



金黄色葡萄球菌重要毒力因子的功能及其抑制剂研究进展

陈菲菲, 狄红霞, 蓝乐夫*

中国科学院上海药物研究所, 上海 201203

* 联系人, E-mail: llan@mail.shcnc.ac.cn

2013-03-29 收稿, 2013-07-11 接受, 2013-11-28 网络版发表

上海市自然科学基金青年项目(12ZR1453200)和中国科学院“百人计划”项目资助

摘要 金黄色葡萄球菌是重要的人类病原菌, 可引起局部感染甚至致死性的全身感染, 临床危害严重. 广谱抗生素的使用及滥用催生并富集了包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在内的“超级细菌”. 随着“后抗生素时代”的到来, 新的抗细菌感染药物的研究迫在眉睫. 抗毒力药物(anti-virulence drugs)可选择性地遏制目标菌的毒素表达、细菌黏附和免疫逃避等, 有望预防和治疗多种感染疾病. 本文综述了抗金黄色葡萄球菌致病力的潜在药物作用靶点以及利用小分子化合物对金黄色葡萄球菌致病力进行抑制的主要研究进展.

关键词

金黄色葡萄球菌
抗生素耐药
毒力因子
小分子抑制剂

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是严重危害人类生命健康的一种重要病原菌. 作为革兰阳性菌的代表, 它是引起人类化脓感染中最常见的病原菌, 可直接导致局部化脓感染、肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等, 甚至败血症、脓毒症等全身感染. 金黄色葡萄球菌的感染类型可分为医院获得性感染和社区获得性感染, 后者的发现更增加了这种致病菌潜在的生物危害性和引起感染爆发的可能性^[1,2].

目前, 临床上用于治疗细菌感染的药物是抗生素. 抗生素的发现是 20 世纪医学史上最伟大的革命, 它使得人类的平均寿命从 1900 年的 47 岁延长至 2000 年的 70 岁以上^[3]. 然而, 抗生素是通过直接抑制病原菌的生长或者直接杀死病原菌来达到临床治疗的效果. 这种固有的作用机理给予细菌强大的选择压力(selective pressure), 催生并进一步富集了耐药性菌株如 MRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)^[4]. MRSA 是具有甲氧西林耐药性的金黄色葡萄球菌, 被公认为“超级细菌”, 自 1961 年进化出来后以惊人的速度在世界范围蔓延. 2005 年, 美国感染 MRSA 致

死人数达 19000, 已超过同期艾滋病死亡人数^[4,5]. 病死率升高的主要原因是耐药菌带来的抗生素用药困难^[6-8]. 事实上, 细菌的耐药性已经成为日益严峻的全球公共卫生问题. 由此, 我们不仅需要合理地使用抗生素以降低耐药菌的增长率、延长抗生素的使用寿命^[9]; 同时, 我们亟需研发新型的抗细菌感染策略及药物^[6-8].

面对日益严峻的细菌抗生素耐药性, 人们开始思考新的抗感染策略, 如降低细菌的毒力而非直接杀死细菌来达到治疗的效果. 针对抗细菌毒力的药物(anti-virulence drugs)可选择性地遏制目标菌的毒素表达、毒素传递、细菌黏附和细菌的免疫逃避等, 从而降低细菌的致病性, 有望有效地预防和治疗多种感染疾病^[6,7]. 随着生命科学、医学等学科的迅猛发展, 人们对临床危害严重的金黄色葡萄球菌的致病分子机理也有了更为深入的认识. 金黄色葡萄球菌通过产生各式各样的毒力因子来实现对宿主细胞的黏附、侵染和散播, 并可通过形成生物被膜以应对宿主免疫系统或抗生素的杀伤作用^[10,11]. 金黄色葡萄

引用格式: 陈菲菲, 狄红霞, 蓝乐夫. 金黄色葡萄球菌重要毒力因子的功能及其抑制剂研究进展. 科学通报, 2013, 58: 3743-3752

Chen F F, Di H X, Lan L F. Small molecules targeting *Staphylococcus aureus* virulence (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 3743-3752, doi: 10.1360/972013-351

球菌数目众多的毒力因子的表达主要受群体感应系统 Agr^[12,13]、SarA 家族蛋白的转录调节因子^[14,15]、双组分调节系统 SaeRS 等调节^[16~18]。目前,影响细菌致病能力的关键信号通路或蛋白分子如群体感应系统 Agr^[19,20]、决定金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白准确定位的转肽酶 SrtA^[21,22]、细菌毒力因子表达的转录调节因子 MgrA^[23~26]、细菌蛋白水解系统 ClpP^[27,28]、金黄色色素合成途径^[29,30](图 1)正在作为潜在的新型药物作用靶点应用于抗细菌致病力药物的研发。本文从以下 4 个方面综述小分子干预金黄色葡萄球菌致病力方面的研究进展。

1 群体感应系统 Agr 及其小分子抑制剂的研究进展

基因组测序结果表明,在金黄色葡萄球菌中至少存在 16 个双组分系统,其中有 8 个已被证明能够调控毒力因子的表达^[31]。在这 16 个双组分系统中, Agr (accessory gene regulator, Agr) 系统是目前金黄色葡萄球菌中研究最为深入的双组分信号转导系统。Agr 系统对胞外毒素以及胞外酶(如蛋白酶、脂酶、核

酸酶)的表达具有正调节的功能,而对许多细胞壁蛋白的表达具有负调节的功能^[12,13,32,33]。Agr 系统的信号分子是由细菌自身产生的小肽,也称为自诱导肽(autoinducing peptides, AIPs)。如图 2 所示^[31], Agr 系统包含 2 个相邻但却反向的转录单元(RNA II 和 RNA III),并分别由 P2 和 P3 启动子启动基因的转录^[34]。P3 转录单元的 RNA III 分子是 Agr 系统的效应分子,执行 Agr 系统对毒力因子的调控功能。尽管其调控的详细机制仍不清楚,但现有的研究表明,这种调控主要发生在转录水平上^[35]。Agr P2 操纵子包含 4 个基因,分别是 *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*^[19]。AgrD 前肽由 AgrB 加工后生成 AIP,随后, AIP 由信号肽酶 SpsB 介导分泌至胞外。胞外的 AIPs 与跨膜蛋白 AgrC 结合后,引起 AgrC 在胞质部分的组氨酸残基自磷酸化,随后组氨酸上的磷酸基转移至 AgrA 的天冬氨酸残基上,使得 AgrA 被磷酸化^[34]。磷酸化的 AgrA 激活 P2 和 P3 启动子的活性,从而上调 *agrABCD* 和 RNA III 的表达。其中,对 *agrABCD* 的上调使 Agr 系统形成信号增益回路,从而放大 RNA III 的调控效应。Agr 系统的调控可以帮助细菌从感染最初的定植阶段向感染后期的

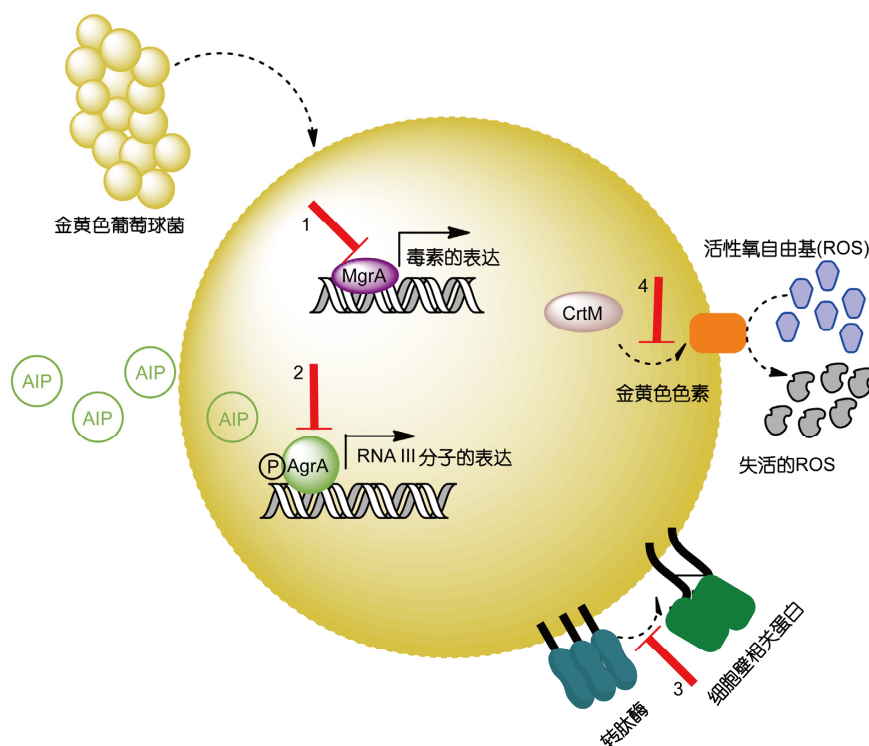


图 1 抗金黄色葡萄球菌致病力的潜在靶点

1, 细菌毒力因子的表达; 2, 细菌的群体感应系统; 3, 细菌的黏附; 4, 细菌的免疫逃避。改自文献[7]

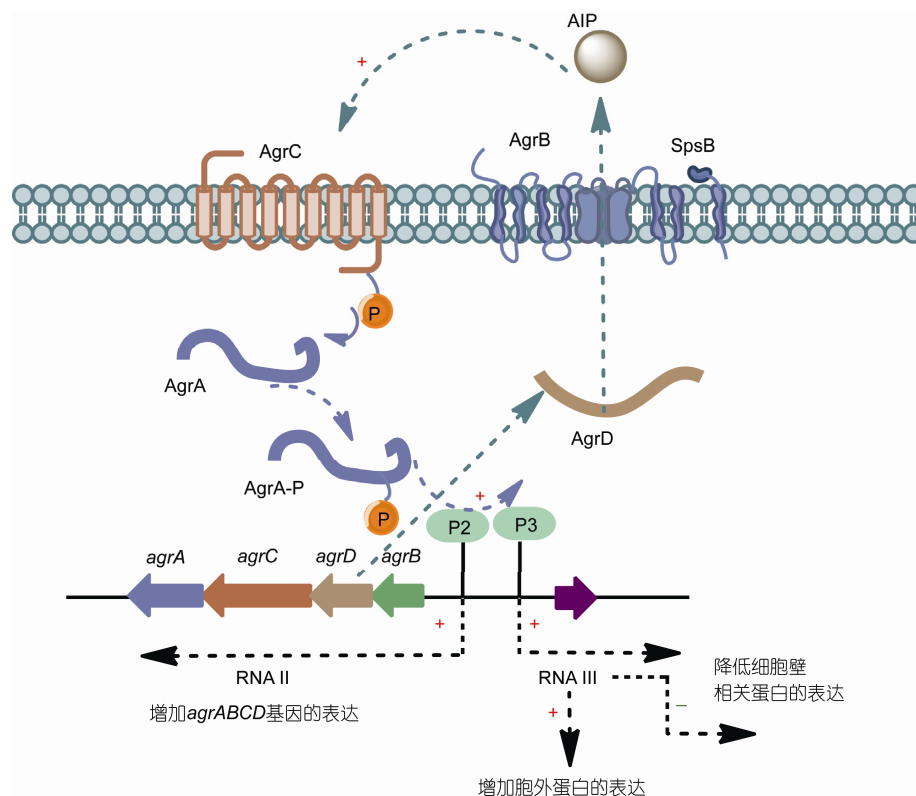


图2 Agr双组分系统示意图

Agr系统包含2个相邻但却反向的转录单元(RNA II和RNA III),并分别由P2和P3启动子启动基因的转录。P3转录单元转录的RNA III分子是Agr系统的效应分子,调节多个胞外毒力因子的表达。Agr P2操纵子包含4个基因,分别是 $agrA$, $agrB$, $agrC$, $agrD$ 。AgrD前肽由AgrB加工后生成AIP,随后,AIP由信号肽酶SpsB介导分泌至胞外。胞外的AIPs与跨膜蛋白AgrC结合后,引起AgrC在胞质部分的组氨酸残基自磷酸化,随后组氨酸上的磷酸基转移至AgrA的天冬氨酸残基上,使得AgrA被磷酸化。磷酸化的AgrA激活了P2和P3启动子的活性,从而上调 $agrABCD$ 和RNA III的表达。改自文献[31]

入侵和获取宿主营养物质的阶段过渡。动物感染的实验表明,Agr系统功能的缺失导致金黄色葡萄球菌致病性显著降低^[36,37],这表明Agr系统对于金黄色葡萄球菌的致病力具有重要作用。

AIPs的序列是高度可变的,以AIP主要氨基酸的序列为基础,可将金黄色葡萄球菌的Agr系统分为4种,即Agr系统I-IV。有趣的是,大多数交叉的AIP-AgrC相互作用是抑制性的,即AIP选择性激活自己的受体而竞争性地抑制其他受体的功能^[38]。因此,AIP的竞争性抑制成为削弱金黄色葡萄球菌致病力的一种潜在策略^[39],并促使学者去研究、发现Agr系统的抑制剂。Lyon等人^[38]在研究4种AIP上决定其激活功能的关键氨基酸残基时发现,AIP-I和AIP-IV仅有一个氨基酸存在差别,AIP-I上5位的天冬氨酸在AIP-IV中为酪氨酸。但是,AIP-I能够强烈激活AgrC-I但却基本上不能激活AgrC-IV;与此不同的是,

AIP-IV对AgrC-I和AgrC-IV均有很强的激活功能。由此,Lyon等人^[38]对AIP-I和AIP-IV进行了关键氨基酸残基的构效关系研究,在这一研究中他们将AIP-I 5位上的天冬氨酸替换成丙氨酸。实验发现天冬氨酸被丙氨酸取代后(D5A)形成的衍生物AIP-I D5A对4种AgrC完全丧失激活功能,恰恰相反,AIP-I D5A对4种AgrC都具有良好的抑制能力(IC_{50} 约为0.3~8 nmol/L)。另外,他们发现截短的AIP类似物tr-AIP-1, tr-AIP-2, tr-AIP-4对AgrC表现出交叉抑制活性,因此最终得到了截短的AIP-I D5A,一个名为tr-AIP-I D2A的小肽。与AIP-I相比, tr-AIP-I D2A尾部的3个氨基酸已被截掉,同时5位的天冬氨酸仍被丙氨酸替代。经实验证实, tr-AIP-I D2A对4种AgrC均无激活功能,同时对4种AgrC的抑制活性进一步增加(IC_{50} 在0.1~5 nmol/L)^[38]。因此, tr-AIP-I D2A作为一个先导肽,有望被开发为金黄色葡萄球菌中群

体感应的新型抑制剂。

Sklar 和 Gresham^[40]研究发现, 苯溴马隆能够有效地抑制金黄色葡萄球菌中 *RNA III* 的表达. 荧光素标记的 AIP(FITC-AIP)与 AgrC 结合实验显示, 在苯溴马隆存在(6 $\mu\text{mol/L}$)的情况下, FITC-AIP 与 AgrC 的结合减少了 60%以上, 暗示苯溴马隆是通过抑制 AIP 与 AgrC 的结合从而抑制 *RNA III* 的表达. 苯溴马隆通常作为痛风药使用, 不过研究表明它可明显减少金黄色葡萄球菌感染小鼠形成脓肿的区域, 并且对包括 MRSA 在内的 II 型和 III 型 Agr 系统金黄色葡萄球菌感染的小鼠有很好的保护作用^[40].

在最近的报道中, Helen E. Black Well 研究组^[41]通过详细的构效关系研究, 合成出对 AgrC(I-IV)抑制活性更为优良的 AIP 类似物, 这些化合物在细胞水平上对 AgrC 的 IC_{50} 低至皮摩尔级, 并以 AIP-III D4A 为代表. 在该浓度下, 受 Agr 系统正调控的溶血素的产生明显减少; 同时, 活性最优的 4 个 AgrC 抑制剂在纳摩尔级水平上, 能将另一个重要毒力因子——中毒性休克综合症毒素(toxic shock syndrome toxin-1)的产生降低 80%以上. 这是到目前为止, 文献报道的活性最优的 Agr 系统抑制剂. 有趣的是, AIP-III D4A 与先前报道的具有良好抑制活性的 tr-AIP-I D2A 具有相同的突变位点(由于被截短的缘故, 活性残基的编号从 4 变换为 2)^[41].

需要说明的是, 尽管 Agr 系统对于金黄色葡萄球菌的致病力具有重要作用, 我们仍然需要慎重考虑 Agr 系统是否可作为一个合适的抗毒力靶标. 因为抑制 Agr 系统会增加金黄色葡萄球菌中生物被膜的形成, 而生物被膜不仅可以帮助细菌抵抗宿主的防御, 还能降低细菌对抗生素的敏感性^[42]. 研究还发现, Agr 系统功能的下调或缺失会增加金黄色葡萄球菌的滞留性^[43]. 在临床上, 生物被膜的增厚和滞留性的增加均是慢性感染难以治愈的重要原因, 这两者的叠加无疑会使慢性感染的治疗难度进一步加大. 此外, 由于 Agr 系统的抑制剂是一些寡肽, 在人体内会被迅速降解. 因此, 对 Agr 系统的抑制剂进行合理的设计以稳定其结构, 是其成为抗毒力治疗药物的前提^[44]. 基于上述考虑, Agr 系统的抑制剂用于治疗金黄色葡萄球菌引起的急性感染而非慢性感染可能更为合理. 另外, 根据 Chong 等人^[45]的报道, Agr 系统的功能障碍(Dysfunction)使得医院获得性 MRSA 菌株 ST5-SCCmec type II (II 型 Agr 系统)在传播过程中

具有潜在的优势, 而这对于我们控制 MRSA 的传播是不利的.

2 MgrA 及其小分子抑制剂的研究进展

MgrA 属于 SarA 家族的蛋白. SarA 家族蛋白为全局性调控蛋白, 蛋白中包含折翼螺旋(Winged-helix)结构. 研究发现, 折翼螺旋基序对于 SarA 家族蛋白与 DNA 的结合至关重要. 根据同源性和结构相似性可将 SarA 家族蛋白分为 3 个亚家族: (1) 单结构域蛋白, 包括 SarA, SarR, SarT, SarX, SarV, Rot 等; (2) 双结构域蛋白, 包括 SarS, SarU, SarY 等; (3) MarR 同源蛋白, 包括 MgrA, SarZ 等^[15]. 2003 年, Luong 等人^[23]发现了一个控制多个基因表达的转录调节因子(multiple gene regulator, Mgr), 并将它命名为 MgrA. 研究发现, 缺失或者过表达 *mgrA* 可影响荚膜、核酸酶、蛋白酶、凝固酶、蛋白 A 和 α -溶血素等毒力因子的表达. 与此同时, Cheung 课题组^[46]在寻找 V 型荚膜(Cap5)调节因子时, 发现一个自裂解活性和对青霉素敏感性均增加的插入突变株, 并将突变掉的基因命名为 *rat* (regulator of autolytic activity), 亦即 *mgrA*. 此外, MgrA 还可负调控耐药泵基因 *norA*, *norB* 和 *tet38* 的表达, 这些耐药泵可使菌株降低对喹诺酮类抗生素如环丙沙星的敏感性. 因而, *mgrA* 基因突变株对喹诺酮类抗生素和万古霉素的 MIC 较野生型菌株提高了 2 倍^[47].

对 *mgrA* 突变体及其对应的野生型菌株的转录谱分析结果表明: MgrA 除对上述毒力因子和细菌表型具有调控作用以外, 还对包括代谢相关的基因具有广泛的调控作用. 其中, 正调控的基因有 175 个, 负调控的基因有 180 个^[25]. 从对金黄色葡萄球菌毒力因子表达的调控效果来看, MgrA 与 Agr 系统具有相似的调控效应, 即正调控胞外蛋白和负调控表面蛋白基因的表达^[23~25]. MgrA 对细菌的致病能力至关重要, 在小鼠的皮下感染模型中, *mgrA* 基因突变株的致病能力较野生型菌株降低了 1000~10000 倍, 暗示 MgrA 是一个潜在的抗金黄色葡萄球菌致病力的药物作用靶点^[24].

Sun 等人^[26]以荧光各向异性(fluorescence anisotropy, FA)为基础进行高通量筛选, 从 90000 个化合物中发现 5,5-亚甲基化的水杨酸(5,5-methylened-salicylic acid, MDSA)能够明显抑制 MgrA 与靶 DNA 的结合. 研究发现, MDSA 通过与 MgrA 上结合 DNA

的螺旋-转角-螺旋结构结合,从而改变 MgrA 的构象,导致 MgrA 从目的 DNA 上解离出来。尽管 MDSA 抑制 MgrA 与 DNA 相互作用的具体机制并不清楚,不过模拟计算对接(docking)分析表明 MDSA 与 MgrA 上本应同 DNA 结合的色氨酸残基进行了结合,从而阻断了 MgrA 与 DNA 的结合。在体内活性实验中,他们发现与对照组相比,MDSA 能明显减少金黄色葡萄球菌在小鼠肝脏和肾脏所引起的脓肿;同时,从该实验组中分离出的细菌数目仅为对照组的 10%。值得注意的是,水杨酸在临床上有抗真菌、止痒、溶解角质等作用,常与苯甲酸等配成外用制剂,其药理学、药代动力学、毒性等相关的临床数据已非常丰富,这将进一步促进 MDSA 及其衍生物的临床前研究。

3 转肽酶(sortase)及其小分子抑制剂的研 究进展

在革兰阳性菌中,许多表面蛋白如毒力因子 A 蛋白、纤连蛋白结合蛋白(FnbA, FnbB)和凝固因子(ClfA)等需要通过一种转肽过程从而被正确地锚定在细胞壁的表面。这一锚定过程需要表面蛋白的 C 端含有一段保守的锚定信号肽,即 LPXTG 基序。基因组的分析发现金黄色葡萄球菌中含有 2 个转肽酶基因,分别是 *srtA* 和 *srtB*。研究发现^[48], *srtA* 突变株的生长在实验室条件下并未受到影响;但是,该突变株中包括蛋白 A, FnbA, FnbB 和 ClfA 等在内的表面蛋白均不能被锚定至细胞壁表面。尽管 *srtB* 的缺失并不影响蛋白 A, FnbA, FnbB 和 ClfA 的锚定,不过作者推测,该基因的缺失会对其他胞壁蛋白的锚定造成影响,即 SrtA 和 SrtB 认识不同的表面蛋白前体作为底物。通常情况下,细胞壁表面蛋白的锚定可分为 5 步^[48]: (1) 转运。表面蛋白前体的 N 端一般含有分泌信号肽,在信号肽的指引下通过分泌途径被运送至细胞外。在此过程中, N 端的信号肽被切除。(2) 保留。在分泌到胞外的过程中,表面蛋白前体 C 端的细胞壁锚定信号(C-terminal cell wall sorting signal, Cws)仍然保留。(3) 切除。LPXTG 基序上苏氨酸和甘氨酸之间的共价键被转肽酶切除,并形成一硫酯酶的中间体。(4) 连接。II 型类脂上游离的氨基对酶中间体上的硫酯键进行亲核攻击,使得表面蛋白与肽聚糖交连桥之间形成胺键。(5) 与细胞壁的整合。脂连接的表面蛋白通过转糖基作用和转肽作用整合至细胞

壁上^[48]。在金黄色葡萄球菌 Newman 菌株中, *srtA* 基因的缺失突变体引起小鼠肾脏脓肿的能力较野生型菌株明显降低。从突变体中分离到的菌体数量较野生型菌株下降了 100~1000 倍。同时,在小鼠腹腔注射的急性感染模型中, *srtA* 缺失突变体的致病能力也降低了 30 倍左右^[49]。

Chenna 等人^[22]以 SrtA Δ 59(N 端被截短了 59 个氨基酸残基但活性不受影响的重组 SrtA)的晶体结构为模型,对 150000 个化合物进行了模拟筛选,从中发现 108 个化合物可能与 SrtA Δ 59 具有较好的结合能力。通过购买这 108 个化合物实体,测定它们对 SrtA Δ 59 酶活的半数有效抑制浓度(IC₅₀)。最终发现 8 个化合物具有抑制 SrtA Δ 59 活性的能力, IC₅₀ 在 75~400 μ mol/L 之间。对活性最好的化合物进行结构改造后,获得了 IC₅₀ 约为 58 μ mol/L (酶水平)的先导化合物,不过,目前还未见该化合物进行细胞水平活性的报道^[22]。Kang 等人^[50]发现天然产物黄酮醇能有效抑制 2 种转肽酶的活性,而不影响细菌的生长。其中,桑酮、杨酶酮和槲皮素对 SrtA 的 IC₅₀ 为 37.39~52.70 μ mol/L; 对 SrtB 的 IC₅₀ 为 8.54~36.89 μ mol/L。由于黄酮醇能抑制转肽酶的活性而使得 FnbA, FnbB 和 ClfA 等表面蛋白不能被锚定,从而抑制了金黄色葡萄球菌对纤维蛋白原的黏附。

4 金黄色色素及其小分子抑制剂的研 究进展

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)因其可产生金黄色的类胡萝卜素(Carotenoids)而得名, *aureus* 在拉丁文里是金黄色(gold)的意思。研究发现,金黄色色素不但可以增加细菌对油酸的抵抗能力^[51],还可以帮助细菌抵抗宿主体内噬中性粒细胞中活性氧的迫害,同时在小鼠皮下感染模型实验中,不能产生色素的突变株引发的脓肿区域较野生型菌株明显减少,暗示色素能够通过提高细菌抗氧化的能力从而增加细菌的毒力^[52]。因而,金黄色色素是决定金黄色葡萄球菌致病能力的一个关键因子^[51,52]。金黄色色素的生物合成由 *crtOPQMN* 这一操纵子控制,其表达受 SigB 因子的正向调控(如图 3 所示)^[29,53]。金黄色色素的生物合成首先由 *crtM* 编码的脱氢鲨烯合酶催化两分子法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)缩合形成脱氢鲨烯(4,4'-diapophytoene),随后依次在 CrtN, CrtP, CrtQ 和 CrtO 催化下进行脱氢、氧化、糖基化和酰化作用,最终生成金黄色色素。

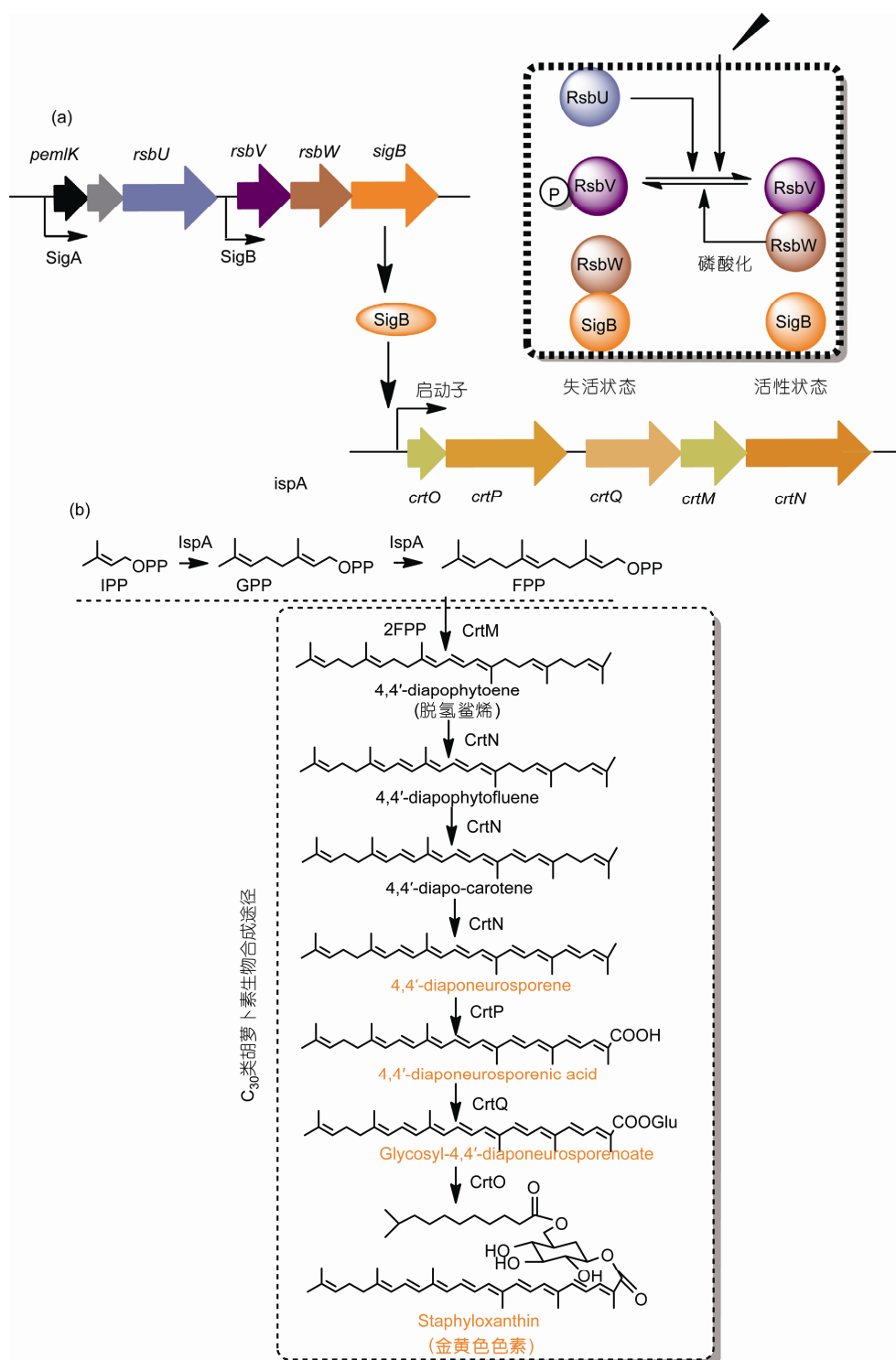


图3 金黄色色素合成相关基因的表达调控及金黄色色素的生物合成途径

(a) *crtOPQM* 操纵子受 *rsbUVWB* 操纵子编码的 *SigB* 因子正调控。在细菌正常的生长条件下，大多数 *RsbV* 被 *RsbW* 磷酸化。*RsbW* 是 *SigB* 的拮抗因子，同时也具有 *RsbV* 磷酸激酶的功能。在受到特定的外界刺激下，*RsbU* 会使拮抗 *RsbW* 的 *RsbV* 去磷酸化，使得 *RsbV* 与 *RsbW* 结合，而将 *SigB* 因子释放出来。自由的 *SigB* 能够与 RNA 核心聚合酶结合，从而激活 *SigB* 依赖的启动子的表达(改自文献[53])；(b) 金黄色色素的生物合成途径。金黄色色素的生物合成首先由脱氢鲨烯合酶 *CrtM* 催化 2 分子法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)缩合形成脱氢鲨烯(4,4'-diapophytoene)，随后依次在 *CrtN*, *CrtP*, *CrtQ* 和 *CrtO* 催化下进行脱氢、氧化、糖基化和酰化作用，最终生成金黄色色素(改自文献[29])

2008年,美国伊利诺大学香槟校区 Eric Oldfield 教授课题组^[30]通过 X 射线衍射方法,成功地解析了金黄色葡萄球菌合成金黄色色素的关键蛋白之一——CrtM 蛋白的三级结构,并发现一个已知的胆固醇合成酶抑制剂 BPH-652 能与 CrtM 蛋白结合;BPH-652 通过抑制 CrtM 蛋白的活性,阻断了金黄色葡萄球菌内金黄色色素的形成,从而消减金黄色葡萄球菌在小鼠体内的致病能力。BPH-652 虽然尚未上市,但此小分子已经在治疗人类高胆固醇的测试上通过了多方临床试验。因此, BPH-652 有望成为安全且可被接受的治疗药物。此外,在寻找金黄色色素合成的抑制剂过程中, Lee 等人^[54]发现黄酮能够在不影响细菌生长的浓度下(50 $\mu\text{g/mL}$)明显抑制金黄色色素的产生。金黄色色素的减少使细菌对过氧化氢的敏感性增加了 100 倍。同时,黄酮的加入还能明显抑制金黄色葡萄球菌中另外 2 个重要毒力因子 *hla* 和 *sae* 的转录。Sakai 等人^[55]采用纸片法从 300 多个天然产物和 1000 多个放线菌发酵产物中分别发现 4 个脂代谢的抑制剂和 2 个蒽醌类化合物可以抑制金黄色色素的产生。根据作者的推测,金黄色色素中含有聚异戊二烯和酰基结构,因而脂代谢的抑制剂可能通过抑制聚异戊二烯和酰基的产生从而抑制金黄色色素的合成。而 2 个蒽醌类化合物,因先前报道具有抗生素的功能,作者对其抑制金黄色色素产生的机制并未作深入的研究,不过根据构效关系的数据,作者暗示 C-1 位上的酮基和 C-6 位上的氢对于抑制金黄色色素的产生是必需的。

我们实验室最近筛选得到一个能有效抑制金黄色色素合成的化合物,其半数有效抑制浓度 IC_{50} 为 280 nmol/L ,与 BPH-652 的 IC_{50} 相当,该化合物的作用分子机理、体内活性正在进一步研究中。

5 其他重要的毒力因子

除上所述,在金黄色葡萄球菌中还有一种至关重要的毒力因子——ClpP(caseinolytic protein protease, ClpP)。ClpP 是一种高度保守的丝氨酸蛋白酶^[56]。该酶对于细菌在压力环境下的生存必不可少,主要负责将损伤的蛋白质解聚和重新折叠,或是降解不能重新折叠的蛋白,是包括金黄色葡萄球菌在内的细菌的主要蛋白质“质量控制”系统。ClpP 蛋白酶体由 ClpP 肽酶亚单位和 Clp ATP 酶亚单位组成,高度依赖 ATP 供能。其中, ClpP 肽酶亚单位是主要的水解

活性区域;而 Clp ATP 酶亚单位则主要负责识别、解折叠或将底物易位并转移至具有蛋白酶活性的 ClpP 肽酶区域。编码 ClpP 肽酶的 *clpP* 基因的突变会引起许多表型的变化,包括对压力的敏感性提高、细胞形态发生紊乱、分裂停止、细菌毒力减弱等^[57]。在金黄色葡萄球菌中, *clpP* 基因的缺失导致细菌在小鼠皮肤脓肿模型中的致病能力显著下降^[27]。由此可见 ClpP 对于金黄色葡萄球菌致病能力的重要作用。因此, ClpP 的选择性抑制剂可能会是治疗感染性疾病的一种新策略。目前,已有研究者发现 β -内酯(β -lactones)可以 ClpP 为靶点,作为金黄色葡萄球菌及其耐药菌株的选择性抑制剂。该项研究表明, β -内酯不仅可以降低金黄色葡萄球菌的溶血能力和蛋白水解能力,还能抑制脂酶和脱氧核糖核酸酶的活性^[28]。

同时,对金黄色葡萄球菌毒力因子表达、细菌致病力的发挥具有重要调节功能的蛋白、通路也是抗细菌感染研究领域的热点,这些研究无疑将为金黄色葡萄球菌致病力的小分子干预研究提供新的视野和切入点。在这方面,复旦大学的 Li 等人^[58]最近发现了金黄色葡萄球菌细胞表面蛋白 SasX 是决定 MRSA 在亚洲流行的一个关键的蛋白分子,由此阻断 SasX 的功能有望抑制流行性 MRSA 的传播。我们实验室最近发现蛋白磷酸酶基因 *stp1* 的缺失导致金黄色葡萄球菌的致病能力下降了 1000~10000 倍,暗示 Stp1 是金黄色葡萄球菌致病力发挥的关键蛋白分子^[59,60];因此针对 Stp1 蛋白进行进一步研究,有望开发新型的抗金黄色葡萄球菌致病力的小分子。

6 展望

抗细菌致病力的治疗策略提供了一个全新的对抗病原菌感染的治疗方式:并非借助于直接杀死细菌,而是消减细菌的致病性或解除其武装,帮助人体的免疫系统有效地清除细菌。此治疗方式之优势在于:这类药物不仅对病原细菌具有很小的选择压力,不易产生耐药性菌株,而且对人体的正常菌群(normal flora)影响较小(表 1)^[7,61]。目前很多已有的研究集中在细菌的群体感应、黏附相关因子、细胞毒性因子、生物被膜形成、免疫逃避等与细菌致病性密切相关的特质方面,并取得了一些具有代表性的研究成果。如抑制鼠伤寒沙门氏菌致病力的化合物 LED209^[62],抑制霍乱弧菌致病力的化合物 Virstatin^[63]以及抑制金黄色葡萄球菌致病力的化合物 BPH-652^[30]

表 1 传统抗生素与抗毒力治疗药物的开发和使用特点

开发和使用特点	传统抗生素	抗毒力治疗药物
抗菌谱	一般为广谱	较窄谱
抗菌效果	高效	中高效
耐药性	选择性压力大, 易催生并富集耐药菌株	选择性压力小, 不易产生细菌耐药株
副作用	某些类别抗生素副作用很大	可能较小
筛选方法	简单, 体外全细胞筛选	特定的筛选模型
重复发现率	高	低

等. 然而, 抗细菌致病力的药物研究才刚刚开始, 它的临床应用并造福人类还有很长的路要走. 随着对金黄色葡萄球菌致病性分子机理研究的深入, 我们人类有信心去应对“后抗生素时代”的到来.

参考文献

1 Raygada J L, Levine D P. Managing CA-MRSA infections: Current and emerging options. *Infect Med*, 2009, 26: 49–58

2 Skov R, Christiansen K, Dancer S J, et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39: 193–200

3 Demain A L, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot*, 2009, 62: 5–16

4 Fischbach M A, Walsh C T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 2009, 325: 1089–1093

5 Klevens R, Morrison M A, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *J Am Med Assoc*, 2007, 298: 1763–1771

6 Rasko D A, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 117–128

7 Barczak A K, Hung D T. Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12: 490–496

8 Cegelski L, Marshall G R, Eldridge G R, et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 17–27

9 Dancer S J, Kirkpatrick P, Corcoran D S, et al. Approaching zero: Temporal effects of a restrictive antibiotic policy on hospital-acquired *Clostridium difficile*, extended-spectrum β -lactamase-producing coliforms and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41: 137–142

10 Lowy F D. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998, 339: 520–532

11 Hanke M L, Heim C E, Angle A, et al. Targeting macrophage activation for the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* bio-film infections. *J Immunol*, 2013, 190: 2159–2168

12 Otto M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. *Peptides*, 2001, 22: 1603–1608

13 George E A, Muir T W. Molecular mechanisms of *agr* quorum sensing in virulent *Staphylococci*. *ChemBioChem*, 2007, 8: 847–855

14 Cheung A L, Zhang G. Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front Biosci*, 2002, 7: 1825–1842

15 Cheung A L, Nishina K A, Trottonda M P, et al. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40: 355–361

16 Giraudo A T, Calzolari A, Cataldi A A, et al. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 177: 15–22

17 Steinhuber A, Goerke C, Bayer M G, et al. Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J Bacteriol*, 2003, 185: 6278–6286

18 Goerke C, Fluckiger U, Steinhuber A, et al. Impact of the regulatory loci *agr*, *sarA* and *sae* of *Staphylococcus aureus* on the induction of α -toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. *Mol Microbiol*, 2001, 40: 1439–1447

19 Novick R P, Geisinger E. Quorum sensing in *Staphylococci*. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 541–564

20 Chan W C, Coyle B J, Williams P. Virulence regulation and quorum sensing in *Staphylococcal* Infections: Competitive AgrC antagonists as quorum sensing inhibitors. *J Med Chem*, 2004, 47: 4633–4641

21 Mazmanian S K, Liu G, TonThat H, et al. *Staphylococcus aureus* Sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 1999, 285: 760–763

- 22 Chenna B C, Shinkre B A, King J R, et al. Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 380–385
- 23 Luong T T, Newell S W, Lee C Y. *mgr*, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2003, 185: 3703–3710
- 24 Chen P R, Bae T, Williams W A, et al. An oxidation-sensing mechanism is used by the global regulator MgrA in *Staphylococcus aureus*. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 591–595
- 25 Luong T T, Dunman P M, Murphy E, et al. Transcription profiling of the *mgrA* regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2006, 188: 1899–1910
- 26 Sun F, Zhou L, Zhao B C, et al. Targeting MgrA-mediated virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Chem Biol*, 2011, 18: 1032–1041
- 27 Frees D, Qazi S N A, Hill P J, et al. Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol*, 2003, 48: 1565–1578
- 28 Böttcher T, Sieber S A. β -Lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* 2008, 130: 14400–14401
- 29 Pelz A, Wieland K P, Putzbach K, et al. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 2005, 280: 32493–32498
- 30 Liu C I, Liu G Y, Song Y C, et al. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science*, 2008, 319: 1391–1394
- 31 Gordon C P, Williams P, Chan W C. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: A medicinal chemistry perspective. *J Med Chem*, 2013, 56: 1389–1404
- 32 Cheung A L, Bayer A S, Zhang G, et al. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Mic*, 2004, 40: 1–9
- 33 Bronner S, Monteil H, Prévost G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: Complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28: 183–200
- 34 Thoendel M, Horswill A R. Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. In: *Advances in Applied Microbiology*. New York: Academic Press, 2010. 91–112
- 35 Yarwood J M, McCormick J K, Paustian M L, et al. Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and *in vivo*. *J Bacteriol*, 2002, 184: 1095–1101
- 36 Abdelnour A, Arvidson S, Bremell T, et al. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun*, 1993, 61: 3879–3885
- 37 Montgomery C P, BoyleVavra S, Daum R S. Importance of the global regulators *agr* and *saeRS* in the pathogenesis of CA-MRSA USA300 Infection. *PLoS One*, 2010, 5: e15177
- 38 Lyon G J, Wright J S, Muir T W, et al. Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 2002, 41: 10095–10104
- 39 Balaban N, Goldkorn T, Nhan R T, et al. Autoinducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *Staphylococcus aureus*. *Science*, 1998, 280: 438–440
- 40 Sklar L A, Gresham H D. Probe report: Small molecule that targets AIP binding interactions in AIP-dependent bacterial quorum sensing. Grant Number: NIH 1 X01 MH07895201, 2012, https://mli.nih.gov/mli/?dl_id=701
- 41 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 Am Chem Soc*, 2013, 135: 7869–7882
- 42 Jefferson K K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 236: 163–173
- 43 Fowler V G, Sakoulas G, McIntyre L M, et al. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with *agr* dysfunction and low-level *in vitro* resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. *J Infect Dis*, 2004, 190: 1140–1149
- 44 Otto M. Quorum-sensing control in *Staphylococci*—A target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 241: 135–141
- 45 Chong Y P, Kim E S, Park S J, et al. Accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from South Korean patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 1509–1512
- 46 Ingavale S S, Van Wamel W, Cheung A L. Characterization of RAT, an autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2003, 48: 1451–1466
- 47 Truong-Bolduc Q C, Zhang X, Hooper D C. Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of *norA* Expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2003, 185: 3127–3138
- 48 Mazmanian S K, TonThat H, Schneewind O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2001, 40: 1049–1057

- 49 Mazmanian S K, Liu G, Jensen E R, et al. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 5510–5515
- 50 Kang S S, Kim J G, Lee T H, et al. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 1751–1755
- 51 Xiong Z, Kapral F A. Carotenoid pigment levels in *Staphylococcus aureus* and sensitivity to oleic acid. *J Med Microbiol*, 1992, 37: 192–194
- 52 Liu G Y, Essex A, Buchanan J T, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*, 2005, 202: 209–215
- 53 PanéFarré J, Jonas B, Hardwick S W, et al. Role of RsbU in controlling SigB activity in *Staphylococcus aureus* following alkaline stress. *J Bacteriol*, 2009, 191: 2561–2573
- 54 Lee J-H, Park J-H, Cho M, et al. Flavone reduces the production of virulence factors, staphyloxanthin and α -hemolysin, in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*, 2012, 65: 726–732
- 55 Sakai K, Koyama N, Fukuda T, et al. Search method for inhibitors of staphyloxanthin production by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35: 48–53
- 56 Yu A Y H, Houry W A. ClpP: A distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett*, 2007, 581: 3749–3757
- 57 Frees D, Savijoki K, Varmanen P, et al. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 2007, 63: 1285–1295
- 58 Li M, Du X, Villaruz A E, et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med*, 2012, 18: 816–819
- 59 Sun F, Ding Y, Ji Q, et al. Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 15461–15466
- 60 Gough N R. Virulence through cysteine phosphorylation. *Sci Signal*, 2012, 5: ec251
- 61 Clatworthy A E, Pierson E, Hung D T. Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 541–548
- 62 Rasko D A, Moreira C G, Li D R, et al. Targeting *qseC* signaling and virulence for antibiotic development. *Science*, 2008, 321: 1078–1080
- 63 Hung D T, Shakhnovich E A, Pierson E, et al. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science*, 2005, 310: 670–674

Small molecules targeting *Staphylococcus aureus* virulence

CHEN FeiFei, DI HongXia & LAN LeFu

Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Staphylococcus aureus causes a variety of infections in humans, ranging from minor skin and wound infections to life-threatening diseases. The increasing prevalence of bacterial strains involving so-called superbugs such as MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) demands the discovery of new drugs. Targeting bacterial virulence rather than bacterial growth represents a new paradigm to antimicrobial therapy that offers promising opportunities to prevent and treat infectious diseases. Here, we review recent research progress in the identification of attractive targets for new anti-virulence drugs against *Staphylococcus aureus* and small molecules that block *Staphylococcus aureus* virulence.

***Staphylococcus aureus*, antibiotic resistant, virulence factors, small molecule inhibitors**

doi: 10.1360/972013-351