



咖啡酸对铜绿假单胞菌群体感应抑制探究

宋文旭¹,冯玉琦¹,韩啸枫¹,王世伟¹,徐翠香²,张海祥²,沈立新¹

(1. 西北大学 生命科学学院,陕西 西安 710069;2. 陕西省人民医院 陕西省感染与免疫疾病重点实验室,
陕西 西安 710068)

摘要 世界范围内,病原菌对抗生素的耐药性日趋严峻,但药物研发效率日趋缓慢,迫切需要新的抗感染药物或药物作用靶点。铜绿假单胞菌群体感应系统(quorum sensing, QS)与其致病性密切相关,寻找靶向QS系统的抑制剂是新型抗感染药物新策略。前期研究发现,以咖啡酸为主要成分的大血藤提取物对铜绿假单胞菌的群体感应具有转录抑制作用。进一步探究了咖啡酸对铜绿假单胞菌的QS系统相关基因的表达和毒性因子产生的抑制作用;通过分子对接结合缺失突变体感染白菜模型检测,探究了咖啡酸的作用靶点。结果表明:咖啡酸显著抑制铜绿假单胞菌QS系统相关基因*rhlR*、*rhlI*、*pqsA*、*pqsR*及其调控的毒性因子的编码基因如*phzA1*、*lasB*等,进一步抑制该类毒性因子的产生和降低了细菌的运动性和生物被膜,最终降低了铜绿假单胞菌的感染性,其可能通过靶向*pqs*系统发挥其QS抑制作用。

关键词 咖啡酸;铜绿假单胞菌;群体感应系统;毒力因子靶点;*pqs*

中图分类号:R378 **DOI**:10.16152/j.cnki.xdxbzr.2024-05-009

The inhibitory effect of caffeic acid on *Pseudomonas aeruginosa* QS system and its target

SONG Wenxu¹, FENG Yuqi¹, HAN Xiaofeng¹, WANG Shiwei¹,
XU Cuixiang², ZHANG Haixiang², SHEN Lixin¹

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Infection and Immune Diseases, Shaanxi Provincial
People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract Antimicrobial resistance (AMR) of bacteria has increased worldwide dramatically and the development of new antibiotics has been slowed down. Therefore, it is urgent to explore new anti-infective drugs or therapeutics. Quorum sensing (QS) system of pathogen is closely related to its pathogenicity. QS system inhibitors could significantly reduce the pathogenicity of pathogen. QS system is mainly composed of *las*, *rhl*, and *pqs* systems and *Sargentodoxae Caulis* extracts mainly containing caffeic acid which has shown QSI activity. In this study, we proved the antivirulence and antipathogenicity of caffeic acid against *Pseudomonas aeruginosa* at the transcript and product level, then we further investigate the target of caffeic acid in QS system by using molecular docking combining the mutant strains determination. The results indicated that caffeic acid

收稿日期:2024-08-08

基金项目:陕西省自然科学基金(2018ZDXM-SF-004);陕西化生基础科学研究项目(22JHZ008);陕西省感染与免疫疾病重点实验室开放基金(2023-KFZD-3)。

第一作者:宋文旭,女,从事群体感应抑制剂开发相关研究,songwenxu@stumail.nwu.edu.cn。

通信作者:沈立新,女,博士,教授,从事病原微生物致病及耐药机制等研究,shenlx@nwu.edu.cn。

could reduce the expression of QS-related genes *rhlR*, *rhlI*, *pqsA*, *pqsR* as well as virulence related genes such as *phzA1*、*lasB*. Motility ability and biofilm were also suppressed obviously by caffeic acid. Chinese cabbage and fruit fly infection model analysis verified the antipathogenicity of caffeic acid. Caffeic acid might inhibit QS system by targeting the *pqs* system based on the docking analysis and gene mutant strains evaluation on caffeic acid.

Keywords caffeic acid; *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing system; virulence factors target site; *pqs*

铜绿假单胞菌是一种自然环境中常见的革兰氏阴性条件致病菌^[1], 通常容易在免疫力低下患者、特别是囊性纤维化患者和烧伤患者中引起各种急性和慢性感染^[2-3]。铜绿假单胞菌对多种甚至新发现的抗生素具内在及获得性耐药, 导致其感染治疗效率低下, 患者死亡率不断升高, 发现新的抗铜绿假单胞菌感染药物或治疗靶点迫在眉睫^[4]。

铜绿假单胞菌 QS 系统在铜绿假单胞菌的致病性和耐药性中具有重要作用^[5]。铜绿假单胞菌的 QS 系统包括 *las*、*rhl* 和 *pqs* 系统^[6], 其中 *las* 系统对弹性蛋白酶、蛋白水解酶具有直接调节作用^[7], *rhl* 系统对绿脓菌素具有调节作用^[8], *pqs* 系统对生物被膜的形成以及绿脓菌素、鼠李糖脂等多种毒性因子具有调节作用^[6]。生物被膜在铜绿假单胞菌的慢性感染和耐药性中具重要地位^[9], 群集运动、泳动、蹭行等运动及胞外蛋白酶、绿脓菌素是铜绿假单胞菌抵达感染位点、定植及急性感染中主要致病因子^[10-11]。通过抑制铜绿假单胞菌的 QS 系统, 从而在不影响细菌生长的情况下降低其相关毒性因子的表达及后续致病

性, 成为一种独辟的不同于杀死或抑制细菌生长的新方法, 该抑制物被称为群体感应抑制剂^[12]。

咖啡酸已被证明具有抗菌、抗病毒的作用^[13-14]。前期研究发现, 中药大血藤的水提物对铜绿假单胞菌 QS 系统具有显著抑制作用, 咖啡酸是大血藤的主要成分。本研究对咖啡酸对铜绿假单胞菌的 QS 系统及其调控相关基因的转录、产物表达等进行了研究, 发现其具有显著的抑制作用; 进一步通过白菜感染模型和果蝇感染模型验证了其对铜绿假单胞菌的感染性的控制作用, 分子对接结果显示咖啡酸与铜绿假单胞菌 QS 系统中的 PqsR 蛋白具有较强结合作用, 相关突变体侵染试验结果显示咖啡酸可能作用于 *pqs* 系统发挥 QSI 作用。因此, 咖啡酸是一种潜在的铜绿假单胞菌感染临床治疗前导药物, 在未来有可能作为一种抗生素代替药物来对抗细菌感染。

1 菌株、仪器与试剂

1.1 菌株和质粒

本文使用的菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 本研究使用的菌株和质粒
Tab. 1 The strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	描述	来源
菌株		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	野生型铜绿假单胞菌	本实验室
PAO1 (Δ <i>lasR</i>)	PAO1 <i>lasR</i> 基因敲除突变体	本实验室
PAO1 (Δ <i>rhlR</i>)	PAO1 <i>rhlR</i> 基因敲除突变体	本实验室
PAO1 (Δ <i>pqsR</i>)	PAO1 <i>pqsR</i> 基因敲除突变体	本实验室
质粒		
pMS402	携带无启动子的 lux-CDABE 报告质粒	本实验室
pKD- <i>rhlR</i>	携带 <i>rhlR</i> 启动子的 pMS402 质粒	本实验室
pKD- <i>rhlI</i>	携带 <i>rhlI</i> 启动子的 pMS402 质粒	本实验室
pKD- <i>pqsR</i>	携带 <i>pqsR</i> 启动子的 pMS402 质粒	本实验室
pKD- <i>pqsA</i>	携带 <i>pqsA</i> 启动子的 pMS402 质粒	本实验室
pKD- <i>lasB</i>	携带 <i>lasB</i> 启动子的 pMS402 质粒	本实验室
pKD- <i>phzA1</i>	携带 <i>phzA1</i> 启动子的 pMS402 质粒	本实验室

1.2 实验仪器

本研究使用的仪器如下: Synergy H1 多功能酶标仪 (美国 Biotek)、WFJ7200 型分光光度计

(美国 Unico)、Z 326 K 离心机 (德国 Hermle)、恒温摇床 (上海智城分析仪器制造公司)、GHP-980 隔水式恒温培养箱 (上海齐欣科学仪器有限公

司)、SW-CJ-IF 型超净工作台(苏净安泰)、DK-2000-3L 型水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.3 试剂和培养基

1.3.1 试剂

甲氧苄啶(Tmp)、二甲亚砜(DMSO)购于美国 sigma 公司;氯仿、浓盐酸、无水乙醇购于天津富宇精细化工有限公司;硫酸镁、氯化钠、氢氧化钠、结晶紫购于天津科密欧化学试剂有限公司;蛋白胨、酵母粉、脱脂奶粉、营养肉汤培养基、葡萄糖、蔗糖、琼脂粉购于生工生物工程(上海)股份有限公司,以上试剂和培养基均为分析纯。本研究所用试剂浓度均为体积分数。

1.3.2 培养基

1) Luria-Bertani(LB)培养基:蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、氯化钠 10 g,溶于 1 L ddH₂O 调 pH 为 7.2~7.4,灭菌后用于后续试验。

2) 运动培养基。

i) 泳动(g/L):10 g 蛋白胨、5 g 氯化钠,调溶液 pH 至 7.2~7.4 后加入 3 g 琼脂粉,121 ℃ 灭菌 20 min。

ii) 群集运动(g/L):8 g 营养肉汤培养基、5 g 葡萄糖,调溶液 pH 至 7.2~7.4 后加入 5 g 琼脂粉,115 ℃ 灭菌 30 min。

iii) 蹭行(g/L):固体 LB 培养基。

2 实验方法

2.1 铜绿假单胞菌培养

从牛奶管接 PAO1 及 PAO1($\Delta lasR$)、PAO1($\Delta rhIR$)、PAO1($\Delta pqsR$)于 LB 固体平板划线,其他菌株于含有 Tmp 抗性的平板划线,37 ℃ 培养 24 h 进行菌株复苏。挑 PAO1 及 PAO1($\Delta lasR$)、PAO1($\Delta rhIR$)、PAO1($\Delta pqsR$)单克隆于 LB 液体培养基 37 ℃,200 r/min 过夜培养,其余突变菌株单克隆于含有 Tmp 的液体 LB 中 37 ℃,200 r/min 过夜培养,用于进行后续试验。

2.2 铜绿假单胞菌 MIC 测定

根据 CLSI 中所提供的方法并稍做修改^[15],在 96 孔板根据菌液的浑浊度测定 PAO1 的 MIC。过夜培养的铜绿假单胞菌转接 1% 到新鲜液体 LB 中 37 ℃ 活化 3 h,接种 5 μ L 活化后的菌液加入含有新鲜 LB 和不同浓度咖啡酸的 96 孔板中,使得每孔总体积为 100 μ L,最后加入 50 μ L 石蜡防止液体挥发。用酶标仪每 30 分钟测定一次

OD₆₀₀,持续 24 h。

2.3 咖啡酸对 QS 系统核心基因的影响

利用含有荧光素酶基因 lux-CDABE 的质粒来构建目的基因启动子发光报道子菌株,根据发光报道菌株的化学发光情况(CPS)检测 PAO1 中目的基因的表达^[16]。具体检测步骤如下:首先,转接 50 μ L 过夜摇的发光报道菌株于 5 mL 含有 37.5 μ L Tmp 的液体培养基,37 ℃,200 r/min 活化 3 h;其次,在 96 孔板中每孔加入不同浓度的咖啡酸和新鲜 LB,使其总体积为 95 μ L,对照组用 DMSO 代替,然后每孔加入 5 μ L 活化后的菌液;最后,加入 50 μ L 石蜡防止液体挥发,使用酶标仪于 37 ℃ 进行 24 h 发光检测,每 30 min 检测一次 CPS。

2.4 咖啡酸对铜绿假单胞菌毒性因子作用

2.4.1 生物被膜

结晶紫染色法测定生物被膜产量^[17]。过夜培养 PAO1 调至 OD₆₀₀为 0.5。取 30 μ L 菌液分别加入到已配好 3 mL LB 和不同浓度药物的培养基中,37 ℃ 静置培养 24 h 后弃去管内菌液,用 PBS 洗涤除去残余菌液后加入结晶紫进行染色。30 min 后弃去试管内结晶紫,并用 ddH₂O 清洗,观察染色情况,最后用 1 mL 95% 乙醇洗下生物被膜后测定 OD₅₉₅。

2.4.2 绿脓菌素

取 50 μ L 过夜培养 PAO1 接种于含有不同浓度药物的 5 mL LB 中,37 ℃,200 r/min 培养 16 h,8 000 r/min 离心 5 min。取上清并加入等体积的氯仿,振荡混匀后 8 000 r/min 离心 10 min,将氯仿相取出并加入 1 mL 0.2 mol/L 的 HCl 混匀后静置,测定无机相 OD₅₂₀^[18]。

2.4.3 胞外蛋白酶

将 PAO1 过夜培养以后取 50 μ L 接种于含有不同浓度药物的 5 mL LB 中,37 ℃,200 r/min 培养 12 h,8 000 r/min 离心 5 min。取 200 μ L 菌液上清和 800 μ L 2% 脱脂牛奶加入 1.5 mL EP 管中,37 ℃ 水浴锅中孵育 30 min,然后测定混合液的 OD₄₄₀^[19]。

2.4.4 运动

蹭行:培养好的 PAO1 调至 OD₆₀₀为 0.5,将含有不同浓度咖啡酸的蹭行培养基用 200 μ L 枪头从中间穿透,吸取 2 μ L 菌液注入到穿透位置,静置后转移到 37 ℃ 培养箱,培养 24 h,除去培养基后用结晶紫染色观察运动情况。

泳动、群集运动:取 2 μ L OD₆₀₀为 0.5 的菌液点

在含不同浓度药物的培养基中央,静置后平稳转移到 37 ℃ 培养箱,培养 12 h,观察运动情况^[20]。

2.5 咖啡酸对铜绿假单胞菌感染的抑制作用

2.5.1 中国白菜感染模型

经不同浓度咖啡酸处理的 PAO1 过夜培养后收集菌体,用 10 mmol 的 MgSO₄ 重悬至 OD₆₀₀ 为 2.0,将 10 μL 悬液注入表面经 0.1% H₂O₂ 消毒的菜茎中。将菜茎置于含有浸渍了 10 mmol MgSO₄ 的滤纸的无菌培养皿中,30 ℃ 下孵育 6 d,并记录白菜腐烂面积^[21]。

2.5.2 果蝇感染模型

将铜绿假单胞菌与不同浓度的咖啡酸在 LB 肉汤中过夜培养后于 8 000 r/min 离心 5 min,然后用 5% 的蔗糖将菌体重悬至 OD₆₀₀ 为 2.0。将无菌滤纸片覆盖于培养瓶中的灭菌蔗糖琼脂表面,并将 500 μL 重悬后的菌液均匀注射于滤纸片并吹干,取 20 只同期化后的雄性果蝇饥饿处理 3 h 并放于培养瓶中。培养瓶于 25 ℃ 培养 10 d,每 24 h 统计一次存活果蝇数^[22]。

2.6 咖啡酸作用靶点探究

2.6.1 分子对接

从 PDB 蛋白数据库获得铜绿假单胞菌 LasR、LasI、PqsR、PqsA 蛋白的 3D 结构(PDB 格式),用 pymol 对蛋白进行预处理后得到 3D 结构、pubchem 数据库获得咖啡酸的 3D 结构,利用 moe 进行蛋白和小分子的对接及结果分析。

2.6.2 突变体验证

挑突变菌株单克隆 PAO1 (Δ*lasR*)、PAO1

(Δ*rhlR*)、PAO1 (Δ*pqsR*) 于含有不同浓度咖啡酸或 DMSO 的 5 mL 液体 LB 培养基中,于 37 ℃ 200 r/min 过夜培养,8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体。菌体用 10 mmol 的 MgSO₄ 重悬至 OD₆₀₀ 为 2.0 后,取 10 μL 注入到经 0.1% H₂O₂ 消毒的菜茎。菜茎置于含有 10 mmol 的 MgSO₄ 浸润的无菌滤纸的玻璃平皿中,30 ℃ 培育,观察菜茎的腐烂面积。

3 研究结果

3.1 咖啡酸对 QS 系统及相关基因表达的影响

群体感应抑制剂不影响细菌生长,但对群体感应基因及其调控基因等具有抑制作用^[23]。本研究利用酶标仪连续 24 h 检测 37 ℃ 条件下菌液的 OD₆₀₀ 确定了咖啡酸对 PAO1 的最小抑菌浓度为 2 000 μg/mL。

以咖啡酸溶解溶剂 DMSO 为对照,在不影响生长的 500、1 000 μg/mL 的咖啡酸作用下,检测 QS 系统相关基因 *rhlR*、*rhlI*、*pqsR*、*pqsA* 及毒性因子相关基因 *lasB*、*phzA1* 的表达。结果如图 1 所示,咖啡酸明显降低了 *rhlR*、*pqsR*、*rhlI*、*pqsA* 基因表达,其中在第 8 ~ 12 h 内存在对于 *rhlR*、*rhlI*、*pqsA* 显著的抑制效果,然后抑制作用逐渐减弱,而咖啡酸在 24 h 内表现出 *pqsA* 的抑制作用。此外,咖啡酸对 QS 相关毒性因子 *lasB*、*phzA1* 的表达在转录水平也有抑制作用。这表明咖啡酸对铜绿假单胞菌的 QS 系统调控基因具有转录水平的抑制作用。

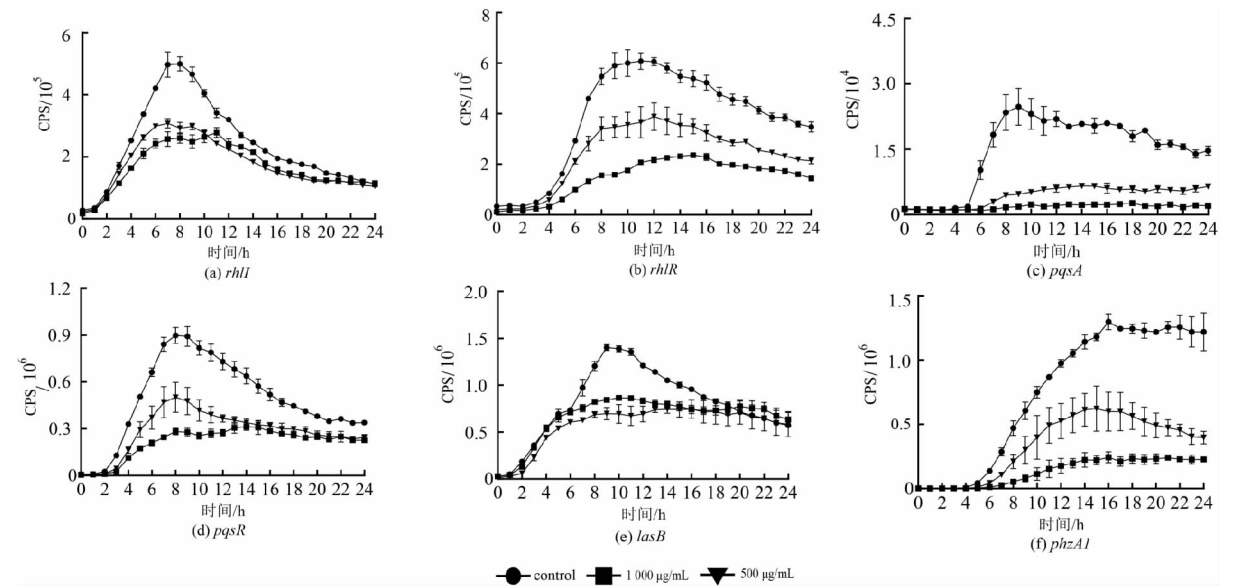


图 1 咖啡酸对 QS 系统相关基因表达的影响
Fig. 1 Effect of caffeic acid on the expression of QS associated genes

3.2 咖啡酸对群体感应控制毒力因子的影响

进一步检测咖啡酸对群体感应相关毒性因子产物水平表达的影响。

绿脓菌素和蛋白水解酶是铜绿假单胞菌破坏宿主细胞表面的基质成分,引起细胞内稳态失衡,

导致各种感染的主要原因。检测了 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的咖啡酸对这两种毒性因子的作用(见图 2)。结果显示,与对照组相比添加咖啡酸后铜绿假单胞菌蛋白水解酶和绿脓菌素的产量明显降低。

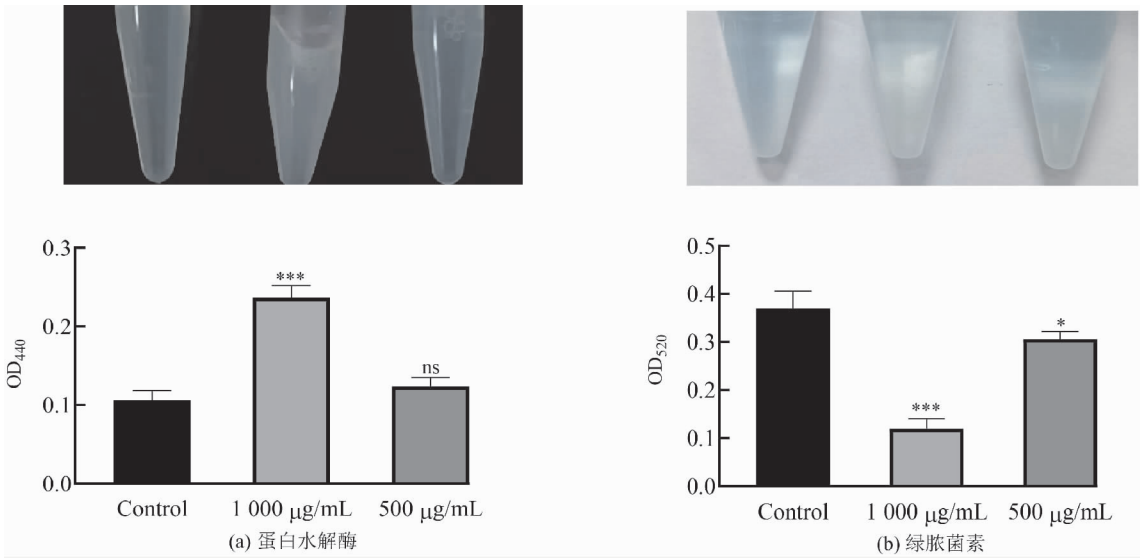


图2 咖啡酸对蛋白水解酶和绿脓菌素产量的影响

Fig.2 Effect of caffeic acid on the production of virulence factors

3.3 咖啡酸对运动的影响

细菌的运动同样在其感染过程中具有重要作用,运动主要参与细菌在宿主细胞表面的黏附和抵抗宿主的免疫反应等过程。本文检测了咖啡酸对铜绿假单胞菌运动能力的影响。由图 3 可知,

与对照组相比咖啡酸抑制了铜绿假单胞菌的运动能力,其中 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的咖啡酸对群集运动和泳动具有极显著的抑制作用,同时结晶紫染色结果表明蹭行运动也受到一定程度的抑制。

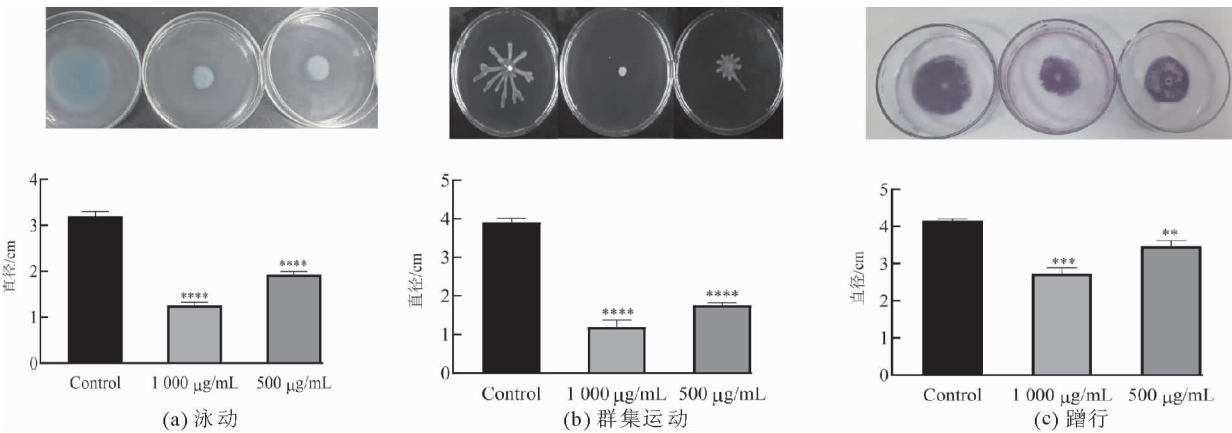


图3 咖啡酸对运动的影响

Fig.3 Effect of caffeic acid on the motility of PAO1

3.4 咖啡酸对生物被膜抑制作用

生物被膜通过形成胞外聚合物来对多种抗生素产生抵抗作用,它与细菌的慢性感染和抗生素耐药性密不可分。本研究结果如图 4 所示,咖啡酸明显降低了生物被膜的生成量,当咖啡酸浓度

达到 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,其对生物被膜的抑制率可以达到 50% 左右,证明咖啡酸可以抑制生物被膜的形成。

3.5 咖啡酸对铜绿假单胞菌感染的减轻作用

通过中国白菜感染模型和果蝇感染模型对咖

啡酸抗致病性进行检测,结果如图 5 所示,(+)为 PAO1 感染,(-)为 PAO1 未感染。与仅 PAO1 感染的对照组相比,不同浓度的咖啡酸处理浓度依赖性地显著减少了中国白菜的腐烂面积〔见图 5(a)〕,显著提高了果蝇感染模型中的果蝇 10 d 后的生存率;同时果蝇感染模型中,仅使用咖啡酸处理后的果蝇存活率与未经任何处理的空白对照组的果蝇生存率接近,无显著性差异,表明咖啡酸对动物无显著毒性。

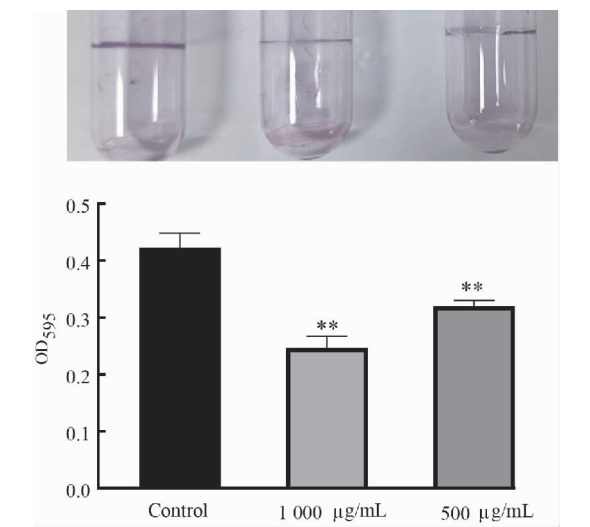


图 4 咖啡酸对生物被膜产量的影响
Fig.4 Effect of caffeic acid on biofilm formation

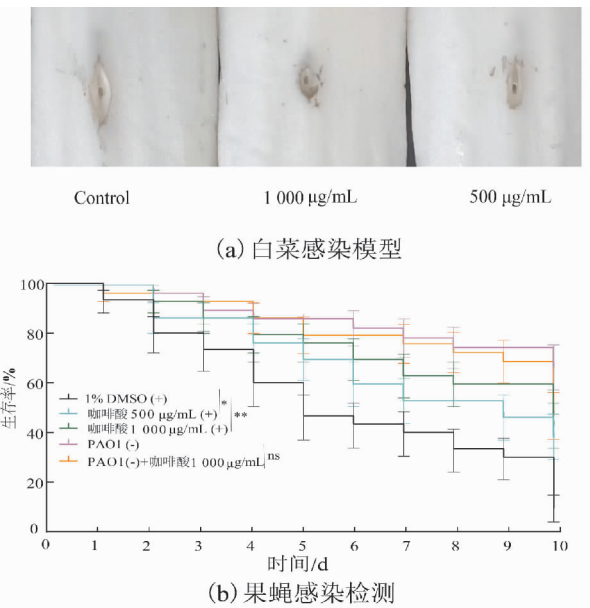


图 5 咖啡酸对 PAO1 致病性的降低作用
Fig.5 Effect of caffeic acid on the pathogenicity of PAO1

3.6 咖啡酸作用靶点推测

3.6.1 分子对接预测咖啡酸作用于 PqsR 蛋白

本研究利用分子对接预测了咖啡酸与 QS 系统 LasR、LasI、PqsA、PqsR 蛋白的作用靶点,结果如图 6 所示。由于 PDB 数据库中缺少 RhlI 和 RhlR 蛋白的晶体结构,因此,未进行咖啡酸和以上两个蛋白的对接。由表 2 可知,PqsR 蛋白与咖啡酸的结合能为 - 5. 306 4 kcal/mol,已知结合能越低两个分子的结合强度越高,因此咖啡酸可能作用于 pqs 系统。

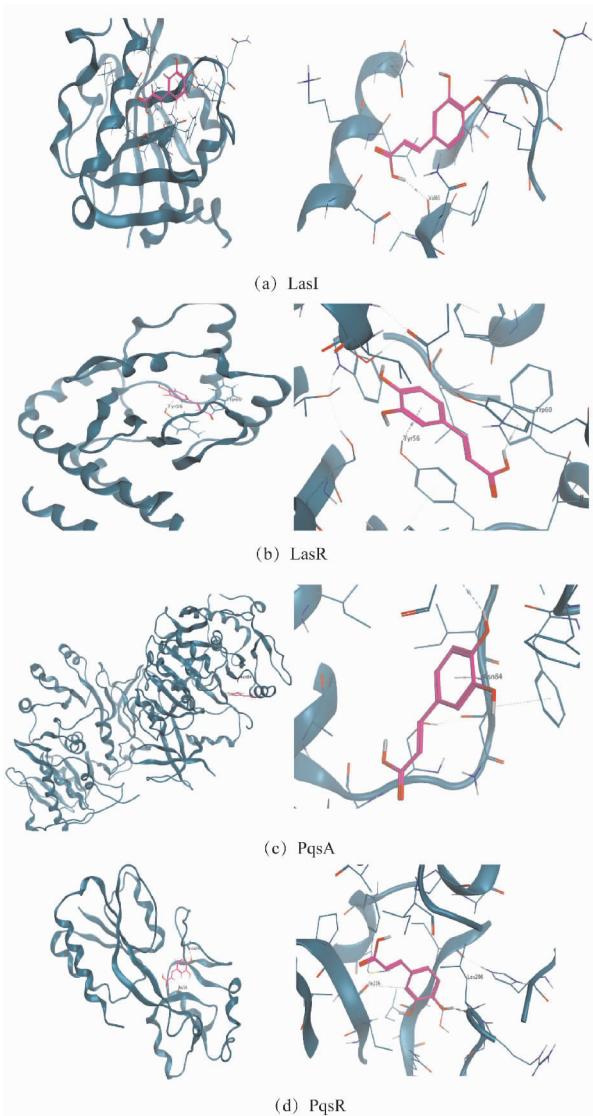


图 6 咖啡酸和 PAO1 QS 相关蛋白对接 3D 结构
Fig.6 3D structure docking results of caffeic acid and QS-related protein

表 2 咖啡酸与 QS 相关蛋白的对接结果
Tab.2 Docking analysis for caffeic acid and QS-related protein

小分子配体	大分子蛋白(PDBID)	结合能/(kcal/mol)	形成氢键的氨基酸残基
咖啡酸	LasI(1RO5)	-4.312 3	Val65
咖啡酸	LasR(6D6A)	-4.621 5	Trp60 Tyr56
咖啡酸	PqsA(5OE6)	-5.004 6	Asn84
咖啡酸	PqsR(4JVD)	-5.306 4	Ile236 Leu208

3.6.2 中国白菜感染模型验证咖啡酸作用于 *pqs* 系统发挥 QSI 效果

利用实验室前期构建的 3 个缺失突变株 PAO1 ($\Delta lasR$)、PAO1 ($\Delta rhIR$)、PAO1 ($\Delta pqsR$) 和不同浓度的咖啡酸混合后进行白菜侵染试验,根据白菜的腐烂程度推测咖啡酸作用靶点。结果如图 7 所示,咖啡酸与 PAO1 ($\Delta lasR$)、PAO1 ($\Delta rhIR$) 混合并注射到白菜后的腐烂面积明显减少,PAO1 ($\Delta pqsR$) 对白菜腐烂的影响程度不明显,说明 *pqs* 系统受损后咖啡酸失去作用位点,导致其难以发挥抗致病性作用。根据以上结果结合分子对接结果推测,咖啡酸可能通过靶向 PqsR 蛋白以发挥 QSI 作用。

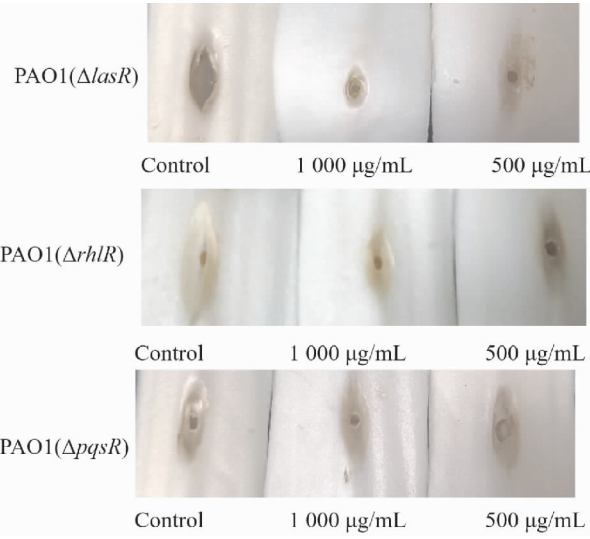


图 7 QS 突变体在中国白菜感染模型中的致病性分析
Fig.7 Pathogenicity analysis for the QS mutants via Chinese Cabbage infection model

4 结语

铜绿假单胞菌作为一种广泛存在于自然界革兰氏阴性条件致病菌,由于其对抗生素耐药性的不断加重,成为影响人类健康的重大威胁之一^[24]。铜绿假单胞菌的致病性和耐药性主要是

由于毒力因子的分泌和生物被膜的形成,而这些毒力又受到其体内的 QS 系统调节^[25]。因此,以 QS 系统为靶标开发群体感应抑制剂(QSI),可以作为抵抗铜绿假单胞菌感染的重要策略^[26]。研究发现,包括许多天然物质以及人工合成化合物在内的许多物质具有 QSI 活性,如以 QS 信号分子为母核结构合成的结构类似物 mBTL^[27],天然植物中广泛存在的酚类物质绿原酸^[28]、黄酮类物质槲皮素^[29]等。而中草药提取物由于成分复杂并且往往具有抗菌、抗病毒的功效,因此可以作为 QSI 发掘的天然资源库^[30]。大血藤是我国特有的传统中药材,常被用于治疗阑尾炎、跌打肿痛等^[31],咖啡酸是大血藤的主要成分之一,其具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗细胞损伤等功效^[32-33]。

研究发现,咖啡酸能在转录水平和产物水平抑制铜绿假单胞菌 QS 系统。同时,白菜感染模型和果蝇感染模型发现咖啡酸显著降低了铜绿假单胞菌的致病性。此外,进一步研究了咖啡酸在 QS 系统的作用靶点。首先,利用分子对接预测了咖啡酸与蛋白质 PqsR 的最强结合;其次,采用白菜感染模型对 QS 系统的相关突变体 PAO1 ($\Delta lasR$)、PAO1 ($\Delta rhIR$)、PAO1 ($\Delta pqsR$) 的致病性进行了检测。研究结果发现,PqsR 的缺失导致了咖啡酸对 QS 系统抑制效应的消失,验证了咖啡酸可能主要通过作用 *pqs* 系统,尤其是与 PqsR 作用,从而发挥 QS 系统抑制效应的作用,扰乱 QS 系统对下游基因的调控作用,以发挥 QSI 活性。QSI 的群体感应抑制机制主要包括竞争性地阻断信号分子与其相应受体蛋白的结合,抑制 QS 信号分子的生物合成,降解细胞内的 3 种信号分子。研究发现,咖啡酸很有可能与信号分子 PQS 竞争性结合受体蛋白 PqsR,抑制 QS 系统从而降低铜绿假单胞菌的致病性。

综上,本研究证明了咖啡酸可能通过干扰 *pqs* 系统进一步抑制铜绿假单胞菌的 QS 系统,降低毒力因子的产生最终导致铜绿假单胞菌的致病性

降低,在治疗铜绿假单胞菌感染的同时避免其抗生素耐药性的产生,咖啡酸对果蝇的低毒作用也说明其具有较好的临床应用价值。

参考文献

- [1] SCHABER J A, TRIFFO W J, SUH S J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(8): 3715-3721.
- [2] MITTAL R, AGGARWAL S, SHARMA S, et al. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview [J]. *J Infect Public Health*, 2009, 2(3): 101-111.
- [3] ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655.
- [4] 丁烨,戴璐,俞娟. 抗铜绿假单胞菌感染治疗方法研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(6): 955-960.
DING Y, DAI L, YU J. Progress of reaserch on treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2020, 30(6): 955-960.
- [5] SOUKARICH F, WILLIAMS P, STOCKS M J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems as drug discovery targets: Current position and future perspectives [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(23): 10385-10402.
- [6] LEE J, ZHANG L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Protein & Cell*, 2015, 6(1): 26-41.
- [7] 饶媚,张素平,史道华. 铜绿假单胞菌群体感应系统抗菌增效机制研究进展 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2019, 19(5): 578-583.
RAO M, ZHANG S P, SHI D H. Study advances of synergistic mecanisms targeting quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2019, 19(5): 578-583.
- [8] PATTNAIK S, AHMED T, RANGANATHAN S K, et al. *Aspergillus ochraceopetaliformis* SSP13 modulates quorum sensing regulated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Biofouling*, 2018, 34(4): 410-425.
- [9] WARRIER A, SATYAMOORTHY K, MURALI T S. Quorum-sensing regulation of virulence factors in bacterial biofilm [J]. *Future Microbiol*, 2021, 16: 1003-1021.
- [10] 何媛,宋贵波. 铜绿假单胞菌毒力因子及调控机制的研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2023, 51(2): 94-99.
- [11] HE Y, SONG G B. Research progress on virulence factors and regulatory mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2023, 51(2): 94-99.
- [12] JURADO-MARTÍN I, SAÍNZ-MEJÍAS M, MCCLEAN S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3128.
- [13] 曾莉莉,史道华,牛培广. 铜绿假单胞菌群体感应系统及其抑制剂的研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(9): 701-705.
ZENG L L, SHI D H, NIU P G. Research progress in quorum sensing system and its inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2014, 39(9): 701-705.
- [14] KHAN F, BAMUNUARACHCHI N I, TABASSUM N, et al. Caffeic acid and its derivatives: Antimicrobial drugs toward microbial pathogens [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(10): 2979-3004.
- [15] WANG G F, SHI L P, REN Y D, et al. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro [J]. *Antiviral Res*, 2009, 83(2): 186-190.
- [16] 任晓娜,刘宇良,于航,等. 缬草、龙脑精油的抑菌活性 [J]. *热带农业科学*, 2018, 38(10): 74-78.
REN X N, LIU Y L, YU H, et al. Antibacterial activity of valerian and borneol essenti [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2018, 38(10): 74-78.
- [17] BECHER A, SCHWEIZER H P. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions [J]. *Bio-techniques*, 2000, 29(5): 948-950.
- [18] PEETERS E, NELIS H J, COENYE T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates [J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 72(2): 157-165.
- [19] 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.
- [20] DAI L, WU T Q, XIONG Y S, et al. Ibuprofen-mediated potential inhibition of biofilm development and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Life Sci*, 2019, 237: 116947.

- [20] RASHID M H, KORNBERG A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(9): 4885-4890.
- [21] STARKEY M, RAHME L G. Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts [J]. Nat Protoc, 2009, 4(2): 117-124.
- [22] CHUGANI S A, WHITETHEY M, LEE K M, et al. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(5): 2752-2757.
- [23] CHADHA J, HARJAI K, CHHIBBER S. Repurposing phytochemicals as anti-virulent agents to attenuate quorum sensing-regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microb Biotechnol, 2022, 15(6): 1695-1718.
- [24] DOLAN S K. Current knowledge and future directions in developing strategies to combat *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. J Mol Biol, 2020, 432(20): 5509-5528.
- [25] AZAM M W, KHAN A U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Drug Discov Today, 2019, 24(1): 350-359.
- [26] 周志莲, 周彤, 周秀娟, 等. 铜绿假单胞菌群体感应系统及其抑制剂的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(8): 862-868.
- ZHOU Z L, ZHOU T, ZHOU X J, et al. Study on quorum sensing system and its inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2023, 48(8): 862-868.
- [27] O' LOUGHLIN C T, MILLER L C, SIRYAPORN A, et al. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(44): 17981-17986.
- [28] XU W, ZHANG X, WANG L, et al. Effect of chlorogenic acid on the quorum-sensing system of clinically isolated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Appl Microbiol, 2022, 132(2): 1008-1017.
- [29] OUYANG J, FENG W, LAI X, et al. Quercetin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via the vfr-mediated lasIR system [J]. Microb Pathog, 2020, 149: 104291.
- [30] 陈沐雨, 潘云萍, 祝司霞. 中草药对铜绿假单胞菌群体感应系统抑制作用的研究进展 [J]. 国外医药(抗生素分册), 2023, 44(4): 217-223.
- CHEN M Y, PAN Y P, ZHU S X. Research progress on inhibition of chinese herbal medicine on quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. World Notes on Antibiotics, 2023, 44(4): 217-223.
- [31] 汤建, 曹裕旻, 左亚锋, 等. 红藤水溶性部位的 LC-MS 分析及抗炎活性成分的虚拟筛选 [J]. 中国野生植物资源, 2023, 42(12): 25-29.
- TANG J, CAO Y M, ZUO Y F, et al. LC-MS analysis of water-soluble fraction of *Sargentodoxa cuneata* and virtual screening of anti-inflammatory constituents [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2023, 42(12): 25-29.
- [32] 张彦芳, 张娜, 韩正宇, 等. 硫普罗宁联合咖啡酸治疗慢性乙型病毒性肝炎所致白细胞减少的疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(18): 1971-1972.
- ZHANG Y F, ZHANG N, HAN Z Y, et al. Efficacy observation of sulpiristone combined with caffeic acid in the treatment of leukopenia caused by chronic hepatitis B [J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2014, 23(18): 1971-1972.
- [33] KALTHOFF S, PAULUSCH S, RUPP A, et al. The coffee ingredients caffeic acid and caffeic acid phenylethyl ester protect against irinotecan-induced leukopenia and oxidative stress response [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(18): 4193-4208.

(编辑 张欢)