

肉桂酸衍生物对铜绿假单胞菌 PAO1 III 型分泌系统的影响

单金明^{1△} 吴小刚^{2△} 袁小琛² 方力为² 梁翠荣¹ 陈新^{1*} YANG Ching-Hong^{2*}

(1. 常州大学 制药与生命科学学院 江苏 常州 213164)

(2. Department of Biological Sciences, University of Wisconsin-Milwaukee, Wisconsin 53211, USA)

摘要:【目的】铜绿假单胞菌是引起医院获得性感染最常见的条件致病菌，而 III 型分泌系统 (Type III secretion system, TTSS) 是其致病的主要因子之一。本文从合成的 21 个肉桂酸衍生物中筛选影响 TTSS 效应子 (Effector) 产生的化合物，并初步研究其作用机制。【方法】将 TTSS 效应子合成基因 *exoS* 的转录报告质粒 pAT-*exoS* 转入菌株 PAO1 中，获得 PAO1(pAT-*exoS*)。待筛选的化合物与 PAO1(pAT-*exoS*) 菌株共培养 6 h 后，检测 *exoS* 基因的表达，从中筛选影响 *exoS* 基因表达的化合物。【结果】筛选结果表明：21 个化合物中，3 个化合物抑制 *exoS* 基因表达，2 个化合物则促进 *exoS* 基因表达。此外，化合物 TS128、TS143 和 TS160 对菌株生长有明显的抑制作用。Western blot 实验进一步证实筛选得到的化合物 TS108、TS128 和 TS165 可抑制 ExoS 的产生；化合物 TS139 和 TS143 则促进 ExoS 的产生。为进一步研究抑制剂的作用机理，过量表达 TTSS 主要的调控因子 *exsA* 基因可部分消除抑制剂 TS108 和 TS165 的抑制效果；而 *rsmZ rsmY* 双基因突变体 PAO6421 中添加抑制剂 TS108 和 TS165 并不能显著抑制 *exoS* 基因的表达，同样，抑制剂 TS108 和 TS165 也不影响受 Gac/Rsm 信号传导系统调控的群体感应信号分子的产生。【结论】抑制剂 TS108 和 TS165 的作用机制可能主要是影响 *exsA* 基因，从而影响 *exoS* 基因表达及蛋白产量。

关键词: *Pseudomonas aeruginosa*, ExoS, 抑制剂, 诱导剂, III 型分泌系统

The influence of cinnamic acid derivatives on the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

SHAN Jin-Ming^{1△} WU Xiao-Gang^{2△} YUAN Xiao-Chen² FANG Li-Wei²
LIANG Cui-Rong¹ CHEN Xin^{1*} YANG Ching-Hong^{2*}

(1. School of Pharmaceutical and Life Sciences, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China)

(2. Department of Biological Sciences, University of Wisconsin-Milwaukee, Wisconsin 53211, USA)

Abstract: [Objective] *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic human pathogen, possesses a type III secretion system (TTSS) as one of the major virulence factors by which it secretes and translocates

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 21272029)

*通讯作者: 陈新: ✉: xinchen@cczu.edu.cn

YANG Ching-Hong: Tel/Fax: 1-414-2296331; ✉: chyang@uwm.edu

△并列第一作者

收稿日期: 2013-12-20; 接受日期: 2014-03-04; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2014-03-17

effector proteins into human host cells. In this study, five compounds which influence the expression of TTSS were identified from cinnamic acid derivatives. **[Methods]** The transcriptional reporter of *exoS* gene on plasmid pAT-*exoS* was used to monitor the *exoS* expression in the wild type strain PAO1 with the candidate compounds. **[Results]** Among 21 compounds, three compounds decreased the expression of *exoS* gene, whereas two compounds increased the expression of *exoS* gene. In addition, the compounds TS128, TS143 and TS160 showed inhibitory effect in bacterial growth. Western blot assay further showed that the level of ExoS was altered when the medium was added TS108 and TS165. The expression of *exoS* was partly restored to the wild-type when the plasmid p35-*exsA* which containing the *exsA* gene was introduced into PAO1. However, there is no difference of the *exoS* expression in the *rsmY rsmZ* double mutant with inhibitors TS108 and TS165. In addition, the production of *N*-Acyl homoserine lactones, which is positively regulated by the Gac/Rsm signaling pathway, is not affected with the inhibitors TS108 and TS165. **[Conclusion]** Our results suggest that the inhibitors TS108 and TS165 affect the expression of *exoS* through the transcriptional regulator ExsA instead of the Gac/Rsm regulatory pathway.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, ExoS, Inhibitor, Inductor, Type III secretion system

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种广宿主条件病原菌,经常在患有支气管扩张、弥漫性泛细支气管炎、囊性肺纤维化(Cystic fibrosis, CF)等疾病患者的呼吸系统引起继发性感染^[1]。此外,该菌极易定殖在各种侵入式检测仪器 and 人体内人工置留物的表面,形成生物膜,增加了耐药性,给后续治疗带来极大的不便^[2]。目前已知铜绿假单胞菌成功侵染寄主细胞并导致疾病的主要原因之一是其能通过 III 型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)的作用,避免被寄主的巨噬细胞吞噬^[3]。铜绿假单胞菌 TTSS 主要由 3 个蛋白质复合物组成:III 型分泌系统组成元件、转运和定向元件、效应蛋白及其相应的分子伴侣^[4]。到目前为止,铜绿假单胞菌 TTSS 共发现 4 个效应蛋白(ExoS、ExoT、ExoU 和 ExoY),但效应蛋白 ExoS 和 ExoU 不同时存在于一个菌株中^[5]。临床对照研究表明,患者感染表达 TTSS 的铜绿假单胞菌较之对照组有更高的病死率及败血症的发生率^[6]。

前期研究表明铜绿假单胞菌 TTSS 的表达受到多种包括环境因子在内的多种因子精细调控。比如细菌与寄主细胞的相互接触以及细胞外低 Ca^{2+} 可诱导 TTSS 的表达,而代谢压力、DNA 损伤、胞外高 Ca^{2+} 和低渗透压则能抑制其活性^[7]。环境信号也能通过影响 cAMP 在细菌细胞内的水平影响

TTSS:细胞内 cAMP 水平升高,TTSS 活性相应增强。目前已知 cAMP 是以转录调控因子 Vfr 蛋白变构调控的形式作用于铜绿假单胞菌 TTSS 基因,但其真正的作用机制还有待进一步研究^[8]。TTSS 几乎所有的基因都受到转录调控因子 ExsA 的直接调控。ExsA 是 AraC 转录激活因子家族成员之一。在依赖于 ExsA 调控的基因启动子区域都存在一个保守的 ExsA 结合位点(TNAAAANA)^[9]。而 ExsA 活性受到另外 3 个蛋白:EsxC、EsxE 和 EsxD 的反馈调控,目前还不清楚这些蛋白质之间相互作用的机制^[10]。

铜绿假单胞菌 TTSS 基因除了在转录水平受到 ExsA 调控外,该系统还在转录后水平受到 GacS/GacA 系统的调控^[11]。GacS/GacA 系统由感应激酶 GacS 和反应调控因子 GacA 组成。GacS 感应外界条件后自身磷酸化,之后将磷酸基团传递给 GacA。磷酸化的 GacA 则调控下游的相关基因^[12]。*P. aeruginosa* PAO1 中,GacA 主要调控 *rsmY* 和 *rsmZ* 基因的表达。*rsmY* 和 *rsmZ* 基因编码两个非编码的小 RNA (Non-coding small RNA),RsmY 和 RsmZ 可结合转录后调控因子 RsmA,而 RsmA 可促进 TTSS 的表达^[13]。前期研究表明缺失 *gacA* 或 *rsmY(Z)* 基因可明显提高效应子 ExoS 的蛋白水平^[14]。

近年来,由于传统抗生素药物高剂量且不合理

的广泛使用,在临床治疗过程中出现了抗传统抗生素药物的耐药菌株。传统抗生素一般直接杀死病原微生物,其后果是导致细菌抗药性几率的增大。细菌耐药性的不断增强,导致临床治疗的失败,感染的复发,增加死亡的危险性^[15]。TTSS 系统在许多人体及动植物病原菌致病性过程中起到重要作用,而且 TTSS 系统并不是细菌生长所必需的,因此合成筛选抑制 TTSS 系统的化合物成为研发新型抗生素的热点。本实验室前期研究表明肉桂酸类化合物对香豆酸(Coumaric acid, PCA)能明显抑制植物病原细菌 *Dickeya dadantii* 中 TTSS 的表达^[16]。由于 *P. aeruginosa* PAO1 菌株除侵染人类外,也可侵染多种模式植物如拟南芥^[17],因此肉桂酸类化合物可能会影响 PAO1 中 TTSS 的表达。筛选结果发现这些化合物中,一些可抑制 TTSS 的表达,另外一些则可促进 TTSS 的表达。抑制 TTSS 的化合物主要是通过抑制 ExsA 的功能抑制 TTSS 效应子的产生。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

本实验所用的菌株和质粒见表 1。 *P. aeruginosa*

PAO1 及 *Escherichia coli* DH5 α 菌株在 LB 培养基中 37 °C 培养 12–16 h。为诱导菌株 PAO1 TTSS 系统的表达, LB 培养基中添加的 NaCl 和氨三乙酸(Nitritoltriacetic acid, NTA)终浓度分别为 200 mmol/L 和 10 mmol/L。抗生素使用终浓度分别为: 氨苄青霉素(Ap) 50 mg/L, 羧苄青霉素(Cb) 100 mg/L, 庆大霉素(Gm) 10 mg/L。异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)使用终浓度为 100 μ mol/L。

1.2 主要试剂和仪器

基因组 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。DNA 聚合酶、限制性内切酶以及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司。引物由 Fisher 公司合成。其他化学试剂均购自 Sigma 公司。ExoS 多克隆抗体购自 Accurate Chemical & Scientific 公司; α -RNAP 抗体购自 Neoclone 公司; AP 标记的羊抗鸡二抗购自 SouthernBiotech 公司。荧光激活细胞分选仪(Fluorescence-activated cell sorter, FACS), BD 公司; 分光光度计, BioTek 公司。

1.3 DNA 操作

基因组和质粒 DNA、PCR、限制性内切酶反应、DNA 连接反应、DNA 凝胶电泳参照文献[23]。

表 1 本实验所用菌株和质粒 Table 1 Bacteria strains and plasmids used in this study		
菌株或质粒 Strains or plasmids	描述 Description	参考文献或来源 Reference or source
Strains		
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type; Ap ^r	
PAO6421	The <i>rsmY rsmZ</i> double mutant; Ap ^r	[18]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
NTL4(pZLR4)	<i>A. tumefaciens</i> NT1 derivative carrying a <i>traG-lacZ</i> reporter fusion, AHL biosensor; Gm ^r	[19]
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44 lacU169 (ϕ80lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[20]
Plasmids		
pPROBE-AT	Promoter-probe vector; Cb ^r	[21]
pAT-exoS	pPROBE-AT containing a 510-bp fragment containing <i>exoS</i> promoter region; Cb ^r	[16]
pPSV35	Shuttle vector, <i>lacI</i> _q , and the <i>lacUV5</i> promoter and MCS of pUC18; Gm ^r	[22]
p35-exsA	pPSV35 containing the <i>exsA</i> gene; Gm ^r	This study

注: Ap^r: 氨苄青霉素; Cb^r: 羧苄青霉素; Gm^r: 庆大霉素。

Note: Ap^r: Ampicillin; Cb^r: Carbenicillin; Gm^r: Gentamicin.

1.4 *exsA* 基因的克隆

克隆 *exsA* 基因方法如下:以 *P. aeruginosa* PAO1 基因组为模板,利用引物 *exsA*-*Xba*I/*exsA*-*Hind* III (5'-AGTCTAGAATCAGCGCACGTCGGAT AATC-3'和 5'-ACTAAGCTTCTCGGGAGTACTGC TTATCG-3',下划线分别为 *Xba*I 和 *Hind* III 位点) PCR 扩增 *exsA* 基因。所得片段用 *Xba*I 和 *Hind* III 酶切,与经 *Xba*I 和 *Hind* III 酶切的 pPSV35 连接得到 *exsA* 基因过表达载体 p35-*exsA*。然后将获得的载体利用电击的方法转入野生型 PAO1 中。

1.5 肉桂酸衍生物的配制

化合物 TS108 和 TS109 购自 Alfa Aesar 公司, TS116-TS119、TS128、TS137-TS147、TS160、TS161 和 TS165 由本实验室合成,具体方法参照文献[24]。将各化合物溶解于二甲基亚砜(DMSO)至终浓度为 0.1 mol/L, -20 °C 保存备用。

1.6 影响菌株 PAO1 TTSS 化合物的筛选

将含有 *exoS-gfp* 转录报告质粒 pAT-*exoS* 的菌株 PAO1 在 LB 培养液中培养过夜后,按 1:1 000 稀释到新鲜的 TTSS 诱导培养液中。然后将化合物添加到 TTSS 诱导培养液中,其终浓度为 250 μmol/L (以 DMSO 为对照)。然后将添加有化合物的细菌培养液于 37 °C 继续培养 6 h。细菌培养液用 PBS 溶液稀释后,用 FACS 检测荧光强度。

1.7 细菌生长的测定

菌株 PAO1 于 LB 培养液中过夜培养后,按 1:1 000 稀释到 TTSS 诱导培养液中。然后将化合物(终浓度为 250 μmol/L)添加到 TTSS 诱导培养液中,培养 6 h 后,用分光光度计检测 OD_{600} 数值。

1.8 Western blot 检测 ExoS 蛋白水平

菌株 PAO1 于 LB 培养液中过夜培养后,按 1:1 000 稀释到 TTSS 诱导培养液中。然后将化合物(终浓度为 250 μmol/L)添加到 TTSS 诱导培养液中,培养 6 h 后,取样。蛋白样品经浓缩胶为 5%、分离胶为 12.5%的 SDS-PAGE 电泳后,用 Bio-Rad 半干转膜仪转膜,将 PAGE 胶上的蛋白样品转移到

PVDF 膜中。经 5%脱脂奶粉封闭过夜后,添加 ExoS 抗体(1:5 000 稀释)继续反应 1 h, PBST 洗 3 次;加入二抗(1:5 000 稀释),室温反应 1 h, PBST 洗 3 次。将 PVDF 膜浸泡在 AP 反应液(100 mmol/L Tris, pH 9.5; 100 mmol/L NaCl; 50 mmol/L MgCl₂)中 5 min 即可检测 ExoS 蛋白水平。

1.9 *N*-乙酰高丝氨酸内酯(*N*-Acylhomoserine lactone, AHL)的提取及检测

用于提取群体感应系统信号分子 AHL 的 *P. aeruginosa* PAO1 及其不同处理在 28 °C 培养过夜后,将培养上清液用等体积的乙酸乙酯萃取,萃取物旋转蒸发后重新溶解于 0.1 mL 的甲醇中。定量检测 AHL 时,将 5 μL 样品加到 AHL 报告菌 *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4)检测平板上,28 °C 培养过夜。具体方法参照文献[19]。

2 结果与分析

2.1 筛选影响 *P. aeruginosa* PAO1 菌株 TTSS 的肉桂酸衍生物

本实验中使用的化合物包括了水杨酸(Salicylic acid, SA)、SA 前体以及其类似物。它们的化学结构式见图 1 或见文献[24]。以含有转录融合结构 *exoS-gfp* 的菌株 PAO1 为报告菌株,从 21 个化合物中筛选得到 3 个可显著抑制 *exoS* 基因表达的化合物(TS108、TS128 和 TS165);2 个可显著促进 *exoS* 基因表达的化合物(TS139 和 TS143),见表 2。

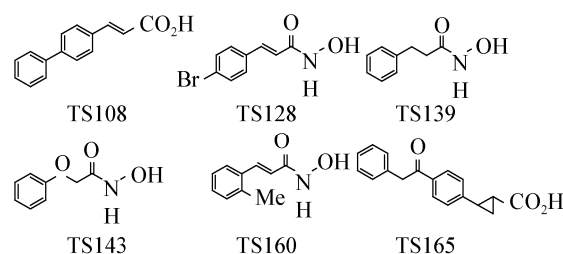


图 1 本文中使用的肉桂酸衍生物结构式
Figure 1 The cinnamic acid derivatives used in this study

表 2 *P. aeruginosa* PAO1 中 TTSS 抑制剂和诱导剂的筛选
Table 2 Screening of inhibitors and inducers of *P. aeruginosa* PAO1 TTSS

化合物 Chemical compound	<i>exoS-gfp</i> 转录报告融合子的表达(MFI) <i>exoS-gfp</i> expression (MFI)
Control (DMSO)	704.91±55.39
<i>trans</i> -4-Phenylcinnamic acid (TS108)	247.31±22.92*
<i>trans</i> -4-Chlorocinnamaide (TS109)	726.88±74.82
<i>N</i> -(<i>para</i> -Coumaryl)phthalimide (TS116)	624.33±17.78
<i>para</i> -Coumarylamine (TS117)	674.95±30.68
<i>N</i> -(4-Methoxycinnamyl)phthalimide (TS118)	587.05±20.15
<i>trans</i> -4-Methoxycinnamylamine (TS119)	780.86±35.94
<i>trans</i> -4-Bromocinnamohydroxamic acid (TS128)	351.97±178.33*
<i>N</i> -Methyl-4-hydroxycinnamamide (TS137)	681.46±24.95
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-4-hydroxycinnamamide (TS138)	645.75±5.65
3-Phenylpropionohydroxamic acid (TS139)	998.03±23.86*
<i>trans</i> -4-Phenylcinnamohydroxamic acid (TS140)	699.96±11.20
<i>trans</i> -4-Fluorocinnamohydroxamic acid (TS141)	712.97±21.94
<i>trans</i> -4-Methylcinnamohydroxamic acid (TS142)	633.24±10.46
2-Phenoxyacetohydroxamic acid (TS143)	1 473.29±81.89*
4-Hydroxybenzoic acid (TS144)	696.35±50.99
3-Hydroxybenzoic acid (TS145)	829.71±44.58
<i>trans</i> -4-Formylcinnamohydroxamic acid (TS146)	831.13±14.24
<i>trans</i> -4-Hydroxymethylcinnamohydroxamic acid (TS147)	752.43±42.41
<i>trans</i> -2-Methylcinnamohydroxamic acid (TS160)	850.26±12.31
<i>trans</i> -3-(2-Thienyl)acrylcinnamohydroxamic acid (TS161)	877.11±12.58
2-[4'-Benzylcarbonyl]phenylcyclopropan-1-carboxylic acid (TS165)	292.64±12.77*

注：菌株 PAO1(pAT-*exoS*)生长于含有待测化合物(终浓度 250 μmol/L)的 TTSS 诱导培养液中，培养 6 h 后用 FACS 检测荧光强度。
Note: Strain PAO1(pAT-*exoS*) was cultured in the TTSS inducing medium with 250 μmol/L indicated compounds or DMSO as control. All experiments were performed in twice, and the value is statistically significantly different from that for the DMSO control ($P<0.05$, Student's t test).

2.2 肉桂酸衍生物对菌株 PAO1 生长的影响

为研究待测化合物是否影响菌株 PAO1 的生长，本文检测了菌株 PAO1 在添加化合物后 6 h 的 OD_{600} 值。结果发现这 21 个化合物中，化合物 TS128、TS143 和 TS160 可明显抑制菌株 PAO1 的生长，而其他化合物并不显著影响菌株的生长(图 2)。

2.3 肉桂酸衍生物影响 PAO1 ExoS 蛋白的产量
为验证筛选得到的 5 个化合物对 *exoS* 基因表

达的影响，本文利用 Western blot 检测添加化合物后菌株中胞内 ExoS 蛋白含量。Western blot 实验结果表明，添加 TS108、TS128 和 TS165 后，菌株 PAO1 胞内 ExoS 蛋白水平明显降低；而添加 TS139 和 TS143 后，菌株 PAO1 胞内 ExoS 蛋白水平明显提高(图 3)。以 RNA 聚合酶 亚基(α -RNAP)多克隆抗体检测各处理蛋白质上样量，结果发现各处理之间没有显著性差异(图 3)。这些结果表明利用 *exoS-gfp*

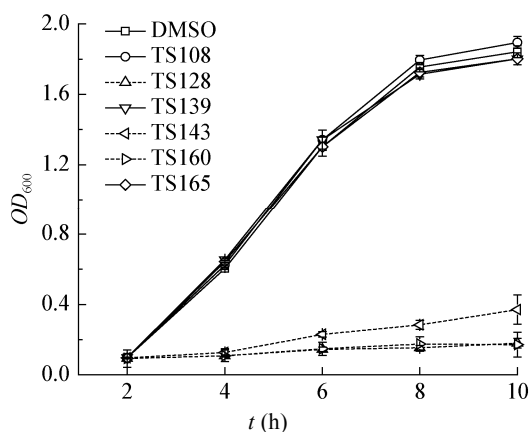


图2 肉桂酸衍生物影响菌株 PAO1 生长

Figure 2 The growth of PAO1 was changed when the compounds were added into the medium

注：菌株 PAO1 生长于含有待测化合物(终浓度 250 $\mu\text{mol/L}$)的 TTSS 诱导培养液中，于 OD_{600} 检测菌株生长情况。

Note: *P. aeruginosa* PAO1 strain was grown in TTSS induction medium supplemented with 250 $\mu\text{mol/L}$ compounds, and the growth was measured at OD_{600} . The same volume of DMSO was added into the medium as a negative control. All experiments were performed in triplicate, and the $x \pm s$ are indicated.

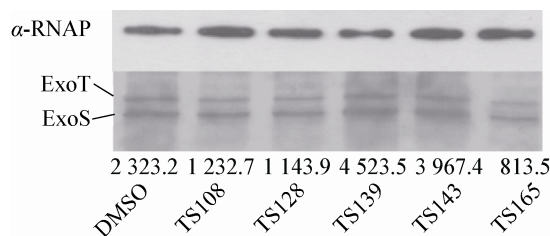


图3 肉桂酸衍生物影响菌株 PAO1 ExoS 蛋白的产量

Figure 3 The secretion level of TTSS effector ExoS was changed by the inhibitors or inducers

注：菌株 PAO1 生长在 TTSS 诱导培养基中，并将化合物(终浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$)添加到 TTSS 诱导培养液中，添加等体积 DMSO 为参照。使用 ExoS 多克隆抗体检测菌株 PAO1 中 ExoS 蛋白的产量，以 RNA 聚合酶 β 亚基多克隆抗体检测蛋白上样量。

Note: *P. aeruginosa* PAO1 strain was grown in LB broth supplemented with 10 mmol/L NTA, and 250 $\mu\text{mol/L}$ compounds. The same volume of DMSO was added into the medium as a negative control. The Western blot was performed using an anti-ExoS polyclonal antibody. Numbers below the figure indicate the relative intensity of secreted ExoS measured by Image J. An antibody directed against RNA polymerase β subunit (α -RNAP) is used as a loading control.

转录融合结构筛选得到的化合物影响到效应子合成基因 *exoS* 的表达，进而影响 ExoS 蛋白产量。

2.4 过量表达 *exsA* 基因可部分恢复抑制剂对 *exoS* 基因的抑制作用

由于筛选得到的肉桂酸衍生物 TS128 影响菌株 PAO1 的生长，因此将来在临床应用的过程中容易产生抗药性；而化合物 TS139 和 TS143 则促进 TTSS 效应子的产生，并不是本文的目的，因此本文仅选用化合物 TS108 和 TS165 作为靶标进一步研究其抑制机理。首先本文将 TTSS 全局性转录调控因子基因 *exsA* 克隆到可受 IPTG 诱导表达的穿梭载体 pPSV35，获得质粒 p35-*exsA*，并将该质粒转入菌株 PAO1(pAT-*exoS*)中。添加抑制剂后，检测 *exoS* 基因的表达。结果发现添加抑制剂 TS108 和 TS165 后，过量表达 *exsA* 能提高 *exoS* 基因的表达，但其表达量低于添加 DMSO 的对照处理(图 4)。

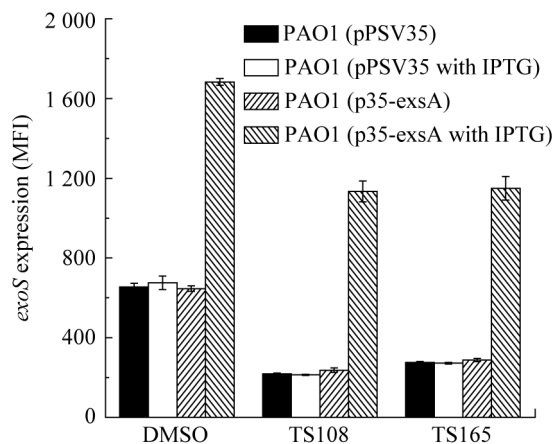


图4 过量表达 *exsA* 基因影响抑制剂的抑制作用

Figure 4 The expression of *exoS* was partly restored when overexpression of *exsA* gene with TS108 and TS165

注：将含有质粒 pPSV35 和 p35-*exsA* 的菌株 PAO1 在添加有抑制剂的 TTSS 诱导培养基培养 6 h 后，测定 *exoS* 基因的表达。等量 DMSO 添加到培养基中作内参。如果需要添加 IPTG，其终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

Note: Promoter activities of *exoS* in *P. aeruginosa* PAO1 carrying empty vector pPSV35 and the plasmid p35-*exsA* with the inhibitors TS108 and TS165. The same volume of DMSO was added into the medium as a negative control. Values of mean fluorescence intensity (MFI) are an average GFP fluorescence intensity of total bacterial cells with SD. Strain information and whether cultures were induced with IPTG (100 $\mu\text{mol/L}$ final concentration) are indicated in the graph.

2.5 *rsmY rsmZ* 双突变菌株中添加抑制剂对 *exoS* 基因的调控作用

除受到 *exsA* 基因的直接调控外, *exoS* 的表达也受到双因子调控系统 GacS/GacA 转录后水平调控。GacS/GacA 直接调控小 RNA 合成基因 *rsmY* 和 *rsmZ* 的表达。本文进一步研究 *rsmY rsmZ* 双突变菌株 PAO6421 中添加抑制剂对 *exoS* 基因表达的影响。结果发现, 与野生菌株 PAO1 相比, 突变 *rsmY* 和 *rsmZ* 基因可显著提高 *exoS* 基因的表达; 然而 *rsmY rsmZ* 双突变菌株 PAO6421 中添加抑制剂 TS108 和 TS165, 并不能降低 *exoS* 基因的表达(图 5)。前期研究表明 Gac/Rsm 调控系统调控群体感应系统信号分子 AHL 的产生^[25], 为检测这两个抑制剂是否影响调控蛋白 RsmA 的功能, 本文利用报告菌 *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4)检测了各处理信

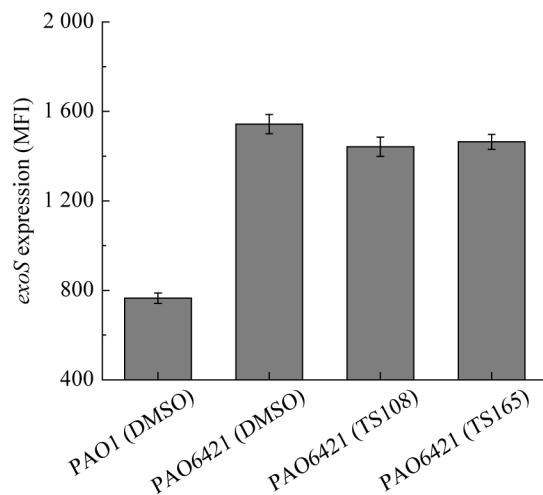


图 5 *rsmY rsmZ* 双突变体中检测抑制剂对 *exoS* 基因表达的影响

Figure 5 Promoter activities of *exoS* in *P. aeruginosa* PAO1 and the *rsmY rsmZ* double mutant PAO6421 with the inhibitors TS108 and TS165

注: 将含有质粒 pAT-*exoS* 的菌株 PAO1 和 *rsmY rsmZ* 双突变体在含有抑制剂的 TTSS 诱导培养基培养 6 h 后, 测定 *exoS* 基因的表达。等量 DMSO 添加到培养基中作内参。

Note: Promoter activities of *exoS* in *P. aeruginosa* PAO1 and the *rsmY rsmZ* double mutant PAO6421 with the inhibitors TS108 and TS165. The same volume of DMSO was added into the medium as a negative control. Values of mean fluorescence intensity (MFI) are an average GFP fluorescence intensity of total bacterial cells with SD.

号分子 AHL 的产量。同样, 添加抑制剂 TS108 和 TS165 也不影响 AHL 的产生; 而同时突变 *rsmY* 和 *rsmZ* 基因则显著降低其 AHL 的产生(图 6)。这些结果表明抑制剂 TS108 和 TS165 可能不通过 Gac/Rsm 信号传导系统影响 *exoS* 基因的表达。

3 讨论

许多动物或植物病原菌中 TTSS 是关键毒性决定因子, 由于其在结构上相对保守, 近年来已成为新药开发的研究热点之一。肉桂酸衍生物是植物产生的主要次生代谢物质, 目前已经鉴定的植物肉桂酸衍生物大约有一万多种, 这些化合物在植物生长、植物再生以及抗病性等生理过程中起到重要作用^[26]。前期研究表明对香豆酸及其衍生物可抑制植物病原菌 *D. dadantii* 和 *Erwinia amylovora* TTSS 的表达, 并影响 *E. amylovora* 对植物过敏性坏死反应^[22-23]。本研究中从 21 个肉桂酸衍生物中

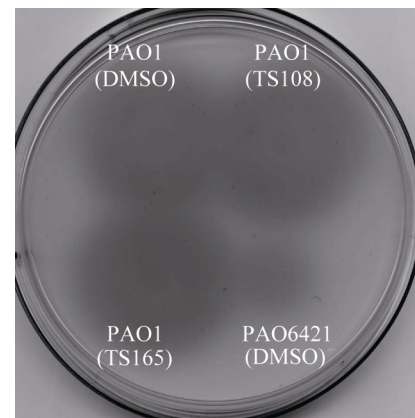


图 6 菌株 PAO1 及 *rsmY rsmZ* 双突变体 PAO6421 中检测信号分子 AHL 的产生

Figure 6 The production of AHL in *P. aeruginosa* PAO1 and the *rsmY rsmZ* double mutant with the inhibitors TS108 and TS165

注: 将提取的 5 μ L AHL 样品加到报告菌 *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4)检测平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养过夜。通过观察平板上蓝色斑点的直径大小判断 AHL 产量的多少。

Note: The AHL produced by PAO1 and the *rsmY rsmZ* double mutant PAO6421 with the inhibitors TS108 and TS165 were extracted and loaded onto the plate containing *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). The plate was incubated at 28 $^{\circ}$ C overnight. AHL activities were determined by the appearance of blue spots on the plate.

发现有 3 个 TTSS 抑制剂(TS108、TS128 和 TS165) 和 2 个 TTSS 诱导剂(TS139 和 TS143), 表明这些化合物也参与影响 *P. aeruginosa* PAO1 中 TTSS (表 2)。

在筛选化合物的过程中发现, 3 个抑制剂中 TS128 抑制菌株 PAO1 的生长, 另外 2 个诱导剂中 TS143 也抑制该菌的生长(图 2)。前期研究表明, 很多肉桂酸类化合物及其衍生物可通过影响细菌细胞通透性、抑制细菌核糖体延伸等机制抑制细菌的生长^[27], 这表明化合物 TS128 和 TS143 可能通过上述途径影响菌株 PAO1 的生长。进一步分析抑制剂 TS128 和诱导剂 TS143 化学结构式发现(图 1), 这两种化合物在结构上有明显差别: TS128 是共扼体系, 而 TS143 是非共扼体系(没有共扼双键), 表明这两种化合物可能利用不同的官能团抑制细菌的生长。另外化合物 TS160 虽然不影响 *exoS* 基因的表达(表 2), 但也抑制细菌生长(图 2)。分析 TS160 化学结构式发现, 其与 TS128 的化学结构式类似: 二者都是肉桂羟肟酸衍生物(有共扼双键、取代芳基和羟基酰胺基团, 图 1), 因此 TS160 和 TS128 可能利用相同的作用机理抑制菌株 PAO1 的生长。另一方面, 我们的前期工作发现, 化合物 TS160 可显著抑制病原菌 *E. amylovora* 273 中 TTSS 的表达^[24]。由于 *P. aeruginosa* PAO1 与 *E. amylovora* 273 调控 TTSS 的分子机制不同^[4,24], 因此化合物 TS160 可能通过不同的调控因子影响菌株 *E. amylovora* 273 TTSS 的表达。

前期研究表明, GacS/GacA 双因子调控系统转录后水平调控 TTSS, 突变受 GacA 调控的两个小 RNA 分子 RsmY 和 RsmZ 能提高 TTSS 相关基因的表达(图 5)。本文结果发现, 添加抑制剂 TS108 和 TS165 可降低 ExoS 蛋白的产量(图 3), 但 *rsmY* *rsmZ* 双突变菌株中添加这两个抑制剂并不影响 *exoS* 基因的表达(图 5)。同时检测群体感应信号分子 AHL 发现, 添加化合物 TS108 和 TS165 不影响 AHL 的产量(图 6), 这些结果表明抑制剂 TS108 和 TS165 并不通过 Gac/Rsm 信号调控途径影响菌株

PAO1 中 TTSS。前期研究表明转录调控因子 ExsA 转录水平调控多个 TTSS 结构编码蛋白及其效应因子。本文中过量表达 *exsA* 基因可显著提高 *exoS* 基因的表达(图 4)。虽然添加抑制剂 TS108 和 TS165 可抑制 *exoS* 基因的表达, 但过量表达 *exsA* 基因只能部分消除抑制剂 TS108 和 TS165 对 *exoS* 基因的抑制作用(图 4)。这些结果表明抑制剂 TS108 和 TS165 可能通过影响 *exsA* 基因的表达, 从而调控 *exoS* 基因的表达。值得注意的是, 添加抑制剂 TS108 和 TS165 条件下, 即使过量表达 *exsA* 基因还不足以完全恢复 *exoS* 基因的表达, 因此抑制剂 TS108 和 TS165 可能还通过影响其他 TTSS 的调控因子影响 PAO1 中 *exoS* 基因的表达。

综上所述, 本文从 21 个肉桂酸衍生物中筛选出 3 个抑制菌株 PAO1 TTSS 表达的化合物。这 3 个化合物中 TS108 和 TS165 通过影响 *exsA* 基因的表达, 进而影响 *exoS* 基因。下一步的研究工作将对化合物 TS108 和 TS165 进行修饰, 筛选对 TTSS 抑制作用影响更强的新衍生物。

参 考 文 献

- [1] Pier GB. CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection[J]. Current Opinion in Microbiology, 2002, 5(1): 81-86.
- [2] Mikuniya T, Kato Y, Ida T, et al. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2007, 13(5): 285-290.
- [3] Desvaux M, Hébrauda M, Henderson IR, et al. Type III secretion: what's in a name?[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(4): 157-160.
- [4] Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009(7): 654-665.
- [5] Fleiszig SM, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and incision correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(2): 579-586.
- [6] Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT[J]. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 2004, 152: 79-92.
- [7] Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(3): 631-640.

- [8] Wolfgang MC, Lee VT, Gilmore ME, et al. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway[J]. *Developmental Cell*, 2003, 4(2): 253-263.
- [9] Kim J, Ahn K, Min S, et al. Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 2005, 151(11): 3575-3587.
- [10] Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, et al. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(23): 13899-13904.
- [11] Heeb S, Haas D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(12): 1351-1363.
- [12] Blumer C, Heeb S, Pessi G, et al. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(24): 14073-14078.
- [13] O'Grady EP, Mulcahy H, O'Callaghan J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection of airway epithelial cells modulates expression of Kruppel-like factors 2 and 6 via RsmA-mediated regulation of type III exoenzymes S and Y[J]. *Infect and Immunity*, 2006, 74(10): 5893-5902.
- [14] Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, et al. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(1): 172-176.
- [15] Duncan MC, Linington RG, Auerbuch V. Chemical inhibitors of the type three secretion system: disarming bacterial pathogens[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(11): 5433-5441.
- [16] Yamazaki A, Li J, Zeng Q, et al. Derivatives of plant phenolic compound affect the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* via a GacS-GacA two-component signal transduction system[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(1): 36-43.
- [17] Walker TS, Bais HP, Déziel E, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 320-331.
- [18] Kay E, Humair B, Dénervaud V, et al. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(16): 6026-6033.
- [19] Cha C, Gao P, Chen YC, et al. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(11): 1119-1129.
- [20] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1983, 166(4): 557-580.
- [21] Miller WG, Leveau JH, Lindow SE. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(11): 1243-1250.
- [22] Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, et al. ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(22): 8006-8011.
- [23] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [24] Khokhani D, Zhang CF, Li Y, et al. Discovery of plant phenolic compounds that act as type III secretion system inhibitors or inducers of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(18): 5424-5436.
- [25] Pessi G, Williams F, Hindle Z, et al. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinates and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(22): 6676-6683.
- [26] Li Y, Peng Q, Selimi D, et al. The plant phenolic compound *p*-coumaric acid represses the *Dickeya dadantii* type III secretion system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(5): 1223-1228.
- [27] Rocio GL, Gabriel M, Mariza G, et al. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(8): 3400-3419.