

• 综 述 •

信号分子调控细菌生物被膜形成的分子机制

涂春田¹, 汪洋¹, 易力², 王瑜欣¹, 刘宝宝¹, 官胜龙¹

1 河南科技大学 动物科技学院, 洛阳市畜禽分子病原与免疫学重点实验室, 河南 洛阳 471003

2 洛阳师范学院 生命科学院, 河南 洛阳 471022

涂春田, 汪洋, 易力, 等. 信号分子调控细菌生物被膜形成的分子机制. 生物工程学报, 2019, 35(4): 558–566.

Tu CT, Wang Y, Yi L, et al. Roles of signaling molecules in biofilm formation. Chin J Biotech, 2019, 35(4): 558–566.

摘 要: 细菌生物被膜 (Bacterial biofilm, BF) 是黏附于机体黏膜或生物材料表面、由细菌及其分泌的多聚糖、蛋白质和核酸等组成的被膜状生物群体, 是造成持续性感染的重要原因之一。细菌在生长繁殖时会产生一些次级代谢产物, 部分会作为生物信号分子在细胞内或细胞间传递信息, 使细菌在多细胞水平协调统一相互配合, 以完成一些重要的生理学功能, 如生物发光、BF 的形成、运动与固定态生活方式的转换等。信号分子在 BF 形成过程中起着重要的调控作用。文中从密度感应系统 (Quorum-sensing systems, QS)、环二鸟苷酸 (Cyclic diguanylate, c-di-GMP)、双组分系统 (Two-component systems, TCS) 和 sRNA 等方面介绍影响 BF 形成的相关信号分子, 重点对 BF 形成过程中的信号分子调控机制进行概述, 这对于深入揭示信号分子调控 BF 形成的机制十分必要。

关键词: 生物被膜, 信号分子, 密度感应系统, sRNA, c-di-GMP

Roles of signaling molecules in biofilm formation

Chuntian Tu¹, Yang Wang¹, Li Yi², Yuxin Wang¹, Baobao Liu¹, and Shenglong Gong¹

1 Key Laboratory of Molecular Pathogen and Immunology of Animal of Luoyang, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

2 College of Life Sciences, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, Henan, China

Abstract: Bacterial biofilm refers to a tunicate-like biological group composed of polysaccharide, protein and nucleic acid secreted by bacteria on the surface of the mucous membrane or biological material. The biofilm formation is a major cause of chronic infections. Bacteria could produce some secondary metabolites during the growth and reproduction. Some of them act as signaling molecules allowing bacteria to communicate and regulate many important physiological behaviors at multiple-cell level, such as bioluminescence, biofilm formation, motility and lifestyles. Usually, these signal molecules play an important role in the formation of bacterial biofilm. We review here the effects of related signal molecules of Quorum Sensing, cyclic diguanylate, Two-Component Systems and sRNA on the biofilm formation. Focusing on these regulation mechanism of signal

Received: August 10, 2018; **Accepted:** January 28, 2019

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFD0500100), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31772761, 31540095), Science and Technology Development Project of Henan Province (Nos. 182300410047, 162300410067).

Corresponding author: Yang Wang. Tel: +86-379-64282431; E-mail: wangyocan@163.com

国家十三五重点研发项目 (No. 2018YFD0500100), 国家自然科学基金 (Nos. 31772761, 31540095), 河南省自然科学基金 (Nos. 182300410047, 162300410067) 资助。

molecules in the process of biofilm formation is necessary for the prevention and treatment of some chronic diseases.

Keywords: biofilm, signaling molecules, quorum sensing, sRNA, c-di-GMP

生物被膜 (Bacterial biofilm, BF) 是指黏附于机体黏膜或生物材料表面、由细菌分泌的胞外聚合物 (EPS) 组成的基质包裹菌体形成的被膜状生物群体^[1]。EPS 主要是由细菌自发产生, 由多糖、蛋白质、脂质、细胞外 DNA (eDNA) 和生物表面活性剂组成。据报道, 自然界中任何成熟的细菌均可形成 BF, 成熟 BF 可以是同种或不同种细菌共同形成的。细菌 BF 状态被认为是一种细菌适应不良环境而形成的保护模式。已经证明, 与浮游细胞相比, 生活在 BF 内的细菌抵抗抗生素和免疫系统的能力更强^[2-3], 这加强了人们对这种细菌生命形式的关注。研究发现, BF 能增强细菌的耐受性有诸多原因, 主要包括细菌在 BF 内缓慢生长和由各种生物聚合物组成的细胞外基质的存在。BF 与其周围基质的形成和被膜内细菌增

殖受到许多因素的影响, 包括参与 BF 生命周期的不同阶段的多个复杂的调节系统。

信号分子是细菌在代谢过程中自主产生的代谢产物, 它不仅能在胞内调控细菌个体的生命活动, 还能分泌到胞外调节细胞间的生命活动, BF 的形成已被证实受多种信号分子的调控^[4]。近年来, 有关细菌 BF 的形成过程和结构成分的研究已有报道, 但就信号分子与细菌 BF 形成的关系却报道较少, 而揭示二者之间的关系会为解决病原菌的持续性感染提供一个全新的思路。本文概述了 4 个调控系统 QS、c-di-GMP、双组分系统和 sRNA, 重点阐述了相关信号分子与 BF 形成的关系 (图 1 表示 QS、c-di-GMP、双组分系统和 sRNA 对 BF 的调控机制), 以期寻找出合适的能抑制 BF 相关信号分子传递的抑制剂。

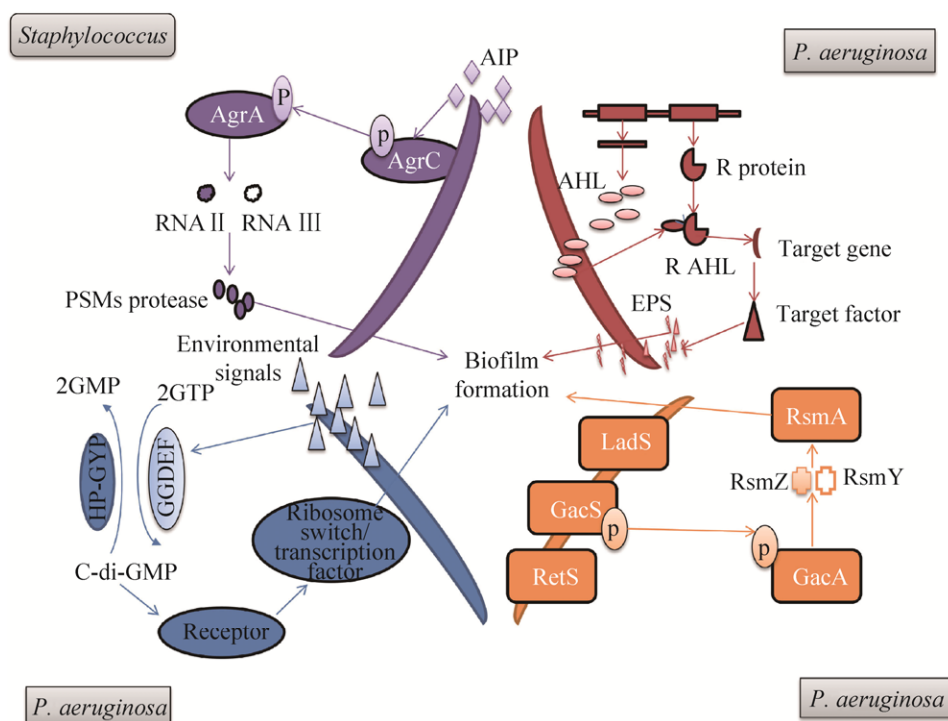


图 1 QS、c-di-GMP、双组分系统和 sRNA 对 BF 的调控机制^[5]

Fig. 1 Regulatory mechanism of QS, c-di-GMP, two component system and sRNA signaling molecules on biofilm formation^[5].

1 密度感应系统 (QS) 相关信号分子

20 世纪 70 年代, Hasting 等^[6]通过对海洋鱼类共生细菌费氏弧菌 *Vibrio fischeri* 和哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 的发光机制的研究, 揭示了细菌与细菌间是存在信息交流的。这种细菌通过自身产生的信号分子进行交流和协调群体行为的过程称为密度感应。至今已经发现多种介导密度感应有关的信号分子, 如 N-酰化高丝氨酸内酯 (N-Acyl homoserine lactones, AHL)、自诱导多肽 (Autoinducing peptide, AIP)、自诱导分子 II (Autoinducer-2, AI-2) 和扩散性信号分子 (Diffusible signal factor, DSF) 等, 本文以 AIP、AHL 和 AI-2 这 3 种研究比较广泛的 QS 信号分子为例, 阐述其调控 BF 形成的相关机制。

1.1 自诱导多肽 (Autoinducing peptide, AIP)

AIP 是革兰阳性菌中的寡肽类自诱导信号分子, 是参与细菌种内信息交流的 QS 信息分子。目前对于革兰阳性菌 AIP 信号分子的研究较多的是葡萄球菌, 其调控基因是附属基因调节子 (Accessory gene regulator, agr), 能产生和感应的信号分子为自诱导物 (AIP)。agr 是由 RNA II 和 RNA III 两个转录单元组成, 其启动子分别是 P2 和 P3, RNA II 的转录框包括 *agrD*、*agrB*、*agrC* 和 *agrA* 4 个基因的 agr 操纵子, RNA III 的转录框是 agr 系统的效应分子, 编码 α -溶血素和 δ -毒素等毒力因子。*agrB* 和 *agrD* 产物参与 AIP 的产生; *agrA* 和 *agrC* 基因编码的蛋白质形成一个双组分系统 (Two component system, TCS), AgrC 是双组分系统的感应激酶, 能结合 AIP, 并磷酸化激活 AgrA, 激活的 AgrA 与 P2 和 P3 结合从而诱导 RNA II 和 RNA III 的转录。同时, 活化的 agr 可进一步增强 AIP 的表达, 对 agr 的自激活机制起到信号放大的作用。

大量研究表明, agr 介导的群体密度感应系统

对葡萄球菌 BF 的形成有着极其重要的影响, 具有上调细胞与 BF 分离、下调 BF 初始黏附的作用。agr 可上调酚溶解性调理素 (Phenol-soluble modulins, PSMs) 和蛋白酶的表达, 从而促进后期细胞与 BF 的分离^[7]。研究浮游态金黄色葡萄球菌和 BF 状态下金黄色葡萄球菌 agr 活性发现, 浮游态的细菌表现出高水平的 agr 活性, 而 BF 中的细胞主要抑制 agr 系统, 这表明 agr 系统参与了 BF 的脱落^[8]。agr 还可以通过下调如自溶血素 E (Autolysin E, AtlE) 等与 BF 初期形成有关的粘附分子的形成从而调控 BF, Dai 等^[9]通过对野生表皮葡萄球菌与 agr 突变株形成 BF 能力对比发现, agr 突变株形成更厚的 BF, 而 agr 和 AtlE 双突变菌株 BF 形成功能严重受损, 在 agr 突变株中, AtlE 表达量增加, 而在 agr 与 AtlE 双突变株中几乎没有 AtlE 表达。由此表明, agr 突变株通过增加 AtlE 的产生量, 从而加强细菌的初始黏附功能, 使 BF 形成能力增强。

1.2 N-酰化高丝氨酸内酯 (N-acyl homoserine lactones, AHL)

由信号分子 AHL 介导的 QS 系统, 是革兰阴性菌种内通讯语言, 它在生物体内调节多种生理功能, 如毒力因子的产生和 BF 的形成。革兰阴性菌中的 QS 系统被称为 LuxI/LuxR 型自诱导系统, 其信号分子是 AHL。在 LuxI/LuxR 调控网络中, LuxI 型蛋白是负责产生 AHL 分子的酶, 而 LuxR 型蛋白是负责接收 AHL 分子的受体。

AHL 分子的碳链长度不同, 短链分子 (4–8 个碳原子) 可以通过自由扩散进出细胞, 长链分子 (10–12 个碳原子) 需要主动运输通过细胞膜。AHL 通过细胞膜扩散到细菌周围并富集到特定密度后, AHL 分子会重新进入细胞结合到 LuxR 受体蛋白上, 激活 LuxR 蛋白并形成 R-AHL 复合体, 随后 R-AHL 复合体与目的激活子相互作用诱导目的基因表达, 如合成胞外多糖、毒力因子及

藻酸盐等。铜绿假单胞菌野生株形成的 BF 高度结构化、较厚,但临床分离获得的不产生 AHL 信号分子的突变株则不能形成成熟的 BF^[10]。研究发现,铜绿假单胞菌 PA01 突变株(不能产生 AHL)形成的 BF 扁平、均质,人工添加 AHL 信号分子后,又能形成与野生型菌株相同的有结构的、异质化的 BF^[11],这证实了 AHL 在铜绿假单胞菌 BF 的形成过程中具有重要作用。大多数革兰阴性菌如荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌等都使用 LuxI/LuxR 型自诱导系统,沙门菌属、埃希菌属和克雷伯杆菌属在革兰阴性菌中是例外,因为它们的 LuxI/LuxR 型自体诱导系统不完善^[12-13],这些属的细菌不具有 LuxI 家族或其他 AHL 合酶,然而,它们有 LuxR 家族蛋白质,可以感知某些 AHL 分子,从而被调控。

1.3 自诱导物 II (AI-2)

由 LuxS/AI-2 介导的群体感应系统广泛存在于革兰阳性菌和革兰阴性菌中,其信号分子 AI-2 被认为是种间通用信号分子^[14]。AI-2 的合成需要 *luxS* 基因编码的 LuxS 蛋白酶的催化作用,细菌产生的 AI-2 分泌到细胞外环境,随着细胞的分裂增殖,胞外的 AI-2 的浓度也会不断增加,当 AI-2 浓度达到阈值后细菌通过感应周围 AI-2 信号分子的浓度而对其周围细菌进行“计数”,并会通过一系列的调控系统调控与 QS 相关的基因的表达,如 BF 的形成和毒力因子等基因的表达^[14]。

本课题组一直致力于猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) LuxS/AI-2 QS 系统的研究,利用同源重组原理构建了猪链球菌 2 型 *luxS* 基因缺失株、互补株和过表达株,研究发现缺失株不能产生 AI-2 信号分子^[15],而 *luxS* 过表达菌株 AI-2 信号分子产生量也并未增加,缺失 *luxS* 基因对 SS 的 BF 的形成产生了显著的影响,过表达菌株形成生物被膜的能力有一定增强,并随培养时间增加而增加^[16]。外源添加 0–2 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 分子能够显

著增加 SS 生物被膜的形成,而添加 2–15 $\mu\text{mol/L}$ 的 AI-2 分子后生物被膜的形成能力受到抑制,外源添加 AI-2 分子能显著提高 *luxS* 缺失株的生物被膜形成能力^[17]。研究发现 SS 随细菌密度的增加胞外 AI-2 信号分子的浓度也在不断增加,并在对数生长末期达到最大,稳定期和衰亡期迅速减少,这说明 SS 能将胞外 AI-2 运至胞内,细胞内存在 AI-2 的摄取机制和与之结合的受体蛋白。添加不同浓度 AI-2 分子可以显著提高毒力基因 *cps2*、*sly* 和 *mrp* 的表达,而 *ef*、*fbps* 和 *gapdh* 基因表达却有一定下调^[17]。AI-2 信号分子可能通过与受体蛋白结合来调控相关基因的表达而影响 BF 的形成。课题组解析了猪链球菌 LuxS 蛋白晶体的三维晶体结构,发现位于底物结合位点附近 80 位和 87 位氨基酸发生了可能的进化突变,通过定点突变发现 2 个氨基酸的突变对其底物结合和酶的催化能力有较大影响,并影响猪链球菌 AI-2 的产生和 BF 的形成能力^[18]。

2 环二鸟苷酸 (c-di-GMP)

小分子核苷酸 c-di-GMP 是细菌中普遍存在的第二信使,它在 BF 的形成和运动的切换之中作为胞内的信号分子而起着重要作用,近年来在生物界引起了广泛的关注。研究发现,它是通过改变病原体的生活方式,从而提高病原体的生存潜力。病原菌生活方式的转换受 c-di-GMP 在细胞内的浓度调控,低水平的 c-di-GMP 能促进细胞运动基因的表达,高水平 c-di-GMP 表现出促进细胞粘附因子的产生和胞外基质组分的增加,使细菌更易粘附在细胞或生物材料表面,有利于 BF 的形成^[19]。c-di-GMP 在细胞内的浓度受两种酶的调节:鸟苷酸环化酶 (DGCs),含 GGDEF 结构域由两分子 GTP 合成 c-di-GMP;磷酸二酯酶 (PDEs),含一个 EAL 或 HD-GYP 结构域,可降解 c-di-GMP,具有 EAL 结构域的磷酸二酯酶将 c-di-GMP 降解

为线性的二核苷酸 pGpG, HD-GYP 结构域催化 c-di-GMP 降解为两分子的 GMP 分子。此外, 还鉴定出了多种同时含有 GGDEF 和 EAL 结构域的蛋白质能同时调控 c-di-GMP 的合成和降解^[20]。c-di-GMP 调控 BF 形成中的重要作用是通过调控一些生物因子例如 Psl、Pel、藻酸盐胞外多糖、表面粘附素 CdrA 和 IV 型菌毛的合成来实现的。许多研究表明, c-di-GMP 在细胞内浓度的变化往往伴随着 BF 形成的变化^[21]。

铜绿假单胞菌是研究 BF 的模型生物。研究表明, c-di-GMP 能促进铜绿假单胞菌中的多种粘附素的产生。如 IV 型菌毛的合成依赖于具有 c-di-GMP 结合域的蛋白质 PilZ 和 FimX 的调控, 此外, 杯状菌毛的合成也受到 c-di-GMP 的调节^[22]。CupA 的表达依赖于具有 GGDEF 或 c-di-GMP 结构域的蛋白质 WspR、MorA 和 PA1120^[23]。PDE RocR 被证明参与了 CupB 和 CupC 菌毛的合成, PDE PvrR 参与了 CupD 菌毛的合成^[24-25]。此外, CupA 已被证明参与 SDS 诱导的自动聚集, 这取决于由 SiaD DGC 介导的 c-di-GMP 在细胞内增长的水平。此外, 表面蛋白 CdrA 已被证明能使绿脓杆菌细胞结合在 Psl 多糖上, c-di-GMP 在转录水平正调控表面蛋白 CdrA 的产生。

研究发现, c-di-GMP 还能促进 *psl* 多糖基因的转录^[26]。当 RsmA 不被 sRNA RsmY 和 RsmZ 屏蔽时, 发现 *psl* 的表达通过 RsmA 蛋白与 *psl* mRNA 的结合而在转录后水平被调节。Irie 等报道 Psl 多糖能通过 SiaD 和 SadC DGCs 刺激 c-di-GMP 的合成^[27], c-di-GMP 浓度的升高会促进 Psl 多糖的合成和 BF 基质中其他组分产量的增加。胞外多糖可以通过特异性的正反馈调节通路促进 BF 的形成, 这可能对浮游细菌吸附在现有的 BF 上起到一定的作用。藻酸盐是粘液型铜绿假单胞菌分泌的细胞外多糖和主要粘附因子, 是组成 BF 的重要成分, c-di-GMP 能够与作为藻酸

盐合酶一部分的膜锚定蛋白 Alg44 的结构域 PilZ 相结合, 从而正调控藻酸盐的产生。Pel 多糖的合成在转录和翻译后水平都受到 c-di-GMP 的调节, 对铜绿假单胞菌野生型菌株及 *wspF* 突变体 (具有升高 c-di-GMP 水平的能力) 进行的微阵列分析表明在 *wspF* 突变体中 *pel* 基因的转录水平增加。此外, 还发现 c-di-GMP 与转录调节物 FleQ 结合, 从而诱导 *pel* 基因的转录^[28]。Pel 多糖合成在翻译后水平通过 c-di-GMP 与 PelD 蛋白的结合而被激活^[29]。

大量研究表明, c-di-GMP 参与将急性感染转变为持续性感染^[4,30], 与持续性感染相关的粘液表型在一定程度上受到 c-di-GMP 的调节, 且高浓度的 c-di-GMP 可将细菌分泌系统从 T3 切换到 T6, c-di-GMP 的这些功能均对 BF 的形成具有调节作用。

3 双组分系统 (Two component system, TCS) 与 sRNA

双组分系统 (TCS) 是 QS 系统的核心部分, TCS 参与调控细菌的多种重要生物学功能, 包括与宿主的识别、细菌生长和营养代谢、毒力因子的表达、致病性及耐药性等^[31]。TCS 由两个部分组成: 位于内膜中的组氨酸激酶 (Histidine protein kinases, HPK) 即“受体”和位于细胞质中的调节蛋白 (Regulatory protein, RR) 即“调控子”。HPK 能感受胞外生物信号和环境条件的刺激并发生磷酸化, 之后将磷酸基团转移给其耦联的 RR 保守的天冬氨酸残基上, 磷酸化使 RR 被激活, 激活后的 RR 可以结合在受调控基因的启动子上, 进而调控基因的表达。

在铜绿假单胞菌中, 目前已经鉴定出 60 多种双组分系统, 其中 Gac 系统的研究是最深入的, 它最初在丁香假单胞菌中被发现, 由跨膜传感器激酶 GacS (HPK) 和其偶联调节物 GacA (RR) 组成, GacS 具有一个自动磷酸化的保守组氨酸残

基,被激活后的磷酸基团能转移到其偶联调节物 GacA 上,影响 RsmZ 和 RsmY 两个 sRNA 的转录^[32]。这两个 sRNA 能结合在 CsrA 同源物 RsmA 上,从而影响 RsmA 蛋白的功能。RsmA 是一个全局性的转录调控蛋白,可抑制 QS、胞外产物和运动等不同靶基因的表达从而影响 BF 的形成^[33]。最近在铜绿假单胞菌中又鉴定出了一个 CsrA 同系物 RsmF, RsmF (也称为 RsmN) 是一种与 mRNA 结合的蛋白,与 RsmA 有多个共同的结合靶标,包括 RsmY 和 RsmZ。然而与 RsmA 相比, RsmF 与这些 sRNA 的结合亲和力明显较低。另一方面, RsmF 不能结合 *pslA* 显示出了与 RsmA 的不同结合特性^[34]。

SagS/BfiS 是 GacS 调控网路的一个分支。SagS 是细菌浮游态和生物被膜态的一个开关,并且是可以磷酸化的磷酸激酶。SagS 通过不同调节途径调控 RsmY 和 RsmZ,其对 RsmY 的调节依赖于一种组氨酸磷酸转移蛋白 HptB^[35],而其对 RsmZ 的调节是依赖于 HptB 与另一个磷酸激酶 BfiS 的相互作用。BfiS 是生物被膜形成过程中细胞向不可逆附着过渡所必需的。BfiS、BfiR 的同源 RR 可激活 CafA (RNase G) 的表达, CafA 可以降低 RsmZ 的表达水平,而 RsmZ 的表达水平的降低是生物被膜成熟和维持所必需的^[36]。当然, RsmY 和 RsmZ 水平也受到其他调节因子的影响,例如 Anr/NarL,它能在低氧条件下下调这两种 sRNA,而 β -内酰胺酶调节剂 AmpR,可以上调 RsmZ^[37-38]。在细菌中这些 sRNA 的转录水平由多个交叉调节系统紧密调控,以调控细菌从浮游态生长模式到生物被膜生长模式的转变。

除传感器激酶 GacS 外,最近又发现了两种传感器激酶 RetS (调节胞外多糖和 III 型分泌系统) 和 LadS (降低细菌粘附能力) 是通过 GacA 调节基因表达进而影响 BF 的形成。在探索 RetS 对 GacS/A 的影响中,其实是通过在 RetS 和 GacS 之

间形成异二聚体,进而导致 GacS 的自磷酸化被阻断,表明 RetS 是 GacS 的拮抗剂^[39]。LadS 通过 GacA 激活 RsmY 和 RsmZ 而具有与 RetS 相反的功能^[40-41],这表明 LadS 有助于 BF 的形成。最近报道了一种新的与 RsmA 结合的 RsmY/RsmZ 型 sRNA,被称为 RsmW,研究发现它不受 GacA 调控,与 rsmY 和 rsmZ 表达相反,并发现它的表达上调会促进 BF 的形成^[42]。

Gac 系统除了通过调节 QS 影响 BF 的形成外,通过体外研究发现它还通过调节胞外多糖 Pel、Psl 和 IV 型菌毛,参与细菌浮游态与 BF 生长模式之间的转换。Gac 系统被认为通过 RsmA 来调节与 type-III 和 type-IV 分泌系统 (T3SS 和 T6SS) 相关的基因的表达,在急性和持续性感染之间起转换作用^[26]。体外研究表明,急性感染通常与 T3SS 产生高毒力因子有关,而与 BF 有关的持续性感染则表现出较弱的 T6SS 表达^[43]。通过对突变体的研究,得出这一转变是由两个传感器 RetS 和 LadS 来促成的。*retS* 和 *rsmA* 的突变体表现出相似的表型,胞外多糖产生增多, BF 增多, T3SS 的表达减少,以及 IV 型菌毛活力降低^[44]。与此相反, *ladS* 突变体表现出 T3SS 的表达增强 BF 形成量降低。近年来,尽管对 Gac 系统进行了深入研究,但是由传感器激酶 GacS、LadS 和 RetS 检测到的触发磷酸化反应的信号仍未鉴定出来,寻找出传感器激酶的激活剂是绝大多数双组分系统尚未解决的问题^[45]。然而,寻找传感器激酶的激活剂有其重要意义,因为可以通过它们来控制传感器激酶的激活与否,从而调控细菌的行为,这对于细菌感染的治疗是非常有用的。

总之, Gac 调控网络是一种复杂的多激酶网络,在调控细菌浮游态生长模式和生物被膜生长模式之间起主要作用。调控网络的复杂性和大量不同的传感器是整合大量信号分子并作出最适合细菌生存指令所必需的。

4 展望

信号分子可以在细菌生长的特定环境中调节其生命活动,与BF相关的信号分子能使细菌对周围其他细菌的存在作出反应,进而调整自身的生命活动。在过去十年中,有关信号分子调控致病菌BF形成机制的研究已取得显著进步,但寻找信号分子识别的受体仍然是信号转导研究的瓶颈。而且生物被膜的形成是由QS、c-di-GMP和双组分系统等共同调节,有意思的是这3个系统彼此之间存在着一些相同功能,如上文所述高水平c-di-GMP和Gac系统的激活均能诱导生物被膜形成和持续性感染,这种特性增加了寻找这些信号分子受体蛋白的难度,也使得生物被膜形成网络更加复杂。因此,充分了解参与形成复杂聚合物的细胞间信号转导过程是一项艰巨的挑战。但是换言之,与QS、TCS和c-di-GMP相关的信号分子均可以作为细菌生物被膜的研究靶标。通过发掘QS、c-di-GMP和TCS对生物被膜形成的机制,将为寻找新的靶点作用药物奠定基础,通过干扰生物被膜形成的某个环节,将有望产生有效的抗感染治疗方法,为彻底治疗临床难治的持续性感染带来新希望。

REFERENCES

- [1] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9): 623–633.
- [2] Høiby N, Bjørnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(4): 322–332.
- [3] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284(5418): 1318–1322.
- [4] Jakobsen TH, Tolker-Nielsen T, Givskov M. Bacterial biofilm control by perturbation of bacterial signaling processes. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1970.
- [5] Solano C, Echeverez M, Iñigo L. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 18(4): 96–104.
- [6] Neilson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*, 1979, 43(4): 496–518.
- [7] Loughran AJ, Atwood DN, Anthony AC, et al. Impact of individual extracellular proteases on *Staphylococcus aureus* biofilm formation in diverse clinical isolates and their isogenic sarA mutants. *Microbiologyopen*, 2014, 3(6): 897–909.
- [8] Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*, 2004, 186(6): 1838–1850.
- [9] Dai L, Yang L, Parsons C, et al. *Staphylococcus epidermidis* recovered from indwelling catheters exhibit enhanced biofilm dispersal and “self-renewal” through downregulation of agr. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1): 102.
- [10] Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, et al. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 2004, 53(9): 841–853.
- [11] Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, et al. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol*, 2004, 186(21): 7312–7326.
- [12] Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, 25(4): 365–404.
- [13] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, 176(2): 269–275.
- [14] Wang Y, Wang YX, Sun LY, et al. The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(17): 7231–7238, doi: 10.1007/s00253-018-9170-7.
- [15] Wang Y, Li Y, Zhang ZC, et al. Overexpression of luxS cannot increase autoinducer-2 production, only affect the growth and biofilm formation in *Streptococcus suis*. *Sci World J*, 2013, 2013: 924276.
- [16] Wang Y, Zhang W, Wu ZF, et al. Functional analysis of luxS in *Streptococcus suis* reveals a key role in biofilm formation and virulence. *Vet Microbiol*, 2011, 152(1/2): 151–160.
- [17] Wang Y, Yi L, Wu ZF, et al. Comparative proteomic analysis of *Streptococcus suis* biofilms and

- planktonic cells that identified biofilm infection-related immunogenic proteins. PLoS ONE, 2012, 7(4): e33371.
- [18] Wang Y, Yi L, Wang SH, et al. Crystal structure and identification of two key amino acids involved in AI-2 production and biofilm formation in *Streptococcus suis* LuxS. PLoS ONE, 2015, 10(10): e0138826.
- [19] Valentini M, Filloux A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. J Biol Chem, 2016, 291(24): 12547–12555.
- [20] Galperin MY. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. Environ Microbiol, 2004, 6(6): 552–567.
- [21] Díaz M, Castro M, Copaja S, et al. Biofilm Formation by the acidophile bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* involves c-di-GMP pathway and Pel exopolysaccharide. Genes, 2018, 9(2): 113.
- [22] Francis VI, Stevenson EC, Porter SL. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett, 2017, 364(11): fnx104.
- [23] Meissner A, Wild V, Simm R, et al. 78 *Pseudomonas aeruginosa* cupA-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate. Environ Microbiol, 2007, 9(10): 2475–2485.
- [24] Rao F, Yang Y, Qi Y, et al. Catalytic Mechanism of Cyclic Di-GMP-specific phosphodiesterase: a Study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2008, 190(10): 3622–3631.
- [25] Kulasekara HD, Ventre I, Kulasekara BR, et al. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. Mol Microbiol, 2005, 55(2): 368–380.
- [26] Irie Y, Starkey M, Edwards AN, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. Mol Microbiol, 2010, 78(1): 158–172.
- [27] Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(50): 20632–20636.
- [28] Hickman JW, Harwood CS. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as ac-di-GMP-responsive transcription factor. Mol Microbiol, 2008, 69(2): 376–389.
- [29] Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. Mol Microbiol, 2007, 65(6): 1474–1484.
- [30] Klockgether J, Tümmler B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. F1000 Res, 2017, 61261.
- [31] Guo XP, Sun YC. New insights into the non-orthodox two component rcs phosphorelay system. Front Microbiol, 2017, 8: 2014.
- [32] Kay E, Humair B, Dénervaud V, et al. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2006, 188(16): 6026–6033.
- [33] Lapouge K, Schubert M, Allain FH, et al. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. Mol Microbiol, 2008, 67(2): 241–253.
- [34] Marden JN, Diaz MR, Walton WG, et al. An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(37): 15055–15060.
- [35] Bordi C, Marie-Cécile L, Ventre I, et al. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Mol Microbiol, 2010, 76(6): 1427–1443.
- [36] Petrova OE, Sauer K. The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA rsmZ through CafA. J Bacteriol, 2010, 192(20): 5275–5288.
- [37] O'Callaghan J, Reen FJ, Adams C, et al. Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs rsmZ and rsmY. Microbiology, 2011, 157(12): 3417–3428.
- [38] Balasubramanian D, Kumari H, Mathee K. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR: an acute-chronic

- switch regulator. *Pathogens & Disease*, 2015, 73(2): 1.
- [39] Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, et al. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev*, 2009, 23(2): 249–259.
- [40] Chambonnier G, Roux L, Redelberger D, et al. The hybrid histidine kinase lads forms a multicomponent signal transduction system with the GacS/GacA two-component system in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genetics*, 2016, 12(5): e1006032.
- [41] Broder UN, Jaeger T, Jenal U. LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16184.
- [42] Miller CL, Romero M, Karna SL, et al. RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 155.
- [43] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 2006, 312(5779): 1526–1530.
- [44] Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in ladS. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e29113.
- [45] Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, et al. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76(1): 46–65.

(本文责编 郝丽芳)