S, et al. Ibuprofen-mediated potential inhibition of biofilm development and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Life Sci, 2019, 237:116947.
- [34] SHUKLA A, PARMAR P, PATEL B, et al. Breaking bad; better call gingerol for improving antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting multiple quorum sensing pathways[J]. Microbiol Res, 2021, 252:126863.

(收稿日期:2022-04-06 修回日期:2022-10-08)