

文章编号: 1674-7054(2017)02-0236-05

革兰阳性细菌 AIP 型群体感应抑制剂的研究进展

孔凡栋, 周丽曼, 马青云, 黄圣卓, 赵友兴

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所在海口 571101)

摘要: 以自诱导肽(autoinducer peptide) AIP 为信号分子的细菌群体感应(quorum sensing, QS) 系统存在于多种革兰阳性细菌中, 是研究新型抗金黄色葡萄球菌等革兰阳性细菌药物的重要突破口。目前发现的 AIP 型群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitors, QSIs) 有小分子与大分子 2 种类型, 笔者对这 2 类 AIP 型 QSIs 的研究进展进行综述, 为新型抗菌药物的研发提供理论依据。

关键词: 细菌群体感应; AIP 型群体感应系统; 群体感应抑制剂; 研究进展

中图分类号: R 978

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2017.02.019

细菌耐药性是近年来医学工作者面临的一大难题, 而该问题在我国尤为突出。近年来的 CHINET 耐药性监测结果表明, 细菌耐药性在我国仍呈增长趋势, 多重耐药和广泛耐药菌株检出率的增加已对临床抗感染治疗构成了严重威胁^[1-2]。因此, 寻找新的抗细菌感染模式来解决细菌耐药性问题已成为了一项十分紧迫的研究课题。细菌群体感应(quorum sensing, QS) 是指细菌生长达到一定密度时才可以启动的感应现象, 是细菌之间进行信息交流的过程, 被形象地称为“细菌的语言”。QS 系统广泛存在于多种细菌中, 它调控了包括细菌运动、生物被膜形成、毒力因子产生等多种致病力相关的生物现象。研究表明, 干扰细菌 QS 系统, 阻断或抑制 QS 过程, 可以在不影响细菌生长的前提下, 降低细菌毒力表达, 削弱细菌杀伤力和致病性。由于这一过程对细菌生长影响较小, 细菌不易产生耐药性, 因而细菌 QS 系统为对抗细菌感染、解决细菌的耐药性研究提供了新的思路。细菌群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitors, QSIs) 有望成为细菌感染治疗的新型武器。

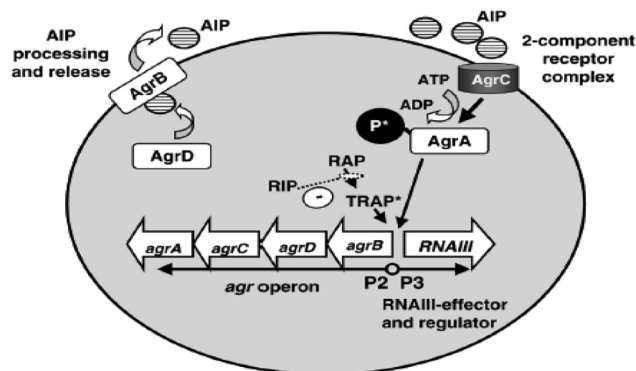


图1 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中的 agr 系统^[3]

Fig.1 The accessory gene regulator (Agr) system in *Staphylococcus aureus*

以自诱导肽(autoinducer peptide, AIP) 为信号分子的 QS 系统存在于多种革兰阳性细菌中, 如金黄色

收稿日期: 2016-10-25

修回日期: 2017-01-28

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303117); 国家自然科学基金青年科学基金项目(41606088)

作者简介: 孔凡栋(1987-)男, 博士, 助理研究员。研究方向: 活性天然产物化学 E-mail: kongfandong@itbb.org.cn

通信作者: 赵友兴(1974-)男, 博士, 研究员。研究方向: 活性天然产物化学 E-mail: zhaoyouxing@itbb.org.cn

葡萄球菌(*S. aureus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)以及粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)等。AIP的氨基酸数量通常为5~17个,氨基酸侧链则一般含有异戊烯、硫内酯环等修饰性基团,不同细菌中产生的AIP信号分子的大小与结构各不相同。革兰阳性菌在生长过程中会编码合成AIP的前体肽段,这些肽段经过加工修饰后方可形成稳定的、有活性的自诱导肽。AIP并不能自由穿过细胞膜,它需要通过ABC转运系统(ATP-binding-cassette)或在其他膜通道蛋白帮助下穿透细胞膜出入细胞。AIP的浓度随细菌生长积累到一定阈值时,细胞膜上的AIP信号识别系统进行识别并与AIP结合后,能够磷酸化并激活细胞膜上的双组分磷酸激酶系统(TCS),磷酸化后的受体蛋白能与DNA特定靶位点结合,进而调控QS相关基因的表达^[3]。以金黄色葡萄球菌为例(图1),其QS系统为基于自诱导肽AIP的agr系统,agr的前肽(pre-AIP)由agrD编码,通过膜蛋白AgrB加工为成熟的AIP并分泌至胞外。AgrC是一个膜受体激酶,与AIP结合后可以磷酸化并激活AgrA, AgrA则可以通过结合启动子P2、P3并调控一系列下游基因的表达,启动子P2启动的RNA II转录框包括agrA、agrB、agrC、agrD 4种基因的agr操纵子,启动子P3启动的RNA III转录框是agr系统的效应分子,编码 α -溶血素、 δ -毒素等毒力因子^[3]。近年来,国内对革兰阳性细菌AIP型QSI的发现研究鲜有报道,因此,笔者对近十年来国际上报道的革兰阳性细菌AIP型QSI研究进行综述,为新型抗菌药物的研发提供理论依据。

1 革兰阳性细菌 AIP 型小分子 QSI

1.1 合成来源的 QSI 信号分子 AIP 类似物的发现研究是寻找 QSI 的重要方向, AIP 类似物可以拮抗性地结合受体蛋白,从而抑制 QS 过程。Tal-Gan 等^[4-5]合成了与自诱导肽 AIP-III 类似的七肽化合物 AIP-III D4A, AIP-III D4A 相比 AIP-III 更加稳定,并且可以抑制金黄色葡萄球菌 AgrC 受体蛋白的活性进而抑制 QS 系统,该团队合成的 AIP-III 类似物 AIP-III nN2、AIP-III nF5、AIP-III D2A 等同样具有较高的 AgrC 受体蛋白抑制活性^[6-7],并利用 NMR 核磁共振波谱法发现了 2 个对 AgrC 受体蛋白的抑制活性至关重要的保守位点,分别为 1 个三氨基酸残基组成的疏水“把手”和环外尾巴上的第 4 个定位点,这个研究结果对发现强活性的 QSI 有指导意义^[7]。十一肽化合物 ZBzl-YAA5911 与 [Ala(5,9,11)]Z-GBAP 是 Nakayama 等^[8]合成的粪肠球菌中 *fsr* 群体感应系统的信号分子类似物, ZBzl-YAA5911 可以有效抑制兔眼内角炎感染的粪肠球菌毒力因子的表达,减轻对视网膜的损伤。Singh 等^[9]合成了产气荚膜梭菌的 2 个环五肽信号分子类似物 Z-AIPCp-L2A/T5A 与 Z-AIPCp-F4A/T5S,它们均可抑制毒素基因 *pfoA*(编码毒素裂解素 O)的表达。

Murray 等^[10]合成的五元内酯类化合物 C14-TOA 17 可有效抑制金黄色葡萄球菌 agr 系统,实验证明 C14-TOA 17 可减少金黄色葡萄球菌在人类鼻上皮细胞中的定植数目并降低小鼠关节炎感染的发生频率。Cevizci 等^[11]发现 Miandji 等^[12]合成的苯并恶唑酮类化合物 yd47 可有效抑制中耳炎及耳蜗移植植物中肺炎链球菌的 QS 系统,豚鼠实验还证明 yd47 可抑制耳蜗移植植物中肺炎链球菌生物被膜的形成。Simonetti 团队^[13-15]合成了一系列新型 RNA III 抑制肽(RNA III inhibiting peptide, RIP)衍生物,其中 FS3、FS8 和 FS10 可抑制金黄色葡萄球菌 QS 系统,七肽化合物 FS3 可明显增强大鼠人工血管感染模型中金黄色葡萄球菌对达托霉素的敏感性^[13],七肽化合物 FS8 与替加环素合用可抑制小鼠创伤感染模型中金黄色葡萄球菌生物被膜的形成^[14],四肽化合物 FS10 则可显著提高小鼠创伤感染模型中耐甲氧西林型金黄色葡萄球菌(MRSA)对替加环素的敏感性^[15]。

1.2 天然产物来源的 QSI 微生物次生代谢产物是天然产物的重要来源,微生物在相互竞争的环境下产生 QSI 的可能性更大,因此也是开发 QSI 的潜力宝库。1 株海洋发光杆菌代谢产生的 1 种环多肽 so-lonamide A 与 B 可干扰金黄色葡萄球菌的 agr 系统,并可抑制 *spa*、*hla*、*rnaIII* 等 QS 相关基因的表达^[16]。罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)产生的 2 种环二肽类化合物 L-Phe-L-Pro 与 L-Tyr-L-Pro,可抑制金黄色葡萄球菌多种外毒素的表达^[17]。Daly 等^[18]发现,青霉菌 *Penicillium restrictum* 在固体培养基中产生的一种聚羟基蒽醌类化合物 ω -hydroxyemodin (OHM) 可以抑制金黄色葡萄球菌的 agr 系统,OHM 通过干扰

AgrA 与下游启动子 *agrP2* 的结合实现其抗 QS 过程,小鼠感染动物实验证明 OHM 可提高小鼠感染金黄色葡萄球菌后的细菌清除率并降低感染处炎症细胞因子的表达。散囊菌目真菌 *Hamigera ingelheimensis* 的次级代谢产物环多肽 avellanin C 被报道有抗金黄色葡萄球菌 QS 系统活性,实验表明,avellanin C 可在低浓度下明显抑制金黄色葡萄球菌 *agrP3* 启动子下游毒力基因的表达^[19]。从意大利著名大学古城萨拉曼卡古城墙外的铜锈中分离得到的节杆菌属细菌中发现 2 种环肽类化合物 arthroamide 以及 turnagainolide A 均有抗金黄色葡萄球菌 QS 系统活性^[20]。Desouky 等^[21]发现 1 株放线菌产生的 3 种环缩肽 WS9326A、WS9326B 和考尺霉素 II/III 具有抗 AIP 型革兰阳性菌 QS 系统活性,包括金黄色葡萄球菌的 *agr* 系统和粪肠球菌的 *fsr* 系统,其中,WS9326A 可以显著抑制产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)中受 QS 调控的毒力基因 *pfoA* 的表达,离体实验还证明 WS9326B 可以降低人角膜上皮细胞感染的金黄色葡萄球菌毒性。

动植物在进化过程中也可产生 QSIs 降低感染性细菌的致病力。金缕梅产生的多酚类化合物金缕梅单宁(HAM)可干扰耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 QS 系统^[22],Brackman 等^[23-24]研究发现 HAM 还可以提高金黄色葡萄球菌在动物体内外对抗生素的敏感性,作用机制是通过抑制肽聚糖的生物合成与 eDNA 的释放实现的。Srivastava 等^[25]从牛初乳中分离提取的 1 种多聚己糖化合物 CHS 有较好的抗金黄色葡萄球菌 QS 系统活性,CHS 还可降低蛋白酶、脂肪酶等多种毒力因子的表达并可以明显抑制生物被膜的形成。

1.3 化合物库筛选的 QSIs 使用有效的筛选方法在化合物库中寻找活性分子是常用的药物筛选策略。Sully 等^[26]使用绿色荧光蛋白 GFP 报告菌株在 24 087 个化合物中筛选到生物碱类化合物 savirin 可以通过靶向抑制金黄色葡萄球菌中的 AgrA 蛋白从而抑制 QS 系统。小鼠体内实验还证实,savirin 可明显减弱金黄色葡萄球菌感染对伤口的影响,并提高机体对该菌的清除率。Kuo 等^[27]筛选到的 F1、F12 与 F19 3 个多羟基酮类化合物可提高 MRSA 感染小鼠伤口的治愈率,还可提高 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素的敏感性。

2 革兰阳性细菌 AIP 型大分子 QSIs

革兰阳性细菌 AIP 型大分子 QSIs 目前研究的主要是 AIP 型群体感应淬灭抗体。细菌产生的信号分子可引起宿主哺乳细胞的免疫反应,制备针对信号分子的单克隆抗体——群体感应淬灭抗体(quorum quenching antibodies, QQ 抗体),不仅可以快速阻断 QS 系统,还可有效降低宿主细胞的免疫反应。Janda 团队曾制备了多个针对信号分子的 QQ 抗体,AP4-24H11 是其制备的针对金黄色葡萄球菌的 QQ 抗体,可以抑制小鼠脓疮感染模型中金黄色葡萄球菌毒力因子的表达并降低其致病性^[28],该抗体配基识别的结构基础也已经明确^[29],极有潜力开发成抑制金黄色葡萄球菌毒力与致病力的疫苗。

3 展 望

高活低毒是化合物是否有药物研发价值的重要指征。目前发现的革兰阳性细菌 AIP 型小分子 QSIs 除活性不理想、作用机理研究不明确外,化合物的毒性也是阻碍其临床应用的重要因素。Vattem 等^[30]建议从一些可食资源中寻找 QSIs,比如食用植物、保健水果和蔬菜等,确保筛选出 QSIs 的安全性。中草药资源是我国医药研究者的宝库,我国在开发活性中草药天然产物研究上具有天然的优势,因此在中草药中寻找高活低毒的革兰阳性菌 QSIs 具有巨大潜力。对于一些毒性较大的高活性化合物,可以使用化学结构改造的方法,在确保活性的基础上降低毒性,增加其药物开发价值。

尽管 García-Contreras 等^[31]一些科学家也对 QSIs 对细菌耐药性的预防作用持怀疑态度,但 QSIs 的研究与应用前景普遍被看好。使用 QSIs 进行创新性治疗也是研究者关注的课题。小分子 QSIs 与现有抗生素进行联合治疗,是开发新型药物的可行思路,QSIs 不仅可以降低细菌感染对机体的毒性和致病性,还可以预防细菌耐药性的产生。革兰阳性细菌 AIP 型大分子 QSIs 具有高度特异性,其开发应用同样前景光明。利用 QQ 抗体开发 QQ 疫苗,有望快速靶向金黄色葡萄球菌等感染细菌并降低其侵袭力与致病性^[32],QQ 疫苗与传统抗生素合用则可以快速清除细菌并预防其耐药性的产生。

2016 年 5 月,美国官方报告称发现首例对所有已知抗生素都有抵抗力的细菌感染病例,随后美国微

生物学会刊物 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 报告了该感染病例^[33]。如果这种泛耐药性“超级细菌”传播,可能造成日常感染的严重危险。金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等临床致病的革兰阳性细菌也已发现了多种耐药性菌,面临的耐药性问题同样相当严峻。越来越多的耐药性细菌感染案例给人类敲响警钟,开发新型抗感染防耐药的药物已经迫在眉睫,新型高效的革兰阳性菌 QSI 亟待发现,寻找具有新药研发苗头的 QSI 也应加快进度,以期在耐药性细菌感染时代到来前能找到抗菌新药研发的突破口。

参考文献:

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365–374.
- [2] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2014 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(5):401–410.
- [3] Asad S, Opal S M. Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection [J]. Crit Care, 2008, 12(6):236.
- [4] Tal-Gan Y, Stacy D M, Foegen M K, et al. Highly potent inhibitors of quorum sensing in *Staphylococcus aureus* revealed through a systematic synthetic study of the group-III autoinducing peptide [J]. J Am Chem Soc, 2013, 135(21):7869–7882.
- [5] Tal-Gan Y, Ivancic M, Cornilescu G, et al. Highly stable, amide-bridged autoinducing peptide analogues that strongly inhibit the AgrC quorum sensing receptor in *Staphylococcus aureus* [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2016, 55(31):8913–8917.
- [6] Tal-Gan Y, Stacy D M, Blackwell H E. N-Methyl and peptoid scans of an autoinducing peptide reveal new structural features required for inhibition and activation of AgrC quorum sensing receptors in *Staphylococcus aureus* [J]. Chem Commun (Camb), 2014, 50(23):3000–3003.
- [7] Tal-Gan Y, Ivancic M, Cornilescu G, et al. Structural characterization of native autoinducing peptides and abiotic analogues reveals key features essential for activation and inhibition of an AgrC quorum sensing receptor in *Staphylococcus aureus* [J]. J Am Chem Soc, 2013, 135(49):18436–18444.
- [8] Nakayama J, Yokohata R, Sato M, et al. Development of a peptide antagonist against *fsr* quorum sensing of *Enterococcus faecalis* [J]. ACS Chem Biol, 2013, 8(4):804–811.
- [9] Singh RP, Okubo K, Ohtani K, et al. Rationale design of quorum-quenching peptides that target the VirSR system of *Clostridium perfringens* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2015, 362(22):fnv188.
- [10] Murray E J, Crowley R C, Truman A, et al. Targeting *Staphylococcus aureus* quorum sensing with nonpeptidic small molecule inhibitors [J]. J. Med Chem., 2014, 57(6):2813–2819.
- [11] Cevzici R, Düzlül M, Dündar Y, et al. Preliminary results of a novel quorum sensing inhibitor against pneumococcal infection and biofilm formation with special interest to otitis media and cochlear implantation [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2015, 272(6):1389–1393.
- [12] Miandji A M, Ulusoy S, Dündar Y, et al. Synthesis and biological activities of some 1- β -benzoxazol-2(3H)-one derivatives as anti-quorum sensing agents [J]. Arzneimittelforschung, 2012, 62(7):e2.
- [13] Cirioni O, Mocchegiani F, Cacciatore I, et al. Quorum sensing inhibitor FS3-coated vascular graft enhances daptomycin efficacy in a rat model of staphylococcal infection [J]. Peptides, 2013, 40:77–81.
- [14] Simonetti O, Cirioni O, Mocchegiani F, et al. The efficacy of the quorum sensing inhibitor FS8 and tigecycline in preventing prosthesis biofilm in an animal model of staphylococcal infection [J]. Int J. Mol. Sci., 2013, 14(8):16321–16332.
- [15] Simonetti O, Cirioni O, Cacciatore I, et al. Efficacy of the Quorum sensing inhibitor FS10 alone and in combination with tigecycline in an animal model of *Staphylococcal* infected wound [J]. PLoS One, 2016, 11(6):e0151956.
- [16] Mansson M, Nielsen A, Kjærulff L, et al. Inhibition of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by novel depsipeptides from a marine photobacterium [J]. Mar Drugs, 2011, 9(12):2537–2552.
- [17] Li J, Wang W, Xu S X, et al. *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(8):3360–3365.
- [18] Daly S M, Elmore B O, Kavanaugh J S, et al. ω -Hydroxyemodin limits staphylococcus aureus quorum sensing-mediated pathogenesis and inflammation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(4):2223–2235.
- [19] Igarashi Y, Gohda F, Kadoshima T, et al. Avellanin C, an inhibitor of quorum-sensing signaling in *Staphylococcus aureus*, from *Hamigera ingelheimensis* [J]. J. Antibiot (Tokyo), 2015, 68(11):707–710.

- [20] Igarashi Y , Yamamoto K , Fukuda T , et al. Arthroamide , a cyclic depsipeptide with quorum sensing inhibitory activity from *Arthrobacter* sp [J]. J. Nat Prod ,2015 ,78(11) : 2827 – 2831.
- [21] Desouky S E , Shojima A , Singh R P , et al. Cyclodepsipeptides produced by actinomycetes inhibit cyclic-peptide-mediated quorum sensing in Gram-positive bacteria [J]. FEMS Microbiol Lett ,2015 ,362(14) : fmv109.
- [22] Kiran M D , Adikesavan N V , 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(5) : 1578 – 1586.
- [23] Brackman G , Cos P , Maes L , et al. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo [J]. Antimicrob Agents Chemother ,2011 ,55(6) : 2655 – 2661.
- [24] Brackman G , Breyne K , De Rycke R , et al. The quorum sensing inhibitor hamamelitannin increases antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms by affecting peptidoglycan biosynthesis and eDNA release [J]. Sci. Rep. ,2016(6) : 20321.
- [25] Srivastava A , Singh B N , Deepak D , et al. Colostrum hexasaccharide , a novel *Staphylococcus aureus* quorum-sensing inhibitor [J]. Antimicrob Agents Chemother ,2015 ,59(4) : 2169 – 2178.
- [26] Sully E K , Malachowa N , Elmore B O , et al. Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance [J]. PLoS Pathog ,2014 ,10(6) : e1004174.
- [27] Kuo D , Yu G , Hoch W , et al. Novel quorum-quenching agents promote methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) wound healing and sensitize MRSA to β -lactam antibiotics [J]. Antimicrob Agents Chemother ,2015 ,59(3) : 1512 – 1518.
- [28] Park J , Jagasia R , Kaufmann G F , et al. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling [J]. Chem Biol ,2007 ,14(10) : 1119 – 1127.
- [29] Kirchdoerfer R N , Garner A L , Flack C E , et al. Structural basis for ligand recognition and discrimination of a quorum – quenching antibody [J]. J Biol Chem ,2011 ,286(19) : 17351 – 17358.
- [30] Vatter D A , Mihalik K , Crixell S H , et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors [J]. Fitoterapia ,2007 ,78(4) : 302 – 310.
- [31] García-Contreras R , Maeda T , Wood T K. Can resistance against quorum-sensing interference be selected? [J]. ISME J. , 2016 ,10(1) : 4 – 10.
- [32] O' Rourke J P , Daly S M , Triplett K D , et al. Development of a mimotope vaccine targeting the *Staphylococcus aureus* quorum sensing pathway [J]. PLoS One 2014 ,9(11) : e111198.
- [33] Mcann P , Snesrud E , Maybank R , et al. *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a novel IncF plasmid: first report of *mcr-1* in the United States [J]. Antimicrob Agents Chemother 2016 ,60(7) : 4420 – 4421.

Research Advances in the AIP-based Quorum Sensing Inhibitors of Gram-positive Bacteria

KONG Fandong , ZHOU Liman , MA Qingyun , HUANG Shengzhuo , ZHAO Youxing

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Haikou , Hainan 571101 , China)

Abstract: Quorum sensing (QS) is a responding phenomenon of communication between bacteria , providing a new way to study treatment of bacterial infections. The QS system with autoinducer peptides (AIPs) as signaling molecules exist in a variety of gram-positive bacteria , and is considered as an important breakthrough in development of new drugs against gram-positive bacteria , such as *Staphylococcus aureus*. The AIP-based quorum sensing inhibitors (QSIs) discovered so far include two types of molecule , small and macro. The recent researches in these two types of molecule in AIP based QSIs were reviewed to provide a reference for developing of new anti-bacterial drugs.

Keywords: Quorum sensing; AIP-based quorum sensing system; quorum sensing inhibitors; Research advances