

marker for chemoresistance in breast cancer patients who previously received neoadjuvant chemotherapy[J]. *Onkologie*, 2011, 34(12):675-680.

[24] Toyama T, Kondo N, Endo Y, et al. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(4):256-263.

[25] Wang H, Tan G, Dong L, et al. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e34210.

[26] Png KJ, Halberg N, Yoshida M, et al. A microRNA regulon that

mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells [J]. *Nature*, 2012, 481(7380):190-194.

[27] Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis[J]. *Cell*, 2009, 137(6):1032-1046.

[28] Ma L, Reinhardt F, Pan E, et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(4):341-347.

(收稿日期:2012-10-18)

• 综 述 •

微生物群体感应系统的研究进展

杜艳芬¹综述, 廖 璞²审校

(1. 泸州医学院临床检验诊断学专业, 四川泸州 646000; 2. 重庆市第三人民医院检验科, 重庆 400014)

关键词: 群体感应; 信号分子; 淬灭; 酶

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)03-0334-03

群体感应(quorum sensing, QS)是微生物间通过分泌、释放一些特定的信号分子,并感知其浓度变化,来监测菌群密度、调控菌群生理功能,从而适应周围环境的一种信号交流机制^[1],又称“细胞与细胞的交流”或“自诱导(autoinduce)”。在其调节过程中所产生的信号分子又称为自诱导素(autoinducer, AI)。早在 1965 年 Alexander 等就在肺炎链球菌 DNA 吸收机制中发现了第一个群体感应因子,这是一种由肺炎球菌分泌的多肽分子,能通过诱发相应蛋白的表达,促进外源 DNA 通过细胞壁进入细菌细胞内^[2]。随后, Nealson 等首先报道了海洋细菌费氏弧菌(*P. fischeri*)的生物发光现象是由群体感应所调控,该发光现象与细菌群体密度呈正相关^[3]。后来,越来越多的研究发现,群体感应系统广泛存在于各种微生物群体中。现在国内外已有许多关于群体感应的研究报告,本文将对微生物群体感应系统信号分子、调节机制和群体感应淬灭酶作一综述。

1 群体感应信号分子及其机制

1.1 革兰阴性菌“语言交流”机制 革兰阴性菌中,有超过 70 种的细菌利用酰基高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserine lactones, acyl-HSL 或 AHL)作为胞间交流的信号分子。AHL 是一类具有相同高丝氨酸内酯环和不同酰胺侧链的分子,酰胺链中的碳原子数(从 4~18 个,多为偶数,奇数中只有 7)和 β -位点化学修饰(氢、羟基、羰基)的不同决定了 AHL 的特异性^[4]。LuxI 是 AHL 的合成酶蛋白,以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)和不同的酰基-酰基载体蛋白(acyl-ACP)为底物催化合成差异 AHL。AHL 能够自由通过细胞膜分泌到胞外,当胞外 AHL 浓度达到临界值时,与受体蛋白 LuxR 特异性的结合,正是这种强特异性保证了细菌种内细胞间的通讯^[5]。LuxR 与 AHL 结合形成的复合物激活特定基因的表达,产生相应表型特征。研究表明,有超过 50 种的革兰阴性菌都是利用这种 LuxI/LuxR 型系统进行细胞间的交流,如:铜绿假单胞菌的 LasI/

LasR 和 RhlI/RhlR 系统;根瘤土壤杆菌的 TraI/R 系统;胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)拥有的 ExpI/R 和 CarI/R 系统等等。

另外,除了 LuxI/LuxR 型群体感应系统外,有些革兰阴性菌中还存在其他类型的群体感应系统,如铜绿假单胞菌中存在另外一套由 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone(PQS)介导的群体感应系统,能调节该菌毒力因子产生,还能与以上两套系统相互联系共同发挥调节功能^[6]。最新研究发现,铜绿假单胞菌中还存在一种 QS 的辅助系统 GacS/GacA,且已证明其在促进生物膜形成、毒力因子产生中发挥着重要作用^[7]。

1.2 革兰阳性菌寡肽分子和群体感应 革兰阳性菌中用于种内特异性交流的信号分子是寡肽或称自体诱导肽(autoinducing peptide, AIP)。大多数的寡肽分子都是经过前体肽加工、修饰(加入内酯、硫代内酯环、羊毛硫氨酸或异戊二烯基等)后形成,其氨基酸残基在 5~17 个间变化。与 AHL 不同, AIP 不能自由通过细胞膜,需要 ABC 载体或其他膜通道蛋白将其转出胞外; AIP 的感应和识别是由双组分信号传导系统(TCS)完成^[8]。如在肺炎链球菌中, comC 基因编码合成的 AIP 分子不能自由进出细胞膜,需要在 comAB 基因帮助下将其转出胞外。当胞外 AIP 浓度达到阈值水平时,首先与细胞膜上 TCS 的受体蛋白 comD 结合,通过磷酸化途径将信号传递给效应器 ComE,最终完成信号传递和基因表达调控^[9]。相似的群体感应系统在其他革兰阳性菌中也有发现,如芽孢杆菌属和葡萄球菌属。

革兰阳性菌的 AIP 分子似乎具有双重功能,如金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)所产生的环化肽分子 AgrD1 除了能促进本种属细菌的群体感应功能外,还具有抑制其他同类菌属群体感应系统的作用^[10]。除了 AIP 分子外,革兰阳性菌中,还存在其他一些特殊的信号分子,如链霉菌(*Streptomyces*)中调控抗菌素合成的 γ -丁酸内酯;黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)中对

于子实体形成和产孢具有重要调控作用的 A 因子和 C 因子等。

1.3 细菌种间交流“语言”和机制 除了种属特异性交流,细菌还拥有另一种用于种间交流的非特异性语言,其信号分子是由 LuxS 蛋白酶催化合成的呋喃酮酰硼酸二酯(AI-2)。AI-2 首先在哈氏弧菌中被发现,该菌中 AI-2 的受体是 LuxP 蛋白。当 AI-2 浓度较低时,LuxQ 蛋白发生自身磷酸化,在 LuxU 帮助下将磷酸基团传递给下游的效应蛋白 LuxO,通过 σ_{54} 因子的协助作用激活具有调控能力的小 RNA(sRNA)的表达,然后 sRNA 与 Hfq 共同作用抑制 LuxR 蛋白合成,从而抑制荧光素酶操纵子 luxICDABE 转录。反过来,当 AI-2 浓度升高达到一定阈值时,AI-2 与相应 TCS 感应蛋白 LuxP 结合成 LuxP-AI-2 复合物,从而激活发光基因的转录,产生发光现象^[11]。霍乱弧菌的 LuxS/AI-2 调控系统机制与哈氏弧菌大致相同^[12]。最新研究发现,在金黄色葡萄球菌中,LuxS/AI-2 系统也能通过一个双组分系统 KdpDE 调节胞外多糖荚膜的产生,影响生物膜的形成。但是,具体的作用机制目前还不是很清楚^[13]。AI-2 分子除了作为细菌间交流的“通用语言”外,在大多数的大肠杆菌中还参与了代谢调节,如 AI-2 直接调节编码 ABC 转运系统的基因。除了 AI-2 外,还发现了另一个可以介导种属间交流的信号分子 AI-3,它是由人体肠道正常菌群以及病原菌合成分泌的,在大肠杆菌中 AI-3 分子特异受体是 QseBC 双组分系统。而 QseBC 双组分系统是人体肠道去甲肾上腺素和肾上腺素受体感应系统,这似乎表明了人体肠道的肾上腺受体对 AI-3 分子也能做出应答。因此,AI-3 分子也可能介导了不同界生物间的信息相互交流^[14]。但是,目前对其作用机制还不是很清楚。

1.4 真菌群体感应 最近研究者们发现,在真菌中也存在群体感应,而且越来越多的证据显示不同的真菌表现出了多种群体感应依赖的表型特征。人类机会致病菌白色念珠菌(*C. albicans*)中的苯乙醇和色醇金合欢醇(E-farnesol)是首先被发现的群体感应信号分子,能抑制真菌的生长和发芽管的形成。近来,研究发现白色念珠菌中还存在另外 3 种群体感应信号分子:金合欢醇(E-farnesol)、对羟基苯乙醇(tyrosol)和麝油酸(farnesoic acid)^[15]。其中金合欢醇是研究的最多的分子,不但能抑制白色念珠菌由酵母型转变成菌丝性,还能诱导抗氧化基因表达来抵抗氧化应激状态的作用^[16]。其他的真菌也有被报道具有群体感应信号分子,如新型隐球菌拥有一种含有 11 个氨基酸的多肽信号分子,能促进该真菌在固体培养基上生长。酿酒酵母中也存在苯乙醇和色醇以细胞密度依赖的方式调控着其假菌丝的生长^[17]。这些都表明,群体感应系统在真菌中也发挥着重要的作用,但是目前的研究还处于初级阶段,对于大多数真菌的信号分子及其作用机制仍然不清楚。然而,可以通过研究真菌中群体感应的作用机制,来了解其致病原理,从而为研发新的抗真菌药物提供新的理论依据。

2 群体感应系统淬灭酶

在耐药菌株不断出现的今天,特别是“超级细菌”的出现,传统的抗菌药物已不能满足临床抗菌需求,寻求新型抗菌药物已迫在眉睫。此时,群体感应进入了研究者的视野,它广泛地存在于各种病原微生物中,调控着多种病原菌的侵袭力、毒力因子以及耐药性。而且,阻断其传导过程不会对细菌的生长产生抑制或杀灭作用,从而不会对细菌产生选择性压力,这就

为其成为新抗菌药物作用靶点提供了极大可能。目前,人们已经从原核生物和真核生物中鉴定出了一些群体感应淬灭酶,这些群体感应淬灭酶能通过降解细菌信号分子,干扰细菌群体感应系统,来破坏其参与调控的生物学功能。因此,群体感应淬灭酶能够作为先导化合物来研发和合成新一代的抗菌药物。

2.1 原核生物中群体感应淬灭酶

2.1.1 AHL 内酯酶 AHL 内酯酶是一类能水解 AHL 分子内酯环酯键而使其失活的蛋白酶。Dong 等首先在枯草芽孢杆菌 240B1 中发现了第一个 AHL 内酯酶,是由 *aiiA* 基因编码的拥有 250 个氨基酸的 AiiA 酶^[18]。该酶被认为是金属酶超家族中的一员,因为具有与其他金属酶(醛酮变位酶 II、芳硫酸酯酶、 β -内酰胺酶)相似的锌结合基序“His¹⁰⁴-X-His¹⁰⁶-X-Asp¹⁰⁸-His¹⁰⁹”。定点突变诱导研究发现,“His¹⁰⁶-X-Asp¹⁰⁸-His¹⁰⁹-59X-His¹⁶⁹-21X-Asp¹⁹¹”序列是 AHL 内酯酶活性的必须部分。AHL 内酯酶是目前发现的最具特异性的 AHL 降解酶,能同效降解短链和长链的 AHL 分子,但是对于其他化合物如非酰基化的内酯和芳香羧酸酯的作用活性很低甚至没有。将芽孢杆菌来源的 *aiiA* 基因在不同的致病菌中表达,如铜绿假单胞菌、伯克氏菌属和欧文氏菌,都会显著降低其 AHL 分子浓度^[19]。随着研究的不断深入,研究者们分别在原核生物根瘤土壤杆菌、红平红球菌和硝化菌属中发现其他 4 类 AHL 内酯酶——AttM, AiiB, QsdA 和 BpiB^[20]。

2.1.2 AHL 酰基转移酶 AHL 酰基转移酶是原核生物中存在的第二大类 AHL 降解酶,作用于脂肪酰侧链与高丝氨酸内酯相连接的酰胺键。在罗尔斯顿菌属 XJ12B 中发现的 *AiiD* 酶是第一个被鉴定出的 AHL 酰基转移酶,是一种存在于细胞外周胞质中的膜结合或膜相关蛋白。研究发现,*AiiD* 酶与其余两种被鉴定出的 AHL 降解酶:铜绿假单胞菌 PAO1 的 PvdQ 酶和链霉菌属的 AhlM 酶一样都拥有许多 Ntn-hydrolyase 的明显特征,包括一个疏水性信号肽,紧随其后的是 α 亚基、间隔序列和 β 亚基。这表明,AHL 酰基转移酶很可能与头孢菌素和青霉素酰基转移酶一样都是 Ntn-hydrolyase 家族中的成员^[21]。理论上,AHL 酰基转移酶在体内、外都具有很强的活性,铜绿假单胞菌中 *AiiD* 酶重组体的表达能抑制胞外 AHL 分子的积聚,减少毒力因子的表达和损伤群集运动能力,还能降低其对线虫的麻痹作用和杀伤力。除了上述 3 种酶外,研究者们发现了另外两种 AHL 酰基转移酶,包括铜绿假单胞菌的 QuiP 酶和 *Anabaena* SP. PCC7120 中的 *AiiC* 酶^[22]。

2.1.3 其他群体感应分子的淬灭酶 在群体感应的其他信号分子中,如 AIP 和 AI-2 等,目前还没有发现有直接水解活性的酶存在。但是有研究发现,吞噬细胞 NADPH 氧化酶缺失的小鼠比正常小鼠对金黄色葡萄球菌有更强的易感性,体外分析显示,吞噬细胞 NADPH 氧化酶的代谢终产物 HOCl 和 ONOO⁻能够氧化多肽羧基末端甲硫氨酸而使 AIP 失活。但是,吞噬细胞 NADPH 氧化酶间接介导的抑制作用并不是对所有金黄色葡萄球菌都起作用,因为不是所有 AIP 分子都具有甲硫氨酸残基^[23]。同时,铜绿假单胞菌的第三类信号分子 PQS 也被报道能够被酶催化氧化。例如:土壤杆菌 *Arthrobacter nitroguajacolicus* 的双加氧酶(Hod)能将 PQS 转化成 N-辛酰基-邻氨基苯甲酸和一氧化碳,从而降低受 PQS 调控的毒力因子表达^[24]。

2.2 真核生物中的群体感应淬灭酶 研究表明,真核生物也

一直暴露于群体感应的信号分子环境中,这些信号分子由寄生在不同真核宿主体内的细菌所产生,如:哺乳动物体内、植物根围或真菌附近。不同的真核宿主表现出了对群体感应信号分子的不同反应。近来,有一些植物主要是豆科植物(紫草苜蓿、三叶草和豆薯等)被报道能够降解 AHL 分子,而且这种降解活性与内酯酶有着密切的关系^[17]。同样的降解活性在植物根围的真菌中也有发现。但是目前这种酶的生化特性和氨基酸序列还未被确定,有待更近一步的研究。人类不同上皮细胞也能够产生水解 AHL 分子的对氧磷酶(PONs),包括: PON1、PON2 和 PON3,三者蛋白水平上具有 60% 的同源性。PONs 是一类具有内酯酶类活性的 Ca^{2+} 依耐蛋白酶。研究表明,能够表达 PON1、PON2 和 PON3 的重组的动物 CHO 细胞显示出了很强的 AHL 降解活性。从人类血清中提纯的 PON1 酶,能降解铜绿假单胞菌的 3-oxo-C12 HSL 信号分子,从而消除该菌生物被膜的形成。PONs 还具有广泛而重要的生理水解活性,如药物代谢和有机磷酸酯解毒作用^[25]。

3 展 望

现在,大量的研究者致力于细菌群体感应的研究,特别是群体感应抑制剂方面。研究者们分别以群体感应信号分子的产生,信号分子积聚以及信号分子感应等重要靶点出发进行抑制剂的研究,并且取得了很好的进展。但是,由于群体感应信号分子的多样性及其机制的复杂性,要将其研究成果运用于实际临床治疗中还有一段距离。因此,研究者希望对病原群体感应进行不断深入的研究,充分了解其信号分子和作用机制,为临床抗菌治疗提供有力的理论依据和新策略,并能够研发出能直接应用于临床的新生代抗菌药物。

参考文献

[1] Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden SD, et al. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways[J]. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 28-67.

[2] Tomasz A. Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria[J]. *Nature*, 1965, 208(2): 155-192.

[3] Nealson KH. Autoinduction of bacterial luciferase: Occurrence, mechanism and significance[J]. *Arch. Microbiol*, 1977, 112(1): 73-79.

[4] Kaufmann GF, Sartorio R, Lee SH, et al. Antibody interference with N-acyl homoserine lactone-mediated bacterial quorum sensing[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(9): 2802-2803.

[5] Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network[J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43(2): 197-222.

[6] Veselova MA. Quorum sensing regulation in *pseudomonas*[J]. *Genetika*, 2010, 46(2): 149-158.

[7] 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(2): 232-239.

[8] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005, 21(3): 319-346.

[9] Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, 10(2): 145-167.

[10] Ji G, Beavis R, Novick RP. Bacterial interference caused by auto-inducing peptide variants[J]. *Science*, 1997, 276(20): 2027-2030.

[11] Rutherford ST, van Kessel JC, Shao Y, et al. AphA and LuxR/HapR reciprocally control quorum sensing in vibrios[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(4): 397-408.

[12] Roy V, Adams BL, Bentley WE. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 49(2): 113-123.

[13] Zhao L, Xue T, Shang F, et al. *Staphylococcus aureus* AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(8): 3506-3515.

[14] Rollins SM, Schuch R. Crowd control: *Bacillus anthracis* and quorum sensing. *Virulence*[J]. Mar-Apr, 2010, 1(2): 57-59.

[15] Han TL, Cannon RD, Villas-Boas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing[J]. *Fungal Genet Biol*, 2011, 48(8): 747-763.

[16] Langford ML, Atkin AL, Nickerson KW. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans* [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(10): 1353-1362

[17] De Sordi L, Mühlshlegel FA. Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence[J]. *FEMS Yeast Res*, 2009, 9(7): 990-999.

[18] Dong YH, Xu JL, Li XZ, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3526-3531.

[19] Kalia VC, Raju SC, Purohit HJ. Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and -lactonase[J]. *Open Microbiol J*, 2011, 5(1): 11-13.

[20] Amara N, Krom BP, Kaufmann GF, et al. Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond [J]. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 195-208.

[21] Dong YH, Wang LY, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007, 362(1483): 1201-1211.

[22] Chen CN, Chen CJ, Liao CT, et al. A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GM1000 is N-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity[J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9(1): 89.

[23] Yang F, Wang LH, Wang J, et al. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(24): 3713-3717.

[24] Dustelny C, Albers A, Buldt-karentzopoulos K, et al. Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chem. Biol*, 2009, 16(12): 1259-1267.

[25] Camps J, Pujol I, Ballester F, et al. Paraoxonases as potential anti-biofilm agents: their relationship with quorum-sensing signals in Gram-negative bacteria[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(4): 1325-1331.