

# 铜绿假单胞菌密度感应系统的研究进展

朱松雷 综述, 沈 策<sup>△</sup> 审校

(上海交通大学附属第六人民医院肺内科 200233)

关键词: 假单胞菌, 铜绿; 生物膜; 密度感应系统

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.27.044

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)27-2794-03

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA), 属于非发酵菌类假单胞菌属。它广泛分布于自然界并在人体皮肤上定植, 是引起肺囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)和弥漫性支气管炎(diffuse panbronchiolitis, DPB)的最重要的病原菌, 也是近年来医院内感染的重要条件致病菌和耐药菌之一。其中密度感应(quorum sensing, QS)系统作为细菌细胞间的特殊交流方式, 在基因水平上调控着 PA 生物被膜、Ⅲ型分泌系统、致病毒力因子等的分化, 是重要的致病因素和耐药性原因之一。现将 PA 的 QS 系统的研究进展作一综述。

## 1 PA 的 QS 系统调控模式

有研究显示, QS 系统是细菌细胞间信号传递的一种方式。指许多种类的细菌在高细胞密度的条件下, 通过化学信号分子, 帮助细胞监控细胞群体的浓度变化。QS 系统能让细菌细胞感知其同伴的密度变化, 当达到一定的阈值后, 就会出现异常的多样的细胞行为模式。革兰阴性细菌的 QS 系统大多利用 N-乙酰高丝氨酸内酯(N-acyl homoserine lactones, AHLs)作为信号分子。PA 拥有一个复杂的 QS 信号网络, 包括两个 AHLs 依赖的细胞间信号系统, 即 las 系统和 rhl 系统, 一个非 AHLs 依赖的细胞间信号分子, 即 4-羟基-2-烷基喹诺酮(4-hydroxy-2-alkylquinolines, HAQs)。las 系统由 LasR 和 LasI 组成, LasI 指导 PA 信号分子 N-3-氧代十二烷酰-高丝氨酸内酯(3-oxododecanoyl homoserine lactone, 3-O-C12-HSL)的合成; rhl 系统由 RhlR 和 RhlI 组成, RhlI 指导 PA 信号分子 N-丁酰基-高丝氨酸内酯(N-butyryl-L-homoserine lactone, C4-HSL)的合成。当 3-O-C12-HSL 和 C4-HSL 信息分子增加到一定浓度的时候, 分别与转录因子 LasR 和 RhlR 特异性结合并激活转录从而调节一系列下游致病基因的表达。las 系统和 rhl 系统均可以调控自身 lasI 和 rhlI 基因的表达形成正反馈回路。HAQs 包括 4-羟基-2-庚基喹诺酮衍生物(2-heptyl-4-quinolone, HHQ)和对应的 2-羟基衍生物, 比如 2-羟基-3,4-二庚基喹诺酮(2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, PQS, 假单胞菌喹诺酮信号)<sup>[1]</sup>。PA HAQs 的生物合成需要操纵子 pqsABCDE 和 phnAB 来编码基因。HHQ 由来自邻氨基苯甲酸的 PqsABCDE 合成<sup>[2]</sup>。PQS 是通过 HHQ 的羟基化合成的。HHQ 和 PQS 作为多种毒力调节因子的共同诱导配体而对 pqsABCDE 和 phnAB 的转录调节起作用<sup>[3]</sup>。

## 2 QS 系统与 PA 生物被膜的关系

细菌生物被膜(biofilm, BF)是细菌在生长过程中, 为适应生存环境而吸附于惰性或活性材料表面形成的一种与浮游细菌相对应的生长方式, 由细菌和自身分泌的细胞外基质组成。

有研究认为, PA 之所以形成扁平、均一不分化的 BF, 是由于 LasI 基因的突变, 故不能形成成熟的三维立体结构。当加入合成的信号分子 3-O-C12-HSL 共同培养后, 可使突变株恢复形成成熟生物膜的能力。根据 BF 结构的改变推测, 对于 PA 成熟 BF 的形成和 BF 的耐药性而言, lasQS 系统比 rhl 系统显得更为重要。同时亦提示胞外多糖(extrapolysaccharides, EPS)的合成可能受到 lasI 和 rhlI 表达的影响<sup>[4]</sup>。Davey 和 Caiazza 等<sup>[5]</sup>研究发现, 群集在插管患者管内的 PA 菌群绝大多数均为 QS 系统菌, 在 PA 生物被膜中都能检测出 3-O-C12-HSL 和 C4-HSL, 前者在生物被膜分化中起作用, 后者在成熟阶段起作用。如果没有 QS 系统的参与 BF 将不能分化成熟, 对抗菌药物的敏感性也与浮游菌相似。有研究显示, QS 系统能够决定 PA 生物被膜对抗生素治疗耐受性, 并且启动着由多形核白细胞(polymorphonuclear cells, PMNs)主导的炎症反应<sup>[6]</sup>。所以 QS 系统在 PA 生物被膜分化, 形成上起着重要作用<sup>[7]</sup>。

## 3 QS 系统与Ⅲ型分泌系统

有研究发现, PA 成功感染宿主细胞导致疾病的重要原因是其能够通过Ⅲ型分泌系统(type III secretionsystem, T3SS)的作用, 将病原菌的效应分子(以毒力蛋白为主)注入到真核宿主细胞内部, 从而导致许多疾病<sup>[8]</sup>。PA 的 T3SS 分子结构和其他革兰氏阴性致病菌(如耶尔森氏菌属, 沙门氏菌属)一样, 由细菌膜上的装置蛋白、转位子蛋白、被转移的效应分子和 T3SS 分子伴侣 4 类蛋白组成。Rhl 是 PA QS 系统之一。有研究发现, T3SS 的表达在 Rhl QS 系统的缺失突变株中升高<sup>[9]</sup>。最近, 有研究通过基因敲除的方法破坏 PA QS 系统的相关基因, 将 T3SS 相关基因启动子报道子融合体整合到野生型菌株及 QS 系统突变菌株的染色体组织上, 研究 QS 系统与 T3SS 间的相互关系, 结果表明, 除 Rhl 系统对 T3SS 具有负调节作用以外, PQS 信号分子介导的 QS 系统对 T3SS 相关基因表达也有明显的负调节作用, 这一作用对 PA 的致病过程有重要影响<sup>[10]</sup>。

## 4 QS 系统与大环内酯类药的关系

大环内酯类药物通过结合细菌的 50S 核糖体而抑制了细菌蛋白的翻译。然而, 因为低于最小抑菌浓度(sub minimal inhibitory concentration, sub-Mic)的大环内酯类药物也能够抑制 PA 感染的 CF 和 DPB, 故被认为是由其他机制所介导的, 比如说毒力因子产生的减少等<sup>[11]</sup>。有研究显示, sub-Mic 的阿奇霉素并不能改变 QS 相关的基因(lasI, lasR, rhlI, rhlR, vft, rsaL) mRNA 的表达, 但是能够降低 lasI 和 rhlI 上游 AHL 合成酶的

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel:13402016679; E-mail:lyshence@gmail.com。

表达。在 sub-Mic 的阿奇霉素溶液中, QS 的自身诱导分子减少了。有研究认为, 阿奇霉素抗 PA 的作用机制为低浓度的阿奇霉素抑制了 S-腺苷-甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)合成酶的表达, 并且减少了细胞内 SAM 的浓度。SAM 的减少又导致了 QS 系统中 LasI 和 RhlI 产生 AHL 的减少。从而与 AHL 结合的转录因子(LasR/RhlR)的减少进一步导致了毒力因子释放的减少<sup>[12]</sup>。

## 5 QS 系统与宿主的关系

PA QS 系统能够改变宿主的炎症反应和免疫反应<sup>[13]</sup>。有研究显示, QS 系统能够调节细胞外酶和细胞溶解酶(鼠李糖脂)等毒力因子的产生, 并且 QS 系统作为一种抵抗巨噬细胞的保护屏, 在 PA 感染的致病机制中起着重要的作用<sup>[14-15]</sup>。Davis 等<sup>[16]</sup>研究证明, 在 PA QS 系统中的 AHLs 在微摩尔水平就可以直接插入嵌在宿主细胞的生物膜上, 其自身诱导分子 3-O-C12-HSL 能影响血管平滑肌的收缩, 显著的心动过缓, 调节着上皮细胞的连接完整性和细胞旁的渗透性<sup>[17]</sup>。在免疫反应中, 3-O-C12-HSL 能刺激不同宿主信号途径来抑制或激活免疫细胞反应, 而 C4-HSL 则不能。有研究发现, 3-O-C12-HSL 分子能够刺激宿主 T 细胞干扰素- $\gamma$ (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ )的产生, 刺激人肺纤维母细胞中白介素(interleukin, IL)-8 的产生, 抑制 IL-12 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  在巨噬细胞中的表达, 促进在 IL-4 诱导下的单核细胞免疫球蛋白 E 的产生, 并且可引起巨噬细胞和中性粒细胞的凋亡等<sup>[18]</sup>。

## 6 QS 系统抑制剂的探索

QS 系统是 PA 感染的重要调节因素。QS 系统抑制剂虽然对细菌的生长没有直接的影响, 但能改变细菌病原基因, 因此, 能够增加病原菌对宿主免疫的易感性。近 10 年有专利的 QS 系统抑制剂(自然和人工合成制品)大致可以分为 3 类: 非肽类小分子、肽类和蛋白质。这些抑制剂通过抑制 QS 信号的产生, 阻断信号受体或者破坏 QS 往来干扰 QS。提供 1 个可供选择的方法来控制细菌的发病机制。最早发现的天然 QS 抑制剂来源于 1 种海洋红藻, 它能够产生与 AHLs 信号分子结构类似的卤代呋喃酮化合物。近期有研究发现, 入侵红火蚁体内的生物碱 Solenopsin A 能够有效的阻断 PA 的 QS 系统。外源添加 C4-HSL 能够有效的恢复 QS 系统, 提示 Solenopsin A 的作用靶点主要是依赖 C4-HSL 的 rhlQS 系统<sup>[19]</sup>。在对小分子化合物库进行筛选中, Müh 等<sup>[20]</sup>研究发现, 两个与 3-O-C12-HSL 结构类似的抑制剂 V-06-018 和 PD12。这两个化合物都能与 LasR 蛋白结合, 并能够抑制弹性蛋白酶和绿脓菌素的产生。Kaufmann 等<sup>[21]</sup>研究发现, 单克隆抗体 RS2-1G9 与 PA 信号分子 3-O-C12-HSL 的亲合力最高, 并证实, 该抗体能抑制 PA 中的 QS 系统, 有效保护小鼠巨噬细胞免受 3-O-C12-HSL 信号分子的毒害。1 种在各种生物体内广泛分布依赖 ATP 的 Lon 蛋白酶也能够抑制 PA 的 QS 系统。其作用机制不是直接降解 AHL, 而是通过降解 AHL 合成酶 LasI 和 RhlI 来抑制 AHL 的合成。近期有研究发现, 1 种能够降解 PQS 信号分子的酶——2,4-双加氧酶(2,4-dioxygenase, Hod)。在 PA PAO1 培养物中外源添加 Hod 蛋白能够降低 PQS 合成基因 pqsA 的表达以及受 PQS 调节的毒力因子凝集素 A、绿脓菌素、鼠李糖脂的表达<sup>[22]</sup>。近年来有研究发现, 中药人参通过抑制 QS 系统的作用而使得 PA 的感染改善<sup>[23]</sup>, 氨溴索能够抵抗 PA 的 QS 系统而使得 CF 的患者治疗有改善, 并减少生物被

膜的形成和管道的定植<sup>[24]</sup>。这些化合物以及类似物为治疗 PA 感染提供了广阔的前景。QS 系统广泛存在于原核生物和真核生物中, 并已成为目前的一个研究热点。QS 系统在 PA 的分化和生长过程中的地位非常重要。通过对 PA 的 QS 系统研究, 会进一步认识到它的致病机制, 从而在调控或干扰 QS 系统角度上来治疗 PA 引起的相关感染开辟了一个新的方向。

## 参考文献:

- [1] Lepine F, Milot S, Deziel E, et al. Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines(HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15(6):862-869.
- [2] Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, et al. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines[J]. *Bacteriol*, 2005, 187(11):3630-3635.
- [3] Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, et al. Regulation of pseudomonas quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Bacteriol*, 2005, 187(13):4372-4380.
- [4] 杨新云, 卓超, 陈斯韵. 铜绿假单胞菌生物被膜耐药研究进展[J]. *Pharmacy Today*, 2009, 19(11):6-8.
- [5] Davey ME, Caiazza NC. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Bacteriol*, 2003, 185(3):1027-1036.
- [6] Bjarnsholt T, Jensen PØ, Burmølle M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 2):373-383.
- [7] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(4):322-332.
- [8] Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III secretion systems and disease[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(4):535-549.
- [9] 胡晓梅, 胡福泉. 铜绿假单胞菌的细胞间信号联系及其在感染中的作用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2006, 16(4):478-480.
- [10] 孔伟娜, 梁海华, 沈立新, 等. 铜绿假单胞菌中 III 型分泌系统受 Rhl 和 PQS 群体感应系统调节[J]. *微生物学报*, 2009, 49(9):1158-1164.
- [11] Tateda K, Ishii Y, Kimura S, et al. Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolicides: a promising strategy or an oriental mystery[J]. *J Infect Chemother*, 2007, 13(6):357-367.
- [12] Kai T, Tateda K, Kimura S, et al. A low concentration of azithromycin inhibits the mRNA expression of N-acyl homoserine lactone synthesis enzymes, upstream of lasI or rhlI, in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009, 22(6):483-486.
- [13] Cooley M, Chhabra SR, Williams P. N-Acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing: a twist in the tail and a blow for host immunity[J]. *Chem Biol*, 2008, 15(11):1141-1147.
- [14] Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, et al. Inacti-

- vation of the rhlA gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes[J]. *APMIS*, 2009, 117(7):537-546.
- [15] Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes[J]. *Microbiology*, 2009, 155(11):3500-3508.
- [16] Davis BM, Jensen R, Williams P, et al. The interaction of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signaling molecules with biological membranes: implications for interkingdom signaling[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):3522.
- [17] Vikström E, Bui L, Konradsson P, et al. The junctional integrity of epithelial cells is modulated by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule through phosphorylation-dependent mechanisms[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(2):313-326.
- [18] Smith RS, Iglewski BH. P. *aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(1):56-60.
- [19] Park J, Kaufmann GF, Bowen JP, et al. Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Infect Dis*, 2008, 198(8):1198-1201.
- [20] Müh U, Schuster M, Heim R, et al. Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(11):3674-3679.
- [21] Kaufmann GF, Park J, Mee JM, et al. The quorum quenching antibody RS2-1G9 protects macrophages from the cytotoxic effects of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signalling molecule N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(9):2710-2714.
- [22] Pustelny C, Albers A, Büldt-Karentzopoulos K, et al. Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chem Biol*, 2009, 16(12):1259-1267.
- [23] Song Z, Kong KF, Wu H, et al. Panax ginseng has anti-infective activity against opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing, a bacterial communication process critical for establishing infection[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(13):1040-1046.
- [24] Lu Q, Yu J, Yang X, et al. Ambroxol interferes with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(3):211-215.

(收稿日期:2011-05-26 修回日期:2011-06-28)

• 综 述 •

## 苯并咪唑类药物抗肿瘤研究进展

何迎盈<sup>1</sup>综述, 罗治彬<sup>2△</sup>, 李少林<sup>1</sup>审校

(1. 重庆医科大学基础医学院核医学教研室 400030; 2. 重庆市合川区人民医院肿瘤血液科 401520)

关键词: 苯并咪唑类药物; 抗肿瘤; 药理作用

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.27.045

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)27-2796-03

肿瘤(tumor)是一类常见多发病,特别是恶性肿瘤,已成为危害人类健康最严重的疾病之一,如何攻克肿瘤成为医学界的奋斗目标。随着医学科学的发展,人们对肿瘤的认识不断深入,肿瘤发生、发展的每个环节都可能成为治疗的潜在靶点,并且还发现,许多在临床上应用多年的药物有抗肿瘤的作用。作者对抗寄生虫药苯并咪唑氨基甲酸酯类药物(benzimidazole carbamate, BZ)的抗肿瘤作用进行综述。

### 1 BZ 的药理作用和应用现状

BZ 包括阿苯达唑(albendazole, ABZ)、甲苯达唑(mebendazole, MZ)和氟苯达唑(flubendazole),其中 ABZ 和 MZ 在临床上最常使用。它们具有广谱抗寄生虫作用,疗效显著,安全性高,因此,从 1975 年沿用至今。目前对 MZ 杀死寄生虫的机制常归纳为 4 点:(1)干扰寄生虫糖代谢,抑制寄生虫对葡萄糖吸收,并抑制延胡索酸还原酶系统,阻碍三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)产生;(2)与寄生虫  $\beta$ -微管蛋白( $\beta$ -tubulin)结合,导致细胞微管解聚,细胞周期停止;(3)由于结构与嘌呤

相似,有可能还干扰寄生虫嘌呤代谢;(4)抑制  $\beta$ -血红蛋白形成<sup>[1]</sup>。

### 2 BZ 在抗肿瘤方面的研究

BZ 抗肿瘤的研究可追溯到 1985 年,有文献报道,BZ 可抑制小鼠白血病细胞 L1210 的生长。BZ 抗细胞增殖在 1998 年被证实后,国外很多学者对 BZ 抗肿瘤效应产生了浓厚兴趣,许多研究都证实,BZ 确有抗肿瘤作用。

#### 2.1 抑制肿瘤细胞有丝分裂和增殖

微管(microtubule)是由  $\alpha$ 、 $\beta$  微管蛋白( $\alpha$ 、 $\beta$ -tubulin)组成的二聚体,是细胞骨架的主要成分,参与维持细胞形态、胞内物质运输、细胞有丝分裂等,是抗肿瘤治疗的常见靶点之一。另外,微管复合体中的  $\beta$ -微管蛋白异构体 III 还与细胞耐药和肿瘤预后不良有关<sup>[2]</sup>。

Sasaki 等<sup>[3]</sup>利用 MZ 处理非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞 H460 和 A549 后,细胞微管解聚,纺锤体形成异常,细胞周期停滞在 G<sub>2</sub>-M 期,并发生了凋亡。同时,细胞周期调节蛋白的水平也受到了 MZ 影响,cyclins A、E

△ 通讯作者, Tel:13883832777; E-mail:luozhibincq@126.com。