

## 原白头翁素对铜绿假单胞菌群体感应系统调控的毒力因子表达量的影响

吕子敏<sup>1</sup>, 邓丽<sup>2</sup>, 廖芳<sup>3\*</sup>

1. 华中科技大学 同济医学院 药学院, 湖北 武汉 430030

2. 华中科技大学 同济医学院附属同济医院 药学部, 湖北 武汉 430030

3. 华中科技大学 同济医学院 病原生物学系, 湖北 武汉 430030

**摘要:** **目的** 研究原白头翁素对铜绿假单胞菌(PA)的生长及群体感应系统(QS系统)调控的毒力因子表达的影响。**方法** 测定原白头翁素对PA的最低抑菌浓度和生长曲线,以40 μmol/L的呋喃酮C-30作为阳性对照,测定原白头翁素(40、80 μmol/L)对铜绿假单胞菌标准株PAO1生长曲线的影响以及QS系统调控的毒力因子中胞外3种毒力因子(绿脓菌素、蛋白水解酶和弹性蛋白酶)表达量的影响。**结果** 在实验所采用的浓度下,原白头翁素对铜绿假单胞菌的生长未表现出明显的抑制作用,但对PAO1的3种毒力因子均有抑制作用,并呈现出剂量相关性。**结论** 原白头翁素抗感染的机制可能是作用于铜绿假单胞菌的QS系统,抑制毒力因子表达,从而降低该菌的毒力。

**关键词:** 原白头翁素; 铜绿假单胞菌; QS系统; 毒力因子

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)02-0155-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.02.013

## Effect of protoanemonin on expression of virulence factors regulated by quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*

Lü Zi-min<sup>1</sup>, DENG Li<sup>2</sup>, LIAO Fang<sup>3</sup>

1. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

3. Department of Pathogenic Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

**Abstract: Objective** To study the effect of protoanemonin on the expression of virulence factors regulated by quorum sensing (QS) system of *Pseudomonas aeruginosa* (PA). **Methods** The minimum inhibitory concentration and growth curve of protoanemonin on PA were determined. With furanone C-30 (40 μmol/L) as positive control, the effect of protoanemonin (40 and 80 μmol/L) on the growth of PAO1 was assessed, and the effects on the expression levels of the extracellular virulence factors (pyocyanin, protease, and elastase) regulated by QS system were also evaluated. **Results** Protoanemonin in concentration used in this study had no significant effect on the growth of PAO1, but it had the inhibitory effect on the three virulence factors of PAO1 with a dosage-dependent manner. **Conclusion** It is possible that protoanemonin acts on QS system of PA to inhibit the expression of virulence factors, in order to reduce the virulence of the bacteria.

**Key words:** protoanemonin; *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing system; virulence factors

在细菌耐药性问题日益严峻的形势下,寻求治疗细菌感染的新思路、新方法具有重要的意义。通过干扰细菌群体感应(quorum sensing, QS)系统来减弱细菌的致病性和降低耐药率已成为研究的一

个热点。群体感应效应是指细菌通过自体诱导分子(autoinducer, AI)感知群体密度,实现细菌间的沟通和协调,调节某些特定的基因,表现出一些单个细菌不能实现的群体行为,如生物膜形成、毒力因

收稿日期: 2012-12-07

作者简介: 吕子敏,男,硕士,副教授,主要从事药物设计与合成研究。Tel: 13707144839 E-mail: ziminlu@mails.tjmu.edu.cn

\*通信作者 廖芳,女,副教授。Tel: 13971417951 E-mail: liaofang781@163.com

子的表达等。因此，通过 QS 抑制剂 (QSI) 干扰 QS 系统功能，能够降低细菌的毒力，减弱细菌的致病性；同时由于 QSI 对细菌本身不产生选择压力，所以不会诱导耐药性的产生。

国内外研究者们发现很多天然 QSI 存在于自然界，特别是植物和真菌中<sup>[1]</sup>。植物和真菌缺乏主动免疫系统，因此它们只能靠分泌化学物质来对抗环境中的细菌。许多中药（如金银花、黄连、苦参、连翘等）可以有效抵抗病原体感染，无不良反应，长期使用未见耐药性出现<sup>[2]</sup>，这类药物的抗菌机制有可能与抑制 QS 有关。

铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (PA)，是一种需氧革兰阴性菌，对多种抗生素均具有耐药性<sup>[3]</sup>。研究表明，其毒力因子包括胞外蛋白酶、外毒素和一些次生代谢产物的表达均受到 QS 系统调控，同时 QS 系统参与生物被膜的形成，而生物被膜是导致耐药性的一个重要原因<sup>[4]</sup>。

白头翁素是毛茛科植物白头翁 *Plusatilla chinensis* (Bunge) Regel 中的一种天然活性成分，具有抗菌、杀虫和抗肿瘤等作用<sup>[5]</sup>，作用机制尚未阐明。本课题通过研究原白头翁素对 PA 生长繁殖和 QS 系统调控的 3 种毒力因子表达量的影响，探讨其对 QS 系统的抑制活性及其抗感染机制。

## 1 材料

### 1.1 菌株及试剂

铜绿假单胞菌 PAO1 为本实验室留存菌种；原白头翁素与 4-溴-5-溴代亚甲基-2(5H)-咪喃酮（简称 C-30）均由本实验室合成，偶氮酪蛋白和弹性刚果红购自 Sigma 公司。

LB 液体培养基配方：胰蛋白胍 (tryptone, Oxoid 公司) 10 g/L、酵母提取物 (yeast extract, Oxoid 公司) 5 g/L、氯化钠 10 g/L；PB 液体培养基配方：细菌蛋白胍 (bacto-peptone, Difco 公司) 20 g/L、氯化镁 1.4 g/L、硫酸钾 10 g/L；PTSB 液体培养基配方：5%的蛋白胍 (peptone, 北京双旋微生物培养基试剂厂)、0.25%的胰蛋白大豆肉汤：胰蛋白胍 (Oxoid 公司) 17 g/L、大豆蛋白胍 (soy peptone, 北京双旋微生物培养基试剂厂) 3.0 g/L、氯化钠 5.0 g/L、磷酸氢二钾 2.5 g/L、葡萄糖 2.5 g/L)；以上培养基均经 121.3 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后使用。

### 1.2 实验仪器

微量进样器 (德国 Eppendorf 公司)；超净工作台 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)；电热恒温

培养箱 (上海跃进医疗器械一厂)；电热手提蒸汽消毒器 (上海医用核子仪器厂)；紫外 - 可见分光光度计 (上海仪器有限公司)；离心机 (上海精密仪器仪表公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 最低抑菌浓度的测定

采用二倍稀释法，用 LB 液体培养基分别将 C-30 和原白头翁素稀释成一系列不同浓度，分装于小试管中，每管 2 mL，同一浓度重复 3 管，加入 PAO1 菌液，使起始菌浓度为  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  CFU/mL。阳性对照组加 LB 培养基和菌液不加药物，阴性对照组加入 LB 培养基不加菌液不加药物。37 °C 恒温培养 24 h 后，观察结果。阳性对照组试管出现明显浑浊，阴性对照组试管未出现浑浊，以不出现浑浊的最低药物浓度为最低抑菌浓度 (MIC)。结果原白头翁素对 PAO1 的最低抑菌浓度为 16 μg/mL (约相当于 160 μmol/L)，而 C-30 的最低抑菌浓度为 132 μg/mL (约相当于 524 μmol/L)，说明原白头翁素对铜绿假单胞菌的抑菌活性强于 C-30，见表 1。

表 1 最低抑菌浓度 (MIC) 测定结果

Table 1 Determination of MIC

质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	原白头翁素	C-30
132	—	—
64	—	+
32	—	+
16	—	+
8	+	+
4	+	+
2	+	+
1	+	+

+: 浑浊, 细菌生长; —: 澄清, 细菌生长受到抑制

+: turbidity, bacteria growth; -: clarify, inhibited bacteria growth

### 2.2 对 PAO1 生长曲线的影响

将 PAO1 在 LB 液体培养基中培养过夜，用 LB 液体培养基稀释。分为 3 组，生理盐水对照组，原白头翁素低、高剂量组，浓度分别为 4、8 μg/mL (相当于 40、80 μmol/L)。原白头翁素低、高剂量组加入与 LB 液体培养基等体积用灭菌生理盐水稀释配成的原白头翁素水溶液，使培养基中的药物浓度分别为 4、8 μg/mL，生理盐水对照组加入等体积的灭菌生理盐水。3 组菌液的起始  $A_{600}$  为 0.05，37 °C 培养，分别在一定的时间点取菌液摇匀后测  $A_{600}$ 。

考察原白头翁素对 QS 系统调控的毒力因子表达量的影响,应在低于抑制细菌生长的浓度下进行实验。从生长曲线可以看出,在初期,原白头翁素对 PAO1 的生长有一定的抑制作用,但是一段时间之后,细菌的生长不再受抑制,4、8 μg/mL 原白头翁素对细菌生长无明显影响,可作为实验选用的低、高剂量白头翁素组浓度,见图 1。

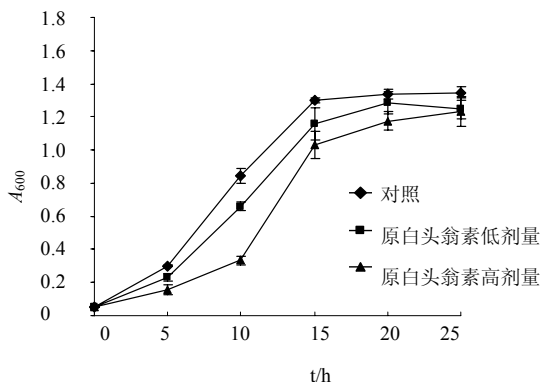


图 1 原白头翁素对 PAO1 生长曲线的影响

Fig.1 Effect of protoanemonin on growth curve of PAO1

### 2.3 对 QS 系统调控的毒力因子表达量的影响

实验分为 5 组,空白对照组(只含有培养基和

菌液),原白头翁素低、高剂量组,浓度分别为 40、80 μmol/L(培养基中原白头翁素浓度为 40、80 μmol/L,其他同空白对照组),乙醇对照组(培养基中含乙醇 0.18%和菌液),C-30 组(培养基中 C-30 浓度为 40 μmol/L,其他同乙醇对照组)。PAO1 在相应液体培养基(测绿脓菌素用 PB 培养基;测蛋白水解酶用 LB 培养基;测弹性蛋白水解酶用 PTSEB 培养基)中生长到对数期后,加入新鲜的液体培养基稀释至起始 A<sub>600</sub> 为 0.05,分入各组,37 °C 培养 24 h,测 A<sub>600</sub>。

**2.3.1 绿脓菌素的测定**<sup>[6-7]</sup> 取菌液 6 mL 置 15 mL 离心管中,加入氯仿 3 mL 轻轻摇动,萃取 20 min,将氯仿层转入干净的试管中,加入 0.2 mol/L HCl 1 mL 轻轻摇动提取 20 min,取水层,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液测 A<sub>520</sub>。绿脓菌素的产量用 A<sub>520</sub> 与相应的菌液 A<sub>600</sub> 的比值 (A<sub>520</sub>/A<sub>600</sub>) 表示。

与空白对照组相比,低、高剂量原白头翁素组绿脓菌素产量分别减少了 21.24% (P<0.01)、46.63% (P<0.001)。与乙醇对照组相比,呋喃酮 C-30 组的绿脓菌素产量减少了 28.77% (P<0.001),见表 2。

表 2 原白头翁素和呋喃酮 C-30 对 PAO1 绿脓菌素、蛋白水解酶、弹性蛋白水解酶的影响

Table 2 Effects of protoanemonin and furanone C-30 on pyocyanin, protease, and elastase in PAO1

组别	浓度/(μmol·L <sup>-1</sup> )	A <sub>520</sub> /A <sub>600</sub>	A <sub>440</sub> /A <sub>600</sub>	A <sub>495</sub> /A <sub>600</sub>
空白对照	—	0.193±0.019	0.254±0.026	0.177±0.038
原白头翁素	40	0.152±0.032**	0.230±0.029	0.158±0.030
	80	0.103±0.021***	0.188±0.009***	0.098±0.029***
乙醇对照	—	0.146±0.004	0.233±0.009	0.181±0.041
C-30	40	0.104±0.004▲▲▲	0.210±0.018▲▲	0.148±0.037

与空白对照组比较: \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 与乙醇对照组比较: ▲▲P<0.01 ▲▲▲P<0.001

\*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 vs blank control group; ▲▲P<0.01 ▲▲▲P<0.001 vs EtOH control group

**2.3.2 蛋白水解酶的测定**<sup>[7-9]</sup> 各组均取菌液 1 mL 于 EP 管中,12 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液用孔径 0.22 μm 的一次性滤器滤过除菌。取续滤液 150 μL,加入 250 μL 含 1%偶氮酪蛋白的 50 mmol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.2) 中,37 °C 反应 5 h,加入 10%三氯乙酸 (TCA) 1.2 mL 静置 30 min,终止反应,12 000 r/min 离心 10 min。取上清液用孔径 0.45 μm 的一次性滤器滤过,取续滤液 1.2 mL 至干净的小试管中,加入 1 mol/L NaOH 1.4 mL 溶液显色,测 A<sub>440</sub>。蛋白水解酶活性用 A<sub>440</sub> 与相应的菌液 A<sub>600</sub> 的比值 (A<sub>440</sub>/A<sub>600</sub>) 表示。

与空白对照组相比,原白头翁低剂量组的蛋白水解酶产量减少了 9.45%,但差异不具有统计学意义 (P>0.05);而原白头翁素高剂量组蛋白水解酶减少了 25.98% (P<0.001)。与乙醇对照组相比,C-30 组蛋白水解酶产量减少了 9.87% (P<0.01),见表 2。

**2.3.3 弹性蛋白水解酶的测定**<sup>[9]</sup> 各组菌液 1 mL 于 EP 管中,12 000 r/min 离心 10 min,上清液用孔径 0.22 μm 的一次性滤器滤过除菌。取续滤液 100 μL 至 EP 管中,加入弹性刚果红 20 mg 和缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 8.8) 900 μL,

37 °C 反应 18 h。加入 0.12 mol/L EDTA 100 μL，在冰上终止反应。12 000 r/min 离心 10 min，除去未反应的底物。取离心后的上清液，用孔径 0.45 μm 的一次性滤器滤过，取续滤液测  $A_{495}$ ，用测得的值减去相应样品未加弹性刚果红的  $A_{495}$  值得酶 - 底物反应后的最终  $A_{495}$ 。弹性蛋白水解酶活性用  $A_{495}$  与相应的菌液  $A_{600}$  的比值 ( $A_{495}/A_{600}$ ) 表示。

与空白对照组相比，原白头翁素低剂量组蛋白水解酶产量减少了 10.73%，但差异不具有统计学意义 ( $P>0.05$ )；而原白头翁素高剂量组蛋白水解酶减少了 44.63% ( $P<0.001$ )。与乙醇对照组相比，40 μmol/L C-30 组蛋白水解酶减少了 18.23%，但不具有统计学意义 ( $P>0.05$ )，见表 2。

### 3 讨论

铜绿假单胞菌的 QS 系统调控着许多毒力因子的表达，如胞外蛋白水解酶（弹性蛋白酶，Las 蛋白酶，碱性蛋白酶）、次级代谢产物（绿脓菌素，氢氰酸，带荧光的水溶性荧光素 pyoverdine）、毒素（外毒素 A）等<sup>[8]</sup>，并与耐药生物被膜的形成有密切关系。寻找或设计以铜绿假单胞菌的 QS 系统为靶点的化合物，是一种很有前景的抗感染策略。

人工合成的呋喃酮 56 和呋喃酮 C-30（结构见图 2）能通过竞争 AHL 受体而抑制 QS 系统<sup>[8,10]</sup>，原因可能是它们与 AHL 结构相似<sup>[11]</sup>。发现存在于毛茛科植物白头翁中的原白头翁素（结构见图 2）与呋喃酮类 QSI 结构极为相似。因此，原白头翁素抗感染的机制可能是作用于细菌的 QS 系统。

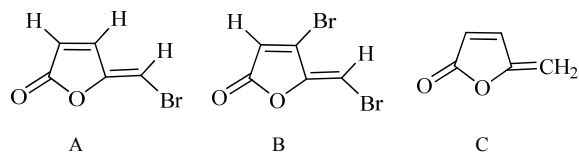


图 2 呋喃酮 56 (A)，呋喃酮 C-30 (B)，原白头翁素 (C) 的化学结构

Fig.2 Chemical structure of furanone 56 (A), furanone C-30 (B), and protoanemonin (C)

本研究选取铜绿假单胞菌标准株 PAO1，以具有较高 QSI 活性的呋喃酮 C-30<sup>[11]</sup>为阳性对照，考察了原白头翁素对铜绿假单胞菌生长繁殖的干扰和对该菌 QS 系统调控的 3 种胞外毒力因子（绿脓菌素、蛋白水解酶、弹性蛋白水解酶）表达量的影响。为了排除细菌生长对毒力因子表达的影响，实验结果以吸光度与相应的菌液  $A_{600}$  的比值表示。抑菌实验

表明，原白头翁素对 PAO1 的抑菌活性强于呋喃酮 C-30。进一步研究发现，原白头翁素在浓度为 40、80 μmol/L 时，对 PAO1 的生长曲线没有明显的影响，因此，选择这两个浓度给药，考察原白头翁素对 PAO1 3 种 QS 系统调控的毒力因子表达的影响。

绿脓菌素是铜绿假单胞菌分泌的一种蓝绿色的色素，属于三环化合物中的吩嗪类，在细菌生长的稳定期产生，是其重要毒力因子之一，也是导致肺部持续感染的原因<sup>[12]</sup>。在铜绿假单胞菌感染的患者痰液中，绿脓菌素的浓度高达 100 μmol/L<sup>[13]</sup>。Rahme 等<sup>[14]</sup>发现不能产生绿脓菌素的突变株 PA14 对鼠模型的致病性减弱。蛋白水解酶包括碱性蛋白酶，弹性蛋白酶和 LasA 蛋白酶。弹性蛋白酶以弹性蛋白、人类免疫球蛋白 G 和 A、一些胶原、血清 α1-蛋白酶抑制剂以及补体系统元件为底物，是铜绿假单胞菌产生的一种毒力因子。实验结果表明，在不影响生长的浓度下，原白头翁素能够抑制 PAO1 绿脓菌素、蛋白水解酶及弹性蛋白水解酶的表达，呈现剂量相关性。原白头翁素能抑制铜绿假单胞菌标准株 PAO1 毒力因子的表达，降低该菌的毒力，可作为研究 QS 抑制剂的候选药物。要证实原白头翁素是否能特异性地抑制铜绿假单胞菌的 QS 系统，还有待进一步研究提供更多的证据。

### 参考文献

- [1] 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]. *J Bacteriol*, 2005, 187(5): 1799-1814.
- [2] 陈康乐, 胡起娜. 征服“超级细菌”的希望何在? [J]. *现代中医药*(北京), 2001(2): 49-51.
- [3] Smith R S, Iglewski B H. Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(10): 1460-1465.
- [4] Davies D. Understanding biofilm resistance to anti-bacterial agents [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(2): 114-122.
- [5] 伍越环, 朱胄远, 席英, 等. 原白头翁素生物活性中心的研究 [J]. *中国科学技术大学学报*, 1991, 21(2): 163-170.
- [6] Essar D W, Eberly L, Hadero A, et al. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in Pseudomonas aeruginosa: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications [J]. *J Bacteriol*, 1990, 172(2): 884-900.
- [7] Prithiviraj B, Bais H P, Weir T, et al. Down regulation of virulence factors of Pseudomonas aeruginosa by salicylic

- acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans* [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(9): 5319-5328.
- [8] Hentzer M, Riedel K, Rasmussen T B, *et al.* Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound [J]. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 1): 87-102.
- [9] Rudrappa T, Bais H P. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(6): 1955-1962.
- [10] Manefield M, de Nys R, Kumar N, *et al.* Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein [J]. *Microbiology*, 1999, 145(Pt 2): 283-291.
- [11] Givskov M, de Nys R, Manefield M, *et al.* Eukaryotic interference with homoserine lactone mediated prokaryotic signaling [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(22): 6618-6622.
- [12] Hentzer M, Wu H, Andersen J B, *et al.* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors [J]. *EMBO J*, 2003, 22(15): 3803-3815.
- [13] 柴文成, 陈佰义. 绿脓菌素在铜绿假单胞菌感染中的作用 [J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(23): 1811-1814.
- [14] Rahme L G, Tan M W, Le L, *et al.* Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors [J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(24): 13245-13250.