

# 病原菌的群体感应及其抑制剂的研究进展

程古月, 郝海红, 戴梦红, 刘振利, 袁宗辉\*

华中农业大学国家兽药残留基准实验室(HZAU), 农业部食品兽药残留检测重点实验室, 武汉 430070

\* 联系人, E-mail: yuan5802@mail.hzau.edu.cn

2011-12-01 收稿, 2012-01-16 接受

**摘要** 随着病原菌耐药性特别是多重耐药性的日益严重, 抗菌药作用新靶点的发现和新型抗菌药物的研发显得尤为重要. 病原菌的致病作用常受到与其群体密度相关的群体感应(quorum-sensing, QS)系统的调控. 细菌通过释放和交换自诱导信号分子(autoinducers, AIs)以调控致病相关基因的表达, 从而影响细菌的毒力、黏附和生物膜的形成等. 不同种类的 AIs 介导不同的 QS 系统, 阻止 AIs 的积累或与其受体的识别和结合就可以抑制 QS 调控的致病基因的表达. 因此, QS 抑制剂(quorum-sensing inhibitors, QSIs)有望成为控制病原菌感染和耐药性产生的有效武器. 迄今发现的 QSIs 有非肽类小分子化合物、肽类化合物和蛋白质(包括淬灭 QS 的酶和抗体). 此外, 一些竞争性的细菌或动物也可以清除 AIs 从而起到 QSIs 的作用. QSIs 可以通过天然的 QSIs 指示菌株、人工构建的工程菌或者计算机模拟等方法进行筛选. 对 QS 介导的病原菌致病机理的不断深入研究将为新型的 QSI 靶标的选择提供帮助, 通过将 QSIs 和传统抗菌药物联合使用有望达到更好的治疗效果并预防细菌耐药性的产生.

## 关键词

群体感应  
群体感应抑制剂  
病原菌  
筛选方法

1994 年, Fuqua 等人<sup>[1]</sup>首次发现, 微生物群体在生长过程中, 因群体密度增加, 其生理生化特性发生变化, 出现少量菌体或单个菌体所不具备的一些特征. 种群密度达到阈值时, 所分泌的自诱导信号分子(autoinducers, AIs)也达到一定浓度. AIs 与受体结合后, 通过信号传导而影响特定基因表达, 调控群体生理特征, 如生物发光、抗生素合成、生物被膜(biofilm)形成、产生毒素和生成孢子等, 这就是所谓的群体感应(quorum-sensing, QS). 利用 QS 进行“细胞对细胞的交流”, 微生物能够在复杂的环境中协调一致, 以“团队作战能力”使整个种群更好地存活下去<sup>[2]</sup>.

目前临床上广泛使用的抗生素都是以细菌的蛋白质合成、核酸合成、细胞壁合成和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<sup>[3]</sup>. 目前对于新抗菌药物的研发呈逐年减

缓趋势, 其中一个很重要的原因就是传统方法筛选抗菌药物不能解决耐药性和新出现的病原菌所带来的问题, 因此很有必要拓宽思路以寻找新的作用靶点来开发新型抗菌药物. 近些年来, 细菌群体感应系统成为药物研究者关注的焦点. 研究发现, 许多病原菌的致病机制都依赖细菌 QS 系统的调节和控制<sup>[4]</sup>. 因此, 筛选高效的群体感应抑制剂(quorum-sensing inhibitors, QSIs)有望成为解决细菌感染以及耐药性问题的一个有效途径. 作用于群体感应系统的抗菌药物与传统抗生素相比, 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<sup>[5,6]</sup>.

近些年来国内外对 QS 和 QSIs 的研究发展迅速, 并取得了一些进展. 本文将介绍细菌群体感应系统及其对病原菌致病性的调控, 并对 QSIs 的作用原理、分类和研发状况做一综述. 随着对 QSIs 的不断研究, 传统抗菌药物的研发瓶颈将有望打破. 对由 QS 介导

的病原菌致病机理的不断探索将为新型 QSI 靶标的选择提供帮助。今后, QSI 可能部分替代传统抗菌药物或与后者联合使用以达到更好的治疗效果, 并可以预防细菌耐药性的产生。

## 1 细菌群体感应系统及其对致病性的调控

### 1.1 QS 系统

QS 系统由 AIs、受体和下游的调控蛋白组成。AIs 是 QS 过程的起始信号分子, 由细菌合成并释放到胞外, AIs 的浓度能随细菌密度的增加而增加。当达到一个临界浓度时, AIs 能启动菌体中相关基因的表达, 调控细菌的行为。AIs 与细胞内或细胞膜上相应的受体分子结合后, 通过下游的调控蛋白或直接调控相关基因的表达。

AIs 分子(图 1)有以下几类, 分别介导不同群体感应系统:

(1) 革兰氏阴性( $G^-$ )菌分泌的酰基高丝氨酸内酯化合物(*N*-acyl-homoserine lactones, AHLs)。AHLs 具有一个共同的高丝氨酸内酯环头部, 不同 AHL 分子具有不同的酰基侧链尾巴, 差异可能在于侧链长短和取代基不同, 这也造成了微生物在利用 AHLs 信号分子时具有一定特异性。在费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)中, AHLs 扩散到细胞内以后与胞内受体 LuxR 结合形成复合体, 并结合到 DNA 上, 启动相关基因的表达<sup>[7]</sup>。

(2) 革兰氏阳性( $G^+$ )菌分泌的自体诱导肽(auto-inducing peptides, AIPs)。AIPs 是一类短肽分子, 不具有典型结构。AIPs 不能进入微生物胞内, 而是通

过与膜受体结合使受体磷酸化, 将信号传递给下游的反应调节蛋白, 磷酸化的反应调节蛋白与 DNA 结合启动目的基因的表达。

(3) 自诱导物 II 类分子(AI-2s)。AI-2 活性广泛存在于各种微生物中, 由 Bassler 等人<sup>[8]</sup>于 1993 年发现, 其合成与 *luxS* 基因有关<sup>[9]</sup>。AI-2s 的分子本质是呋喃酮酰硼酸, 由 LuxS 等蛋白从 *S*-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosyl-*L*-methionine, SAM)经过三步反应合成。AI-2s 信号分子能够被多种微生物识别, 是不同菌种之间的共同“语言”。在哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)中, AI-2s 的受体分子为 LuxP 和 LuxQ, 其中 LuxQ 通过 LuxU 将信号传递给调节蛋白 LuxO, 并在 LuxR 的协助下启动相关基因的表达<sup>[10]</sup>。

(4) 其他信号分子。除了以上几类信号分子, 一些喹诺酮类化合物, 如 PQS (*Pseudomonas* quinolone signal)<sup>[11]</sup>, 某些酯类化合物和脂肪酸<sup>[12]</sup>等都可被用作 QS 信号分子。

### 1.2 QS 对病原菌致病性的调控机理

致病菌定殖到宿主体内以后, 产生各种毒力因子, 导致宿主发病, 这些毒力因子包括分泌到胞外的蛋白质酶类、特定的细胞毒素。此外, 许多病原菌都能产生特定的黏附因子, 包括 S 层蛋白、鞭毛和外膜蛋白等, 它们非特异或特异地结合在宿主的特定部位, 定殖下来为进一步危害宿主做准备。最后, 病原菌形成对外界各种不良环境(包括高酸碱性和抗生素等)的抗性来保护自身, 在宿主体内形成生物被膜, 抵抗宿主的免疫和介导对药物的抗性。

众多病原菌的致病基因受到 QS 的调控, 包括毒力因子、黏附因子以及介导病原菌抵抗宿主免疫和药物的相关基因。以下是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, 以下简称大肠杆菌)这三种常见病原菌中 QS 系统对细菌毒性产生的调控机制(图 2)。

(1) 铜绿假单胞菌。铜绿假单胞菌是一种常见的  $G^-$  致病菌, 是引起病人在住院期间发生感染的第三大致病菌<sup>[13]</sup>。如图 2(a)所示, 该菌的 QS 系统主要由基于 AHLs 的 *las* 和 *rhl* 系统以及 PQS 信号系统组成。在 *las* 系统中, 由 *las I* 编码的酶 Lsa I 合成的信号分子 *N*-3-氧十二酰基高丝氨酸内酯(*N*-3-oxododecanoyl-homoserine lactone, 3-oxo-C12-HSL)与胞浆受

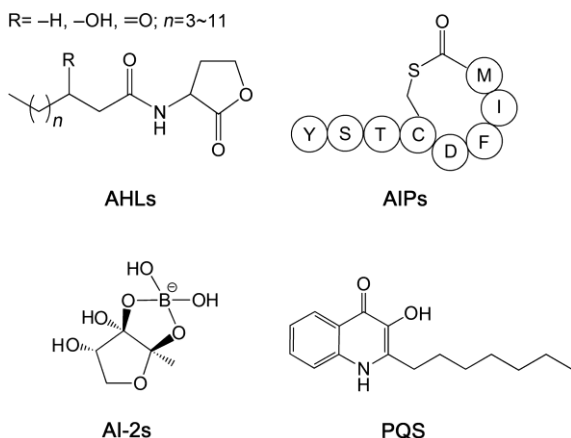


图 1 群体感应信号分子的结构

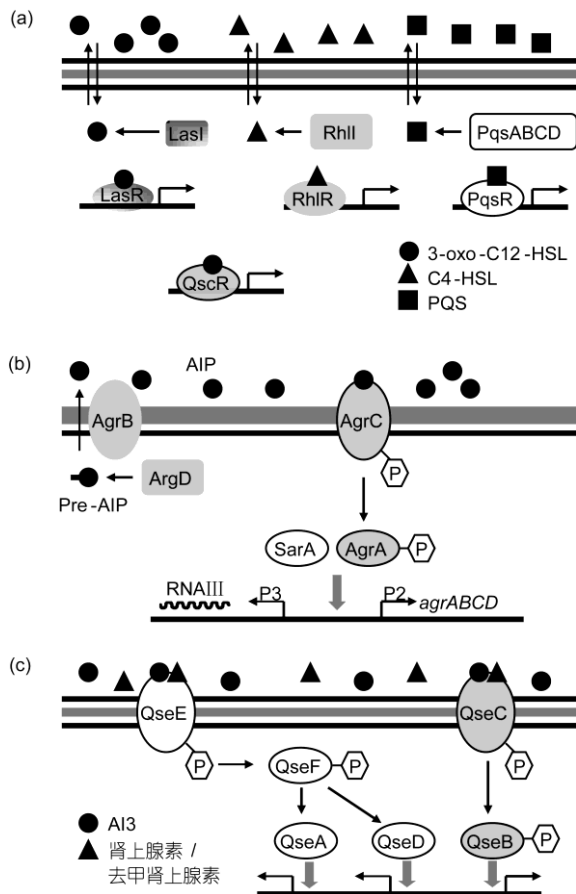


图 2 铜绿假单胞菌(a)、金黄色葡萄球菌(b)和大肠埃希氏菌(c)中与细菌毒性相关的群体感应调控

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和碱性蛋白酶等基因的表达, 同时也能够促进 3-oxo-C12-HSL 的合成, 形成一个正反馈调节。在 *rhl* 系统中, 由 *rhl I* 编码的酶 Rhl I 合成的正丁基高丝氨酸内酯(*N*-butyl-homoserine lactone, C4-HSL)与 RhIR 结合形成复合物(RhIR-AHL), 激活其他一些毒力因子包括稳定期  $\sigma$ -因子、绿脓菌素、鼠李糖脂、氢氰酸、弹性蛋白酶等的产生, 同时也能促进 C4-HSL 分子的合成。las 系统可以在转录和翻译后水平控制 *rhl* 系统。此外, 孤儿受体蛋白 QscR 可以感应 3-oxo-C12-HSL 来调控吩嗪、氢氰酸、弹性蛋白酶和细菌运动性相关基因的表达。PQS 信号系统是以 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, 又称 PQS)为信号分子的调控系统。*pqsABCD* 基因编码产物合成 PQS 的前体 2-庚基-4-喹诺酮(2-heptyl-4-quinolone, HHQ), 然后由受 las 系统调控的 PqsH 转

变为 PQS。HHQ 或 PQS 都可以结合 PqsR 受体并将其活化, 正调控毒力因子的表达, 如弹性蛋白酶、绿脓菌素和凝集素的表达等。PqsR 的活化能够调控 *pqs* 操纵子, 形成一个正反馈调节回路, 同时 PqsR 本身受到 las 系统的正调控。

(2) 金黄色葡萄球菌。金黄色葡萄球菌是一种危害极大的 G<sup>+</sup>条件致病菌<sup>[14]</sup>。如图 2(b)所示, 该菌的 QS 系统主要是基于 AIP 的 *agr* 系统。AIP 原型(pre-AIP)由 *agrD* 编码, 通过膜蛋白 AgrB 加工成熟为 AIP 并分泌至胞外。AgrC 是一个膜受体激酶, 与 AIP 结合以后使得 AgrA 被磷酸化并活化, 结合到 P2 和 P3 启动子。P2 启动产生的 RNA II 转录本包含 *agr* 操纵子的四种基因, 分别为 *agrA*, *agrB*, *agrC* 和 *agrD*。P3 启动产生 RNA III 转录本, 是 *agr* 系统的效应分子。RNA III 不仅编码  $\delta$ -毒素, 还可以激活  $\alpha$ -溶血素、毒素、包膜蛋白和蛋白酶的表达, 下调黏附素的表达和蛋白 A 的合成。除此以外, *sarA* 和 *arg* 一同整体调控生物膜的形成。

(3) 大肠杆菌。大肠杆菌也是一种条件致病菌。对肠出血性大肠杆菌(enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC)和肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC)的研究表明, *luxS* 控制由肠上皮细胞擦抹基因座(locus of enterocyte effacement, LEE)致病岛编码的 III 型分泌系统(type III secretion system, TTSS)的表达<sup>[15]</sup>, 使效应器蛋白移位至肠上皮细胞, 导致显著的细胞支架改变, 并引发附着擦抹(attaching and effacing, AE)性损害。虽然 *luxS* 负责合成 AI-2, 但是后者并未参与 *luxS* 对 LEE 的调控, 后来人们发现一种新的信号分子 AI-3 参与了 QS 介导的 LEE 的调控<sup>[16]</sup>。如图 2(c)所示, LuxS/AI-3 QS 系统调控了 EHEC 的 TTSS、鞭毛、泳动力及其毒力基因的表达。该调控中存在级联反应, 至少有 7 种由 *qse* 基因编码的调控因子参与, 编码基因为 *qse*。细胞外膜受体 QseC 或 QseE 识别 AI-3 和肾上腺素/去甲肾上腺素后, 通过两种主要的双组分系统 QseBC 及 QseEF 发挥作用。例如, QseC 感应这些信号被磷酸化而活化, 进一步使 QseB 应答调节器磷酸化, 与 *flhDC* 启动子结合激活鞭毛调节器表达, QseB 也可与自身启动子结合正调控自身的转录。QseE 感应信号激活 LEE 基因表达, 导致 AE 损害, QseF 是组氨酸激酶 QseE 的应答调节器, 控制细菌效应器蛋白 EspFu 的转录, 该蛋白能诱导细菌黏附所需要的肌动蛋白基座的形成; QseF 还可以

和 LysR 家族成员 QseA 和 QseD 作用, 进一步调控 *LEE* 基因表达。另外, *qse* 操纵子中的 *qseG* 编码一个外膜蛋白, 参与 III 型分泌系统效应器蛋白移位到宿主细胞过程。

## 2 群体感应抑制剂

以基于 AHLs 的 QS 系统为例, 可以通过以下三条途径干扰细菌的 QS 系统: ① 抑制 AHLs 信号分子的合成。由于抑制 AHLs 信号分子合成的同时会影响脂肪酸代谢过程, 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。因此, 可以利用合成 AHLs 底物的类似物来阻断 AHLs 信号分子的形成, 例如类似物有 ACP 同系物、*L/D*-S-腺苷高半胱氨酸和丁酰-S-腺苷蛋氨酸等<sup>[17]</sup>。② 促进 AHLs 信号分子的降解。已在细菌中发现有许多降解 AHLs 的群体感应淬灭酶, 如细菌的酰基转移酶和内酯酶, 红球菌属的氧化还原酶以及哺乳动物中的对氧磷酶等。③ 抑制 AHLs 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 QSIs 筛选模型主要是基于这一途径。

根据 QSIs 分子的性质, 可以将其分为非肽类小分子化合物、肽类化合物(主要是 AIPs 同系物)和蛋白质。其中, 非肽类小分子 QSIs 有天然来源和人工合成的, 而蛋白质类 QSIs 主要包括 QS 淬灭酶(quorum quenching enzymes, QQ 酶)和 QS 淬灭抗体(quorum quenching antibodies, QQ 抗体)。最近, 人们还发现利用竞争性生物体来清除信号分子以达到淬灭细菌 QS 的目的。

### 2.1 天然非肽类 QSIs

植物可以产生 QSI 活性来降低侵染菌的致病能力, 目前已有许多文献报道了从自然植物资源中可以分离获得 QSIs。首先被发现具有 QS 抑制活性的天然产物是由海洋红藻(*Delisea pulchra*)产生的溴化呋喃酮(brominated furanones), 它能够抑制细菌的 QS, 大幅降低生物膜对抗生素的抵抗性<sup>[18]</sup>。呋喃酮的结构类似于 HSLs (homoserine lactones), 可以干扰信号分子 AHLs 与受体蛋白 LuxR 的结合而影响 QS 系统<sup>[19]</sup>。同时, 溴化呋喃酮也可以抑制 AI-2 介导的 QS<sup>[20]</sup>。

除海洋红藻以外, 人们在一些高等植物和动物组织中也分离到 QSI 活性物质。例如, 从金缕梅的树

皮和叶子中分离得到的金缕梅单宁能够干扰表皮葡萄球菌和耐甲氧西林金葡萄菌的 QS 系统<sup>[21]</sup>。一种风车子属植物(*Combretum albiflorum*)所含的类黄酮物质可以抑制铜绿假单胞菌绿脓菌素、弹性蛋白酶和生物膜的形成<sup>[22]</sup>。从食用植物中也可以提取 QSI 活性物质, 如胡萝卜、大豆、豌豆、西红柿和大蒜等<sup>[3,23]</sup>。其中, 大蒜提取物中的 QSI 活性物质可以降低由铜绿假单胞菌引起的小鼠死亡率<sup>[24]</sup>。还有一些天然化合物如从牛等家禽的肉制品中分离到的脂肪酸也可以发挥 QSI 作用<sup>[25]</sup>。

自然环境中多种微生物为了争夺生存空间和营养物质, 会产生一些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<sup>[26]</sup>。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)可以抑制铜绿假单胞菌的 QS 活性<sup>[27]</sup>。一种真菌二次代谢产生的有机酸(ambuic acid)可以抑制金黄色葡萄球菌、英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的 QS 信号分子的合成<sup>[28]</sup>。由嗜盐芽胞杆菌(*Halobacillus salinus*)发酵液中分离得到的两种醋酸苯乙酯类化合物可以抑制哈氏弧菌发光基因的表达, 同时也能够有效降低紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)的紫色菌素产量<sup>[29]</sup>。

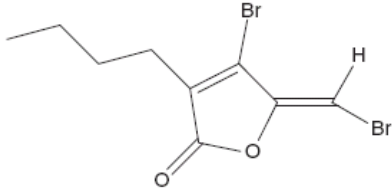
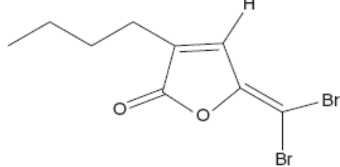
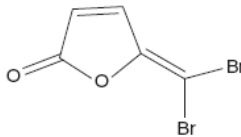
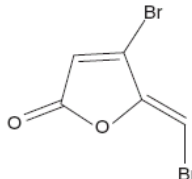
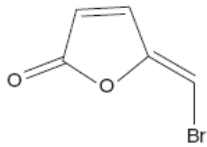
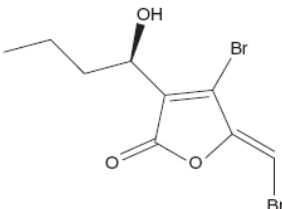
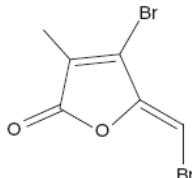
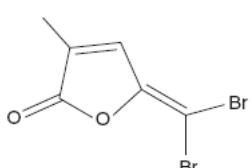
### 2.2 人工合成非肽类小分子 QSIs

以天然信号分子的化学结构为模板合成信号分子的竞争性抑制剂, 是获得 QSIs 的重要途径。例如, 合成 AHLs 结构类似物的方式主要有 3 种: 保持内酯环结构不变的条件下在酰基侧链中引入取代基、维持酰基侧链不变前提下在内酯环中引入取代基或替代物、在酰基侧链和内酯环中同时进行结构修饰。目前, 有很多文献和专利报道合成了各种 AHLs 结构类似物并对其 QSI 活性进行了评价<sup>[30-32]</sup>。

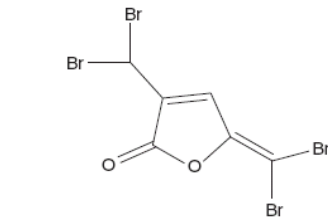
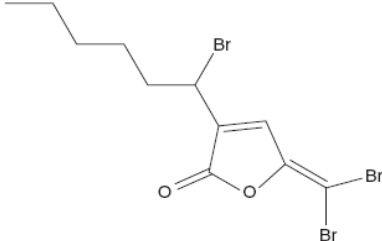
根据天然溴化呋喃酮的结构, 人们设计了侧链和呋喃环上具有不同取代基以及具有不同侧链长度的化学分子文库, 并证实了其中一些化合物的 QSI 活性(表 1)。

AI-2 同系物在控制细菌感染和生物被膜的形成方面有潜在的应用价值。Tedder 等人<sup>[38]</sup>报道了几种 AI-2 同系物可以抑制 AI-2 合成相关酶—MTA 核苷酶。哈氏弧菌发光实验证实了一些 AI-2 同系物可以干扰 AI-2 来阻断 QS<sup>[39]</sup>。除此以外, 一些硼酸化合物<sup>[40]</sup>和

表 1 几种代表性的溴化呋喃酮

| 化合物结构                                                                               | 作用                                                                                           | 参考文献          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|    | 抑制基于 AHLs 和 AI-2s 的 QS 系统; 抑制大肠杆菌的运动能力和生物膜的形成; 抑制枯草芽胞杆菌生物膜的形成, 减少存活细菌; 抑制炭疽杆菌的生长             | [19,20,33~35] |
|    | 抑制炭疽杆菌的生长                                                                                    | [33]          |
|    | 抑制炭疽杆菌的生长                                                                                    | [33]          |
|   | 通过加速 LuxR 的周转代谢来抑制 QS; 移除已经形成的铜绿假单胞菌生物膜, 增加铜绿假单胞菌生物膜对妥布霉素的敏感性, 增强鼠免疫系统对铜绿假单胞菌的清除率; 抑制炭疽杆菌的生长 | [18,33,36]    |
|  | 通过加速 LuxR 的周转代谢来抑制 QS                                                                        | [36]          |
|  | 通过加速 LuxR 的周转代谢来抑制 QS                                                                        | [36]          |
|  | 抑制大肠杆菌生物被膜的形成                                                                                | [35]          |
|  | 抑制大肠杆菌生物被膜的形成                                                                                | [35]          |

(续表 1)

| 化合物结构                                                                             | 作用                            | 参考文献 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------|
|  | 抑制大肠杆菌生物被膜的形成                 | [35] |
|  | 抑制表皮葡萄球菌生物被膜的形成, 控制该菌对绵羊模型的感染 | [37] |

DPD 同系物(DPD 为 AI-2 的合成底物)同样也被证实是 AI-2 的拮抗剂<sup>[41,42]</sup>。

除上述信号分子结构类似物以外, 人们对一些已知有机小分子化合物库进行随机筛选, 发现了一系列能有效抑制病原菌 QS 的单体化合物<sup>[43]</sup>。例如, Rasmussen 等人<sup>[3]</sup>利用 QSI 选择器(QSIS)筛选发现了多个能够阻断 *lux* 和 *las* 系统的化合物, 其中 4-硝基吡啶-*N*-氧化物(4-NPO)最为有效。德克萨斯大学西南医学研究中心对 15 万个有机小分子化合物进行筛选, 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、沙门氏菌、弗朗西斯菌的 QSec 调控系统<sup>[44]</sup>, LED209 具有极低的细胞毒活性, 目前该化合物已经进入了临床前期研究阶段。Swem 等人<sup>[45]</sup>发现, 氯硫内酯(chloro thiolactone)和氯内酯(chloro lactone)对紫色杆菌和哈氏弧菌均有 QSI 活性。人们还发现阿奇霉素和红霉素等大环内酯类抗生素也可以抑制 QS<sup>[46,47]</sup>。

### 2.3 AIPs 同系物

AIPs 是一类短肽分子, 是  $G^+$  菌的信号分子。Mayville 等人<sup>[48]</sup>发现 AIP 分子的尾部结构变化只能影响细菌本身 *agr* 系统的活化, 但不能影响跨细菌种属的 QS 抑制活性。根据这个发现, 人们设计了一些 AIP 的结构类似物作为 QSIs。例如, 尾部丙氨酸被修饰的 AgrD II 肽和 AgrD II 内酯及内酯衍生物可以强烈地抑制跨细菌种属的 *agr* 系统, 但是不能活化细菌自身的 *agr* 系统<sup>[48]</sup>。一个只含有硫内酯环结构的 AIP 肽可以

同时作为金黄色葡萄球菌群体内和群体间的 QSI<sup>[49]</sup>。

除了环状的 AIP 肽以外, 一种线状的序列为 YSPWTNF-NH<sub>2</sub> 的 RNA III 抑制肽(RNA III inhibiting peptide, RIP)具有很好的治疗作用<sup>[50]</sup>。RIP 的作用机理尚不明确, 推测其通过与 RNA III 激活蛋白(RNA III activating protein, RAP)竞争, 导致后者的靶蛋白 TRAP 的磷酸化减弱, 从而抑制 RNA III 的合成, 减弱金黄色葡萄球菌的毒力<sup>[51]</sup>。同时人们还发现 RIPs 可以抑制细菌耐药性的发生<sup>[52]</sup>和生物被膜的形成<sup>[53]</sup>。

### 2.4 群体感应淬灭酶

细菌中有许多降解 AHLs 的群体感应淬灭酶(QQ 酶), 包括细菌的内酯酶(AHL-lactonase)和酰基转移酶(AHL-acylase), 红球菌属的氧化还原酶(oxidoreductase)以及哺乳动物中的对氧磷酶(paraoxonases, PONs) (表 2), 其中对氧磷酶与内酯酶同样水解 AHLs 的高丝氨酸内酯环, 也称为类内酯酶(lactonase-like enzymes)。到目前为止, 尚未发现能水解 AIPs 或 AI-2s 的酶<sup>[43]</sup>。AHL 内酯酶主要有 AiiA, AiiB, AttM, QsdA 和 BpiB 这几种, 它们拥有保守的 HXHDXH-60aa-H 序列, 活性中心结合 2 个  $Zn^{2+}$ , 其中一个  $Zn^{2+}$  发挥稳定蛋白质的作用, 另一个  $Zn^{2+}$  起催化活性作用。AHL 酰基转移酶属于 *N*-末端亲和水解酶(*N*-terminal nucleophile hydrolase, Ntn-hydrolase)超家族, 不同菌属来源的 AHL 酰基转移酶都具有较高同源性。通过在细菌、植物和动物中异源表达 QQ 酶可以有效抑制病原菌的 QS 反应, 但是也有可能破坏

表 2 作用于群体感应信号分子的物种及酶

| 物种                                                                                     | QQ 酶                   | 基因                                                           | 参考文献    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|---------|
| <i>Bacillus</i> sp.                                                                    | AHL 内酯酶                | <i>aiiA</i>                                                  | [54,55] |
| <i>Acidobacteria</i>                                                                   | AHL 内酯酶                | <i>qlcA</i>                                                  | [56]    |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                                                       | AHL 内酯酶                | <i>attM</i><br><i>aiiB</i>                                   | [57]    |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i>                                                       | AHL 内酯酶                | <i>aiiS</i>                                                  | [58]    |
| <i>Arthrobacter</i> sp. IBN110                                                         | AHL 内酯酶                | <i>ahlD</i>                                                  | [59]    |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i>                                                        | AHL 内酯酶                | <i>qsdA</i>                                                  | [60]    |
| <i>Nitrobacter</i> sp. strain Nb-311A                                                  | AHL 内酯酶                | <i>bpiB01</i>                                                | [61]    |
| <i>Pseudomonas fluorescence</i>                                                        |                        | <i>bpiB04</i>                                                |         |
| <i>Xanthomonas campestris</i>                                                          |                        | <i>bpiB07</i>                                                |         |
| <i>Phialocephala fortinii</i> ,<br><i>Ascomycetes</i> , <i>Meliniomyces variabilis</i> | AHL 内酯酶                |                                                              | [62]    |
| <i>Ralstonia eutropha</i>                                                              | AHL 酰基转移酶              | <i>aiiD</i>                                                  | [63]    |
| <i>Ralstonia solanacearum</i>                                                          | AHL 酰基转移酶              | <i>aac</i>                                                   | [64]    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                                          | AHL 酰基转移酶              | <i>PA2385PA1032</i>                                          | [65,66] |
| <i>Streptomyces</i> sp. M664                                                           | AHL 酰基转移酶              | <i>alhM</i>                                                  | [67]    |
| <i>Anabaena</i> sp. PCC7120                                                            | AHL 酰基转移酶              | <i>aiiC</i>                                                  | [68]    |
| 猪肾                                                                                     | AHL 酰基转移酶              | <i>ACY1</i>                                                  | [69]    |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i>                                                        | 氧化还原酶                  | <i>qsdA</i> (alleles)                                        | [70]    |
| <i>Laminaria digitata</i><br>(海洋藻类)                                                    | 嗜盐过氧化物酶                |                                                              | [71]    |
| <i>Bacillus megaterium</i>                                                             | 细胞色素 P450              | <i>P450BM-3</i><br><i>PON1</i><br><i>PON2</i><br><i>PON3</i> | [72]    |
| 大鼠                                                                                     | 对氧磷酶: PON1, PON2, PON3 | <i>PON2</i><br><i>PON3</i>                                   | [73]    |
| 人                                                                                      | 对氧磷酶: PON2             | <i>PON2</i>                                                  | [74]    |

宿主中正常菌群的生活能力<sup>[43]</sup>。除了异源表达 QQ 酶这种方法以外，还可以将产生 QQ 酶的细菌与病原菌共培养，引起后者的 QS 受到抑制<sup>[75]</sup>。

除上述能够降解铜绿假单胞菌 AHL 信号分子的酶外，近期发现了一种能够降解 PQS 信号分子的酶—2,4-双加氧酶(Hod)。Hod 的天然底物是 3-羟基-2-甲基-4-喹诺酮(3-hydroxy-2-methyl-4-quinolone)，与 PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone)的结构十分相似。研究发现，Hod 能够催化 PQS 转变为 *N*-辛酰基-邻氨基苯甲酸和一氧化碳。在铜绿假单胞菌 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>[76]</sup>。最近还发现一种在各种生物体内广泛分布的依赖 ATP 的 Lon 蛋白酶也能够抑制铜绿假单胞菌的 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 Las I 和 Rhl I 来抑制 AHL 的合成<sup>[77]</sup>。由于 Lon 蛋白酶在细菌中的保守性，推测其能够参与所有 AHL 介导的 QS 系统的调控。

2.5 群体感应淬灭抗体

一般来说，QS 信号分子作为一种不稳定小分子是不能成为免疫原的，但最近的研究发现细菌的 AHL 可以引起哺乳动物细胞凋亡，并且能够调控 NF-κB 的活性<sup>[78]</sup>，而后者是天然免疫的关键调控子。基于以上事实，利用抗体中和 QS 信号分子也成为淬灭群体感应(QQ)的一种策略。

Kaufmann 等人<sup>[79]</sup>首次应用免疫药物来治疗 QS 介导的细菌感染，利用 3-oxo-AHL 同系物 RS2 生产的单克隆抗体 RS2-1G9，可以抑制铜绿假单胞菌中基于 AHLs 的 QS，RS2-1G9 显示出对 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL 很好的特异性和亲和力<sup>[80]</sup>。用 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL-蛋白结合物免疫的小鼠可以有效阻止铜绿假单胞菌的运动性<sup>[81]</sup>。对于 G<sup>+</sup>菌的 QQ 治疗，以 AIP4 为半抗原产生的单克隆抗体 AP4-24H11 可以减少金黄色葡萄球菌溶血毒素的表达，并且该抗体可以治疗小鼠金黄色葡萄球菌皮下感染，在被动免疫治疗方面也取得一定效果<sup>[82]</sup>。人们还通过直接筛选活性抗体库的方法

找到了水解 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL 的抗体(如 XYD-11G2),以阻止铜绿假单胞菌毒力因子的产生<sup>[83]</sup>。另外,一种酰胺类化合物,其结构类似于 AHL 内酯环被水解所形成的过渡态,可以抑制内酯酶的活性,利用该化合物生产的活性抗体可以减弱细菌的毒力<sup>[84]</sup>。

## 2.6 竞争性生物体

利用一种细菌来抑制另一种细菌的 QS 是最近几年发展的 QQ 方法。研究表明大肠杆菌可以通过摄取 AI-2s 来调控哈氏弧菌的 QS<sup>[85]</sup>,其原理是大肠杆菌摄入环境中少量的 AI-2 以后,胞内的 AI-2 被 LsrK 蛋白磷酸化从而拮抗 LsrR 蛋白,使 *lsr* 操纵子的表达抑制消除, Lsr 蛋白合成,该蛋白是 AI-2 的转运蛋白,导致 AI-2 的内流进一步加速<sup>[86]</sup>。通过这种方式,大肠杆菌可以将共培养的哈氏弧菌分泌的 AI-2 大量摄入到细胞内,抑制哈氏弧菌受 QS 调控的荧光产生。相关研究证明大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和哈氏弧菌的共同培养物可以抑制菌群间 QS 反应<sup>[25]</sup>。此外,在共培养物中添加纯化的 LsrK 蛋白可以将 AI-2s 磷酸化,阻止其扩散通过细胞膜,抑制细菌种内和种间的信号交流,但是 LsrK 蛋白作为 QSI 在动物模型中的作用尚无研究。

除了竞争性细菌以外,动物本身也具有清除 QS 信号分子的能力。Peterson 等人<sup>[87]</sup>发现宿主动物的天然免疫系统可以影响细菌的 QS,他们证实血清中的载脂蛋白 B(apolipoprotein B, ApoB)可以与金黄色葡萄球菌的 QS 信号分子 AIP1 结合,在金黄色葡萄球菌培养物中加入 ApoB 蛋白可以有效降低前者的 QS 反应,而且有实验证实 ApoB 缺陷的小鼠更容易被金黄色葡萄球菌感染。血清中的其他蛋白如 ApoA, ApoC 和 ApoE 无 QS 抑制作用,说明 ApoB 的 QSI 活性是特异的。此外, Rothfork 等人<sup>[88]</sup>在感染金黄色葡萄球菌的鼠表皮细胞模型中发现了另一种 AIP1 失活机制,即巨噬细胞中的 NADPH 氧化酶可以产生 HOCl 和 ONOO<sup>-</sup>,这些氧化剂可以使 AIP1 分子中 C-末端的甲硫氨酸被氧化,氧化型的 AIP1 与其受体的结合能力大大减弱,从而抑制了 QS 反应。

## 3 QSIs 的筛选方法

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 QSIs 的筛选与研究。QSIs 的筛选方法主要分为以下三类。

### 3.1 天然的 QSIs 指示菌株

海洋费氏弧菌可以通过 QS 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地筛选出 QSIs<sup>[29,45]</sup>。同时, QS 也能够调控细菌某些色素基因的表达。例如,利用紫色杆菌能产生紫色菌素和致金色假单胞菌(*P. aureofaciens*)能产生橙色异丙噁类色素的特点,人们建立了一系列 QSIs 的筛选方法<sup>[89]</sup>。利用 QSIs 指示菌株筛选的优点是适合大量样品的粗筛,方法简便易行;其缺点为不能完全确定待测样品干扰了细菌的 QS 系统,因为样品有可能对菌体的生长有一定的抑制作用,从而出现假阳性结果。

### 3.2 QSIs 筛选工程菌株

Rasmussen 等人<sup>[3]</sup>设计了一种 QSIs 选择器(QSIS),将 QS 启动子与自杀基因 *sacB* 融合。当外源信号分子 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL 存在时,与受体蛋白 LasR 结合而形成复合体,诱导自杀基因的表达,导致 QSIS 细菌的生长终止;相反,当 QSIs 与信号分子同时存在时,复合体在 QS 启动子上的结合被抑制, QS 介导的自杀基因表达被 QSIs 阻断,使 QSIS 细菌正常生长。由于 QSIS 细菌的生长是 QSIs 存在的标志,从而避免了假阳性结果的出现,采用这套系统已经成功获得了许多具 QSI 活性的合成化合物和天然提取物<sup>[3,27,30]</sup>。

AHL 生物传感器模型拥有信号分子受体蛋白基因序列(*luxR*)及相应的融合到报告基因(*lacZ*, *gfp*, *luxCDABE* 等)上游的 QS 启动子(QS-promoter)序列的载体<sup>[90-92]</sup>。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 AHLs 和 QSIs 共同存在时,报告基因的表达水平减少或消失,通过报告信号的强弱来判断 QSIs 的存在。研究者对 AHL 生物传感器模型的灵敏性进一步优化,直接利用 QS 信号分子合成酶基因(如 *lasI*, *rhII* 及 *luxI* 等)的启动子与报告基因融合构建筛选载体<sup>[93,94]</sup>。

总之,筛选 QSIs 可以首先使用 *sacB* 模型进行定性初筛,再利用 *luxCDABE*, *lacZ*, *gfp* 等模型进一步量化,保证结果的准确可靠。

### 3.3 计算机模拟筛选 QSIs

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. 研究者们根据信号分子受体蛋白(如 LasR, TraR)的三维立体结构及信号分子的物化性质, 模拟受体蛋白与信号分子的相互作用. 采用 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 活性的化合物, 其中黄芩素对于细菌生物被膜的半数有效抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 仅为  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ <sup>[95]</sup>. Marsden 等人<sup>[96]</sup>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模拟, 发现氯吡啶及其类似物对铜绿假单胞菌的 QS 具有较好的抑制活性.

## 4 展望

QSIs 作为一类新的抗菌药物具有重要的应用前景. 理想的 QSIs 除了能够大幅降低病原菌的 QS 以外, 还应能对病原菌或寄主没有毒副作用, 并对 QS 调节子表现高度专一性. QSIs 还应该是化学稳定、不被寄主代谢和支配的. 到目前为止, 除了 LED209 已经进入临床前期研究阶段, 绝大多数 QSIs 因对真核宿主细胞具有一定的毒性而不能广泛应用于医药研究. 例如, 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; 卤代呋喃酮可能导致癌症的发生, 不适合用在人体上<sup>[97]</sup>. 对于毒性较强的 QSIs 可以用化学方法对其进行改造修饰, 降低其毒性. Vatter 等人<sup>[98]</sup>建议从一些食源性植物, 如水果和蔬菜中寻找 QSIs, 并初步探明这一策略是筛选安全的 QSIs 的一个全新理念.

许多 QSIs 可以破坏细菌生物被膜的形成, 然而有研究表明已形成生物被膜的细菌的毒力因子表达量低于还未形成生物被膜的游离细菌<sup>[99]</sup>, 因此单独使用 QSIs 要考虑其实际应用价值. 众所周知, 生物被膜的形成往往更有利于细菌抵御抗生素. 有研究发现, QSIs 与抗生素的联合使用使得细菌对后者的敏感性增加, 例如在铜绿假单胞菌感染的小鼠肺部模型中, 来源于大蒜抽提物的 QSIs 作用后的细菌对托普霉素(tobramycin)更加敏感<sup>[100]</sup>. 因此研究者可以尝试用低剂量的抗生素和 QSIs 联合给药, 这可能会起到更好的治疗效果.

理论上, QSIs 能够终止病原菌致病作用的发生, 但不影响病原菌的生长, 不会因其使用而引起抗性突变株的产生, 是一种理想的抗菌药物. 但少量研究

表明, AHL 合成酶以及 QS 信号分子受体 LuxR 等仍具有变异性<sup>[6]</sup>, 所以 QSI 是否能够完全避免耐药性的产生还有待考证. 最近, Defoirdt 等人<sup>[101]</sup>推荐使用植物和海藻提取物作为 QSIs 来源, 可以降低细菌产生 QSIs 耐药性的风险.

此外, 开发 QSIs 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和化学结构的信号分子, 并且其 QS 调控方式也存在着一定差别, 因此发现具广谱作用的 QSIs 还存在一定困难<sup>[102]</sup>. 基于此, QQ 酶具有广阔的应用前景, 尤其是 AHL-内酯酶因其水解保守的高丝氨酸内酯环而具有广谱性. 芽胞杆菌菌属(*Bacillus*)是一个重要的 AHL-内酯酶来源<sup>[58]</sup>, 并且芽胞杆菌还是一种被 FDA 认证为安全无害的益生菌<sup>[103]</sup>. 值得注意的是, 使用大分子 QSIs(特别是 QQ 酶)要考虑是否引起宿主的免疫反应, 而且还要考虑 AHLs 的降解是否影响宿主肠道菌群的正常活动<sup>[43]</sup>. 虽然竞争性细菌和动物宿主自身可以通过结合或修饰特定的细菌 QS 信号分子来抑制细菌的 QS 反应, 但是相比起 QQ 酶对某类信号分子的广谱作用, 此种方式并不算是一个有效的节能策略. QQ 抗体是最近几年发展起来的抑制 QS 的新方法, 有望起到预防和治疗细菌感染疾病的作用. 未来人们还将研制能抑制病原菌毒力基因表达而不直接作用于细菌的 QQ 疫苗, 但是由于 QQ 疫苗并不能直接杀死病原菌, 疫苗的持续作用时间不长, QQ 疫苗与传统疫苗组成的复合型疫苗将既可以避免传统疫苗导致的细菌耐药性的发生, 又可以保证治疗效果.

近几年来, 许多专门研发 QSIs 的生物医药公司相继出现, 如 QSI Pharma A/S (丹麦)、Microbia (美国)、Quorex Pharmaceuticals Inc. (美国)和 4SC AG (德国)等. QuorumEx(伯利兹)的第一个产品 Topic-Qx(未获专利权)是从一种生长在拉丁美洲国家伯利兹的植物中提取出来的 QSI 活性物质, 但其应用性和可靠性受到公众的质疑. 由于 QSIs 的局限性使其不能完全代替传统抗菌药物的使用, 因此 QSIs 与传统抗菌药物的联合使用在未来将会是一种有效解决细菌耐药性并增强抗菌效果的策略. 从安全角度来看, 从食源性植物和益生菌中筛选 QSIs 是一种有效方式. 随着细菌 QS 分子机制的不断研究和完善, 今后会有越来越多新的具有实用性的 QSIs 被开发出来.

## 参考文献

- 1 Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, 176: 269–275
- 2 Swift S, Downie J A, Whitehead N A, et al. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol*, 2001, 45: 199–270
- 3 Rasmussen T B, Bjarnsholt T, Skindersoe M E, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol*, 2005, 187: 1799–1814
- 4 Antunes L C, Ferreira R B, Buckner M M, et al. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, 2010, 156: 2271–2282
- 5 Njoroge J, Sperandio V. Jamming bacterial communication: New approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO Mol Med*, 2009, 1: 201–210
- 6 Kalia V C, Purohit H J. Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37: 121–140
- 7 Reading N C, Sperandio V. Quorum sensing: The many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 254: 1–11
- 8 Bassler B L, Wright M, Showalter R E, et al. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: Sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol*, 1993, 9: 773–786
- 9 Bassler B L, Greenberg E P, Stevens A M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol*, 1997, 179: 4043–4045
- 10 McDougald D, Rice S, AKjelleberg S. Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387: 445–453
- 11 Pesci E C, Milbank J B, Pearson J P, et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11229–11234
- 12 Huang T P, Lee W A C. Extracellular fatty acids facilitate flagella-independent translocation by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Res Microbiol*, 2007, 158: 702–711
- 13 Bjarnsholt T, Jensen P O, Jakobsen T H, et al. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One*, 2010, 5: e10115
- 14 George E A, Muir T W. Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent staphylococci. *Chembiochem*, 2007, 8: 847–855
- 15 Sperandio V, Mellies J L, Nguyen W, et al. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 15196–15201
- 16 Sperandio V, Torres A G, Jarvis B, et al. Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8951–8956
- 17 Parsek M R, Val D L, Hanzelka B L, et al. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4360–4365
- 18 Hentzer M, Wu H, Andersen J B, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J*, 2003, 22: 3803–3815
- 19 Defoirdt T, Miyamoto C M, Wood T K, et al. The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. *Environ Microbiol*, 2007, 9: 2486–2495
- 20 Ren D, Sims J J, Wood T K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 34: 293–299
- 21 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. *Mol Pharmacol*, 2008, 73: 1578–1586
- 22 Vandeputte O M, 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. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76: 243–253
- 23 Teplitski M, Robinson J B, Bauer W D. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, 13: 637–648
- 24 von Bodman S B, Willey J M, Diggle S P. Cell-cell communication in bacteria: United we stand. *J Bacteriol*, 2008, 190: 4377–4391
- 25 Roy V, Fernandes R, Tsao C Y, et al. Cross species quorum quenching using a native AI-2 processing enzyme. *ACS Chem Biol*, 2009, 5: 223–232

- 26 Schwenteit J, Gram L, Nielsen K F, et al. Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp. achromogenes and the effect of the autoinducer synthase *AsaI* on bacterial virulence. *Vet Microbiol*, 2011, 147: 389–397
- 27 Rasmussen T B, Skindersoe M E, Bjarnsholt T, et al. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*, 2005, 151: 1325–1340
- 28 Nakayama J, Uemura Y, Nishiguchi K, et al. Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quormones in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 580–586
- 29 Teasdale M E, 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. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 567–572
- 30 Persson T, Hansen T H, Rasmussen T B, et al. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem*, 2005, 3: 253–262
- 31 Suga H, Smith K M. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 586–591
- 32 Geske G D, O'Neill J C, Miller D M, et al. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: Systematic evaluation of *N*-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 13613–13625
- 33 Jones M B, Jani R, Ren D, et al. Inhibition of *Bacillus anthracis* growth and virulence-gene expression by inhibitors of quorum-sensing. *J Infect Dis*, 2005, 191: 1881–1888
- 34 Ren D, Bedzyk L A, Ye R W, et al. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88: 630–642
- 35 Han Y, Hou S, Simon K A, et al. Identifying the important structural elements of brominated furanones for inhibiting biofilm formation by *Escherichia coli*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 1006–1010
- 36 Manefield M, Rasmussen T B, Henzter M, et al. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 2002, 148: 1119–1127
- 37 Hume E B, Baveja J, Muir B, et al. The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and *in vivo* infection rates by covalently bound furanones. *Biomaterials*, 2004, 25: 5023–5030
- 38 Tedder M E, Nie Z, Margosiak S, et al. Structure-based design, synthesis, and antimicrobial activity of purine derived SAH/MTA nucleosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 3165–3168
- 39 Princeton University, Quorex Pharmaceuticals, Inc, University Technologies International, Inc. Compounds and methods for regulating bacterial growth and pathogenesis. US Patent, US6559176B1, 2001
- 40 Ni N, Li M, Wang J, et al. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med Res Rev*, 2009, 29: 65–124
- 41 Ganin H, Tang X, Meijler M M. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by AI-2 analogs. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 3941–3944
- 42 Peng H, Cheng Y, Ni N, et al. Synthesis and evaluation of new antagonists of bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *ChemMedChem*, 2009, 4: 1457–1468
- 43 Amara N, Krom B P, Kaufmann G F, et al. Macromolecular inhibition of quorum sensing: Enzymes, antibodies, and beyond. *Chem Rev*, 2011, 111: 195–208
- 44 Rasko D A, Moreira C G, Li D R, et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*, 2008, 321: 1078–1080
- 45 Swem L R, Swem D L, O'Loughlin C T, et al. A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Mol Cell*, 2009, 35: 143–153
- 46 Sofer D, Gilboa-Garber N, Belz A, et al. 'Subinhibitory' erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors. *Chemotherapy*, 1999, 45: 335–341
- 47 Tateda K, Comte R, Pechere J C, et al. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 1930–1933
- 48 Mayville P, Ji G, Beavis R, et al. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1218–1223
- 49 Lyon G J, Mayville P, Muir T W, et al. Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13330–13335
- 50 Balaban N, Stoodley P, Fux C A, et al. Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, 437: 48–54
- 51 Korem M, Gov Y, Kiran M D, et al. Transcriptional profiling of target of RNAIII-activating protein, a master regulator of staphylococcal virulence. *Infect Immun*, 2005, 73: 6220–6228

- 52 Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, et al. RNAIII-inhibiting peptide improves efficacy of clinically used antibiotics in a murine model of staphylococcal sepsis. *Peptides*, 2005, 26: 169–175
- 53 Cirioni O, Ghiselli R, Minardi D, et al. RNAIII-inhibiting peptide affects biofilm formation in a rat model of staphylococcal ureteral stent infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 4518–4520
- 54 Dong Y H, Xu J L, Li X Z, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3526–3531
- 55 Dong Y H, Wang L H, Xu J L, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 2001, 411: 813–817
- 56 Riaz K, Elmerich C, Moreira D, et al. A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environ Microbiol*, 2008, 10: 560–570
- 57 Zhang H B, Wang L H, Zhang L H. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 4638–4643
- 58 Uroz S, Dessaux Y, Oger P. Quorum sensing and quorum quenching: The yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem*, 2009, 10: 205–216
- 59 Park S Y, Lee S J, Oh T K, et al. AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*, 2003, 149: 1541–1550
- 60 Uroz S, Oger P M, Chapelle E, et al. A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 1357–1366
- 61 Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, et al. Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 224–233
- 62 Uroz S, Heinonsalo J. Degradation of *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 65: 271–278
- 63 Lin Y H, Xu J L, Hu J, et al. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol*, 2003, 47: 849–860
- 64 Chen C N, Chen C J, Liao C T, et al. A probable aculeacin A acylase from the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 is *N*-acyl-homoserine lactone acylase with quorum-quenching activity. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 89
- 65 McClean K H, Winson M K, Fish L, et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 1997, 143: 3703–3711
- 66 Huang J J, Han J I, Zhang L H, et al. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 5941–5949
- 67 Park S Y, Kang H O, Jang H S, et al. Identification of extracellular *N*-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 2632–2641
- 68 Romero M, Diggle S P, Heeb S, et al. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: Identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 280: 73–80
- 69 Xu F, Byun T, Deussen H J, et al. Degradation of *N*-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J Biotechnol*, 2003, 101: 89–96
- 70 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. *Microbiology*, 2003, 149: 1981–1989
- 71 Borchardt S A, Allain E J, Michels J J, et al. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3174–3179
- 72 Chowdhary P K, Keshavan N, Nguyen H Q, et al. *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry*, 2007, 46: 14429–14437
- 73 Yang F, Wang L H, Wang J, et al. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. *FEBS Lett*, 2005, 579: 3713–3717
- 74 Draganov D I, Teiber J F, Speelman A, et al. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res*, 2005, 46: 1239–1247
- 75 Cirou A, Diallo S, Kurt C, et al. Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ Microbiol*, 2007, 9: 1511–1522
- 76 Pustelny C, Albers A, Buldt-Karentzopoulos K, et al. Dioxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol*, 2009, 16: 1259–1267

- 77 Takaya A, Tabuchi F, Tsuchiya H, et al. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease. *J Bacteriol*, 2008, 190: 4181–4188
- 78 Kravchenko V V, Kaufmann G F, Mathison J C, et al. Modulation of gene expression via disruption of NF-kappaB signaling by a bacterial small molecule. *Science*, 2008, 321: 259–263
- 79 Kaufmann G F, Sartorio R, Lee S H, et al. Antibody interference with *N*-acyl homoserine lactone-mediated bacterial quorum sensing. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 2802–2803
- 80 Debler E W, Kaufmann G F, Kirchdoerfer R N, et al. Crystal structures of a quorum-quenching antibody. *J Mol Biol*, 2007, 368: 1392–1402
- 81 Miyairi S, Tateda K, Fuse E T, et al. Immunization with 3-oxododecanoyl-*L*-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Med Microbiol*, 2006, 55: 1381–1387
- 82 Park J, Jagasia R, Kaufmann G F, et al. Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem Biol*, 2007, 14: 1119–1127
- 83 De Lamo M S, Xu Y, Meijler M M, et al. Antibody catalyzed hydrolysis of a quorum sensing signal found in Gram-negative bacteria. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 1549–1552
- 84 Kapadnis P B, Hall E, Ramstedt M, et al. Towards quorum-quenching catalytic antibodies. *Chem Commun (Camb)*, 2009, 538–540
- 85 Xavier K B, Bassler B L. Interference with AI-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature*, 2005, 437: 750–753
- 86 Xavier K B, Bassler B L. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005, 187: 238–248
- 87 Peterson M M, Mack J L, Hall P R, et al. Apolipoprotein B is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe*, 2008, 4: 555–566
- 88 Rothfork J M, Timmins G S, Harris M N, et al. Inactivation of a bacterial virulence pheromone by phagocyte-derived oxidants: New role for the NADPH oxidase in host defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 13867–13872
- 89 McLean R J, Pierson L S, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods*, 2004, 58: 351–360
- 90 Rajamani S, Sayre R. FRET-based biosensors for the detection and quantification of AI-2 class of quorum sensing compounds. *Methods Mol Biol*, 2011, 692: 31–46
- 91 Rajamani S, Sayre R T. A sensitive fluorescence reporter for monitoring quorum sensing regulated protease production in *Vibrio harveyi*. *J Microbiol Methods*, 2011, 84: 189–193
- 92 Jakobsen T H, van Gennip M, Christensen L D, et al. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro*. *Methods Mol Biol*, 2011, 692: 253–263
- 93 Wang L, Zou S, Yin S, et al. Construction of an effective screening system for detection of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors and its application in bioautographic thin-layer chromatography. *Biotechnol Lett*, 2011, 33: 1381–1387
- 94 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. *Methods Mol Biol*, 2011, 692: 113–130
- 95 Zeng Z, Qian L, Cao L, et al. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79: 119–126
- 96 Marsden D M, Nicholson R L, Skindersoe M E, et al. Discovery of a quorum sensing modulator pharmacophore by 3D small-molecule microarray screening. *Org Biomol Chem*, 2010, 8: 5313–5323
- 97 Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007, 362: 1213–1222
- 98 Vatter D A, Mihalik K, Crixell S H, et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, 2007, 78: 302–310
- 99 Resch A, Rosenstein R, Nerz C, et al. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 2663–2676
- 100 Bjarnsholt T, Jensen P O, Rasmussen T B, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 2005, 151: 3873–3880
- 101 Defoirdt T, Boon N, Bossier P. Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000989
- 102 Bjarnsholt T, Givskov M. Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: Worth the effort? *Curr Infect Dis Rep*, 2008, 10: 22–28
- 103 Porwal S, Lal S, Cheema S, et al. Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: Diversity in *Bacillus*. *PLoS One*, 2009, 4: e4438

# Quorum sensing of pathogenic bacteria and quorum-sensing inhibitors

CHENG GuYue, HAO HaiHong, DAI MengHong, LIU ZhenLi & YUAN ZongHui

*National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues (HZAU), Key Laboratory for the Detection of Veterinary Drug Residues in Foods of Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

The emergence of antibiotic-resistant and especially multidrug-resistant pathogenic bacteria intensifies the need to screen new drug targets and develop new antibacterial drugs. Bacteria coordinate their virulent behaviors in a cell density-dependent manner known as quorum sensing (QS). In this process, pathogenic bacteria exchange autoinducers (AIs) to regulate the expression of genes involved in processes such as virulence, adhesion, and biofilm formation. Different types of AIs mediate different QS systems. Preventing the accumulation of AIs or blocking their recognition by signal receptors can reduce the pathogenic processes under QS control. Therefore, quorum-sensing inhibitors (QSIs) may be an effective way to treat bacterial infections, especially those caused by antibiotic-resistant strains. QSIs can be categorized into three classes: nonpeptide small molecules, peptides, and proteins (including quorum-quenching enzymes and antibodies). In addition, competing bacteria and animal hosts can scavenge AIs, thus playing the role of QSIs. QSIs can be screened by natural QSI indicator strains, engineered bacteria, or computer simulation. The continuing study of QS-mediated pathogenic mechanisms will provide new targets for QSIs. The combined use of QSIs and traditional antimicrobials is expected to improve treatment and help prevent the further development of drug resistance.

**quorum-sensing, quorum-sensing inhibitors, pathogenic bacteria, screening methods**

doi: 10.1360/972011-2465