文章编号:1000-5404(2009)16-1559-04

论著

氨溴索对铜绿假单胞菌生物膜密度感应系统信号分子及相关基因的影响

孙小敏,余加林,林丽华,林雅茵,邹志慧 (重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨氨溴索对铜绿假单胞菌生物膜(biofilm, BF)密度感应(quorum-sensing, QS)系统信号分子酰化高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserinelactone,AHL)以及AHL合成酶编码基因表达的影响。**方法** 通过平板培养法培养铜绿假单胞菌建立成熟的体外BF模型,用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)鉴定生物膜的形成情况。不同浓度氨溴索干预后,应用实时荧光定量PCR(real-time PCR)和AHL感应菌株根癌土壤杆菌(WCF47)分别检测其对铜绿假单胞菌AHL合成酶编码基因*rhl*I和*las*I mRNA及AHL表达的影响。**结果** 通过实时荧光定量PCR检测,结果显示氨溴索3.75 mg/ml作用组基因*las*I和*rhl*I与对照组相比表达量均显著减少($P<0.05$)。氨溴索1.875 mg/ml干预后,有同样趋势,但效应不如高浓度明显($P<0.05$)。氨溴索3.75 mg/ml作用后AHL的表达量较对照组明显减少($P<0.05$),氨溴索1.875 mg/ml作用后亦有减少($P<0.05$)。**结论** 氨溴索可以通过下调信号分子AHL合成酶编码基因以及AHL的表达来抑制BF。

关键词: 氨溴索;铜绿假单胞菌;生物膜;密度感应系统;信号分子
中图法分类号: R378.991;R965;R974 **文献标识码:** A

Effects of ambroxol on the signal molecules and expressions of the related genes of quorum-sensing system in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

SUN Xiao-min, YU Jia-lin, LIN Li-hua, LIN Ya-yin, ZOU Zhi-hui (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the effects of ambroxol on the signal molecules N-acyl-homoserinelactone (AHL) of quorum-sensing (QS) system in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm (BF) and on the expressions of AHL synthase encoding genes in an established biofilm model *in vitro*. **Methods** BF formation in the mature *Pseudomonas aeruginosa* BF model, established after plate culture for 7 d, was identified by scanning electron microscopy (SEM). After the treatment of ambroxol at different concentrations, the effects of ambroxol on the mRNA expressions of AHL synthase encoding genes *rhl* I and *las* I were detected by quantitative real-time RT-PCR; the AHL signal molecules were quantified by AHL-responsive Agrobacterium tumefaciens reporter strain. **Results** After the treatment of ambroxol at the concentration of 3.75 mg/ml, the mRNA expression of *rhl*I and *las*I were down-regulated significantly as compared with the control group ($P<0.05$); AHL level was also lower than that in the control group ($P<0.01$). Ambroxol at the concentration of 1.875 mg/ml had the same tendency as at the concentration of 3.75 mg/ml, but not so obvious ($P<0.05$). **Conclusion** Ambroxol can inhibit the BF forming activity by means of down-regulation of the expressions of AHL synthase encoding genes and the AHL signal molecules of quorum-sensing system in *Pseudomonas* aeruginosa biofilm.

Key words: ambroxol; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; Quorum-sensing system; signal molecule

铜绿假单胞菌是院内感染常见的条件致病菌,特别是在新生儿进行气管插管治疗时,容易黏附于导管上形成生物膜(biofilm,BF)。BP的形成是导致难治性感染和细菌耐药性增加的主要原因。BF菌是一个群体组织,是由很多微菌落成,各个细胞间有严密的信号传递来交流信息,这种细胞与细胞的交流有赖于密度感应(Quorum-sensing, QS)系统。QS系统调节着细菌群体的许多生理功能,已成为控制BF相关性感染的新靶点。本课题组在前期研究中发现,氨溴索对野生型铜绿假单胞菌(PAO1)黏附及BF形成有明显的抑

基金项目: 国家自然科学基金(30772363);重庆市自然科学基金(2007-340) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772363) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007-340)

作者简介: 孙小敏,女,山东省东营市人,博士研究生,主要从事新生儿感染方面的研究。电话:(023)63632756-3531,E-mail: sophia04369@hotmail.com
通信作者: 余加林,E-mail:yujialin486@sohu.com

收稿日期: 2008-11-17;**修回日期:** 2009-02-23

制作用[1],能增加 BF 菌对抗生素的渗透作用[2]。同时还发现氨溴索对黏液型铜绿假单胞菌 BF 的结构有破坏作用[3,4]并且影响藻酸盐合成调节基因 algD、algU、algR 和 mucA 的表达[5]。本实验拟在前期研究基础上探讨氨溴索对铜绿假单胞菌 QS 系统信号分子酰化高丝氨酸内酯(N-acyl-homoserinelactone, AHL)以及 AHL 合成酶编码基因 rhlI 和 lasI mRNA 表达的影响,为抗 BF 药物的研究及临床治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株 铜绿假单胞菌 PAO1 株(本实验室保存);信号分子感应菌株根癌土壤杆菌 WCF47 (pCF372/pCF218,含有 Ptral-lacZ 融合基因和 traR 基因,卡那霉素抗性、壮观霉素抗性、四环素抗性),由美国康奈尔大学 Winans 教授惠赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 LB 培养基(Luria-Bertani)购自上海升博生物技术公司,X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)和 ONPG(邻硝基苯-β-D-半乳糖苷)购自美国 Sigma 公司,氨溴索标准品(中国药品生物制品检定所 批号 20051011),TRIzol Reagent(Invitrogen 公司),PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope,SEM,美国 Amary 公司 KYKY3200,第三军医大学电镜室提供),比浊仪(德国 Siemens 公司),荧光定量 PCR 仪(Rothe Lightcycler,Rothe 公司),分光光度计(NanoDrop 1000,Thermoscientific 公司),凝胶成像系统(美国 MEX 公司),Quantity One 图像分析软件,超声破碎仪(上海仪器设备厂),24 孔细胞培养板(美国 Corning 公司)。

1.1.3 培养基及培养条件 铜绿假单胞菌液体培养用 LB,37 ℃培养;铜绿假单胞菌转接种用 LB 琼脂平板,37 ℃培养;根癌土壤杆菌(*agrobacterium tumefaciens*)保存用 LB 固体培养基,4 ℃冷藏;抗生素使用浓度:四环素(Tetracyclin,Tc)为2 μg/ml,壮观霉素(Spectinomycin,Sp)100 μg/ml,卡那霉素(Kanamycin,Km)50 μg/ml。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞菌 BF 体外模型的建立[6] 取铜绿假单胞菌 PAO1 单菌落接种于 LB 培养基中,37 ℃,200 r/min 振荡培养过夜。分光光度计测定菌液 $D(600)$ 值,调整至 0.5。接种菌液于预先放置无菌盖玻片(10 mm × 10 mm,作为 BF 生长的载体)的 24 孔细胞培养板中,每孔 1 ml, 隔日换液,7 d 后得到成熟 BF[7]。应用 SEM 鉴定 BF 的形成情况。

1.2.2 BF 的处理 如上述得到成熟 BF,在 24 孔板中分别加入氨溴索(浓度为 3.75 mg/ml 和 1.875 mg/ml)和 LB 培养基各 1 ml,每个浓度重复 8 孔。37 ℃孵育 8 h,去除浮游菌后将玻片分别置于 1 ml LB 培养基中,超声振荡 15 min,振摇培养 5 h (37 ℃, 200 r/min)。实验分为 3 组:培养基对照组、氨溴索 1.875 mg/ml 干预组和氨溴索 3.75 mg/ml 干预组。

1.2.3 总 RNA 的提取及浓度与纯度的测定 将细菌离心后弃上清,加入 1 ml Trizol,室温 5 min; 加入 0.2 ml 氯仿;4 ℃ 12 000 r/min 15 min,取上层水相,加入 0.5 ml 异丙醇; 4 ℃ 12 000 r/min 10 min,弃上清,加入 1 ml 75% 乙醇; 12 000 r/min 10 min,沉淀晾干后加入适量的 DEPC 水中,55 ℃ 5 min 充分溶解 RNA。取提取的总 RNA 2 μl,用 NanoDrop1000 分光光度计测定各组总 RNA 样本 $D(260)/D(280)$ 以及浓度[经检测 RNA 样品的 $D(260)/D(280)$ 为 1.8 ~ 2.0]。

1.2.4 cDNA 的制备 按试剂盒提供的反应体系,进行反转录反应。反应体系共 10 μl,条件如下:37 ℃ 15 min(反转录),85 ℃ 5 s(反转录酶的失活)。反应完毕, -20 ℃保存。

1.2.5 AHL 合成酶编码基因 *rhl*I 和 *las*I mRNA 相对表达量的测定 引物与探针:应用 Primer Premier 5.0 设计引物及带有 5′ FAM 荧光基团和 3′ TAMRA 淬灭基团的 *Taq*Man 探针。引物与探针经 BLAST 软件进行同源性分析,确认与其他序列无同源性。表 1 示各基因的引物和探针序列。

表 1 基因 *las*I、*rhl*I 及内参基因 rpoD 的引物与探针序列

引物和探针	序列
*las*I 正义链	5′-GCCCCTACATGCTGAAGAACA-3′
反义链	5′-AGATGTGCGGCGAGCAA-3′
探针	5′-FAM-CTTCCCGGAGCTTCTGCACGGC-TAMRA-3′
*rhl*I 正义链	5′-GCTACCGGCATCAGGTCTTC-3′
反义链	5′-GGCTCATGGCGACGATGT-3′
探针	5′-FAM-TCCACCTCCAGGGTCCGCGAC-TAMRA-3′
rpoD(内参) 正义链	5′-CCTACGCCACCTGGTGGAT-3′
反义链	5′-AGCTTGTTGATCGTCTCGATCAT-3′
探针	5′-FAM-CGCCGACCAGGCACGCAC-TAMRA-3′

实时荧光定量 PCR 反应: 依照试剂说明书,25 μl 反应体系,两步法反应:95 ℃ 2 min(变性);95 ℃ 7 s,60 ℃ 40 s,40 个循环(退火延伸)。每个待测样本设两个平行管。实时荧光定量 PCR 反应产物鉴定:2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物,以确保结果准确性。mRNA 相对表达量的计算[8]:将培养基对照组 RNA 逆转录之后的 cDNA 10 倍梯度稀释后,各取 2 μl,与其他待测样品一起进行 real-time PCR 反应(每个样本均设两个平行管)。反应结束后,获取 C_T 值,输入 Excel 软件,拷贝数以 10 为底数取对数作为横坐标,C_T 值为纵坐标,绘出标准曲线。设定正常培养基对照组中,目的基因相对于参照基因的表达量为 1,则试验干预组中目的基因的相对表达量(表达指数,F)。

$$F = 10^{\triangle C_{T,T}/A_T - \triangle C_{T,R}/A_R}$$

其中 $\triangle C_{T,T}$ 代表实验组目的基因 C_T 值减去正常对照组目的基因 C_T 值的差,$\triangle C_{T,R}$ 代表实验组内参基因 C_T 值减去正常对照组内参基因 C_T 值的差,A_T 代表目的基因标准曲线的斜率,A_R 代表内参基因标准曲线的斜率。

1.2.6 铜绿假单胞菌 QS 系统信号分子 AHL 的相对定量检测

AHL 粗提物的制备[9]:将细菌培养 7 d 后得到成熟 BF,在 24 孔板中分别加入氨溴索(浓度为 3.75 mg/ml 和 1.875 mg/ml)和 LB 培养基各 1 ml,每个浓度重复 8 孔。37 ℃孵育 8 h,去除浮游菌后将玻片分别置于 50 ml 加有谷氨酰胺的 LB 培养基中,振摇培养至密度达到 0.6[$D(600)$]。将菌液 13 000 r/min 离心 10 min 之后取上清液,用 25 ml 的二氯甲烷萃取 3 次。合并萃取液,通过旋转蒸发器浓缩后用 0.22 μm 孔径的滤膜滤

过。将滤液在真空中离心干燥,去除溶剂。将提取物溶解于 40 μl 乙酸乙酯中,保存于 -20 ℃。

信号分子 AHL 的相对定量测定(β-半乳糖苷酶法)[10]:吸取感应菌株(WCF47)活化培养液 40 μl[$D(600)\approx0.6$],加入含有相应抗生素的 5 ml 新鲜 LB 液体培养基中,分别加入 AHL 粗提物(40 μl),28 ℃ 培养至 $D(600)$ 为 0.2 ~ 1.0,取出冰浴 20 min 后,测 β-半乳糖苷酶活性(酶活单位:Miller 单位)。β-半乳糖苷酶活性的测定参照 Miller 方法。酶活力的定义:供试条件下每分钟分解 1 nmol ONPG 所需的酶量为一个酶活单位(Unit),即:

$$\text{Units} = 1\,000 \times \frac{D(420) - 1.75 \times D(550)}{t \times v \times D(600)}$$

其中 $D(420)$ 和 $D(550)$ 为反应混合物的吸光值,$D(600)$ 为用于测定的培养液的吸光度值,t 表示 β-半乳糖苷酶与底物反应的时间(min),v 表示用于测定的培养液的体积(μl)。

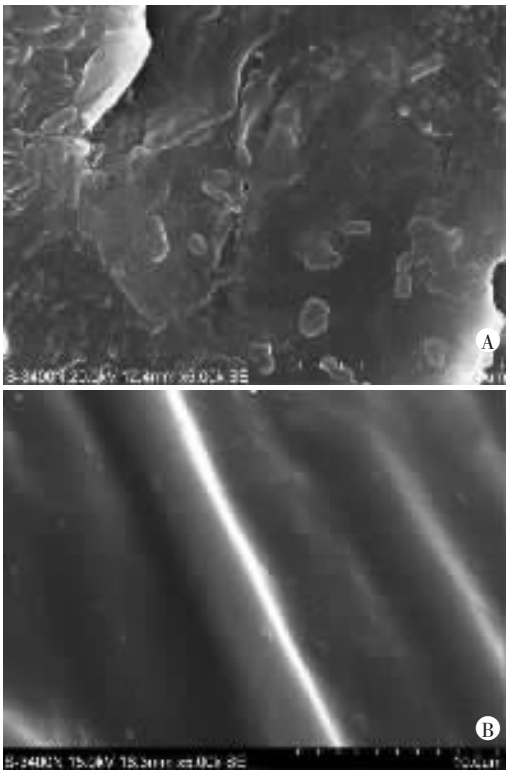
1.3　统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件,各组之间进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　平板法培养 7 d 后 BF 的形态学鉴定

平板法培养 7 d 后,铜绿假单胞菌 BF 的 SEM 结果见图 1。从图 1 中可以看出,细菌培养 7 d 后,形成成熟的 BF。BF 在载体表面形成片状物,周围有厚薄不均的黏液状物质连接成一大片,细菌包裹其内。说明平板法培养 BF 成功。

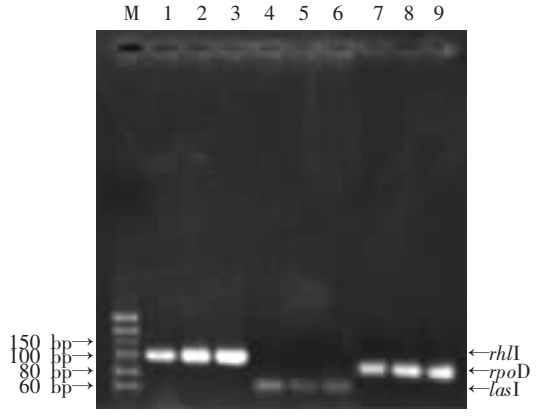


A:培养基对照组; B:空白对照

图 1　平板培养铜绿假单胞菌 7 d 后成熟 BF 的形态学观察　(SEM ×5 000)

2.2　荧光定量 PCR 之后产物的鉴定

各基因产物电泳后的片段大小与实际目的片段大小一致(图 2),说明荧光定量 PCR 扩增正确有效。



M:标准;1、4、7:培养基对照组;2、5、8:氨溴索 1.875 mg/ml 干预组;3、6、9:氨溴索 3.75 mg/ml 干预组

图 2　3 组 *rhl*I、*las*I、*rpo*D 基因 mRNA 的表达

2.3　氨溴索对 AHL 合成酶编码基因 *rhl*I 和 *las*I mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 反应后得到各基因的 C_T 值,按照前述公式计算得到基因 *rhl*I 和 *las*I mRNA 的相对表达量 F(表 1)。统计结果显示,随着氨溴索浓度的增加,基因 *rhl*I 和 *las*I 的 CT 值逐渐增大,F 值亦随氨溴索浓度的增加而增加,说明氨溴索干预后,两基因的表达出现不同程度下调,下调的程度随氨溴索浓度增加而增加。

表 1　氨溴索作用后基因 *rhl*I,*las*I 及内参基因 rpoD C_T 值及相对表达量 F 值的变化　($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	C_T 值			F 值	
	*las*I	*rhl*I	*rpo*D	*las*I	*Rhl*I
培养基对照组	16.252 ± 0.103	16.523 ± 0.112	15.568 ± 0.023	1.000	1.000
氨溴索 1.875 mg/ml 干预组	18.398 ± 0.100	17.987 ± 0.133	15.592 ± 0.015	2.213 ± 0.062[a]	1.410 ± 0.089[a]
氨溴索 3.75 mg/ml 干预组	21.216 ± 0.105	19.102 ± 0.094	15.550 ± 0.020	3.548 ± 0.070[ab]	1.914 ± 0.050[ab]

a:$P<0.05$,与培养基对照组比较; b:$P<0.05$,与氯溴索 1.875 mg/ml 干预组比较

2.4　氨溴索对信号分子 AHL 表达的影响

按前述方法相对定量 AHL 后,计算得出各组的 β-半乳糖苷酶活性。统计结果显示,浓度为 3.75 mg/ml 和 1.875 mg/ml 的氨溴索作用后,β-半乳糖苷酶活性(Miller 单位)从未干预组的(761.286 ± 13.301)分别降低到(645.428 ± 15.197)和(532.428 ± 8.867)。2 个不同浓度氨溴索干预组分别与培养基对照组比较、2 个干预组之间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明氨溴索作用后,信号分子 AHL 的表达减少,并且减少的程度随氨溴索浓度的增加而增加。

3　讨论

随着医疗技术的不断进步,越来越多的早产儿及

危重儿得以存活,有赖于气管插管机械通气、脐动脉置管、脐静脉置管以及外周中心静脉导管等技术。然而呼吸机相关肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)以及导管相关性感染的发病率和病死率仍很高,是临床上急待解决的问题[11]。围产儿尤其是早产极低体质量儿由于其生理特殊性,常易受铜绿假单胞菌感染,特别是气管插管者,铜绿假单胞菌容易在导管表面形成BF。因此,如何阻止BF的形成,清除已形成的BF是临床治疗中极为迫切和棘手的问题。

BF菌是一个群体组织。它由很多微菌落组成,并且各个细胞间有着严密的信号传导来交流信息。铜绿假单胞菌主要依赖AHL作为信号分子。QS有两种主要信号系统,las系统和rhl系统。其中基因*las*I和*rhl*I编码AHL合成酶,进而催化AHL的合成[12]。QS系统调节细菌群体的许多生理功能,如抗生素产生、游动能力、颤搐运动、质粒转移、生物膜形成、毒力因子产生等[13]。因此,QS系统已成为控制BF相关性感染的新靶点。

尽管针对通过QS系统干预BF在理论上提出了很多措施,但是目前国内外报道的抗BF相关药物还远不能满足临床需要。特别是围产儿方面,由于其特殊的生理特点更局限了用药范围,寻找适宜而有效的药物具有重大的临床意义。有报道显示化痰药N-乙酰半胱氨酸对细菌生物膜有一定影响,而新生儿临床治疗中常用的化痰药物氨溴索与N-乙酰半胱氨酸有一定的相似性,都具有抗氧化的作用。本课题组在前期研究中发现,氨溴索对野生型铜绿假单胞菌黏附及BF形成有明显的抑制作用,能增加BF菌对抗生素的渗透作用;同时氨溴索对黏液型铜绿假单胞菌BF的结构有破坏作用并能影响藻酸盐合成调节基因的表达。藻酸盐是BF细菌一种重要的致病因子,有研究发现藻酸盐合成调节系统与QS系统之间存在相互作用[14]。那么氨溴索是否能通过影响QS系统来影响BF呢?在本实验中我们检测发现,氨溴索能够通过抑制编码AHL合成酶的基因*las*I和*rhl*I的表达,使AHL的表达减少。在QS系统中,只有当信号分子AHL达到一定的阈值时,才会激发下游的一系列基因表达。信号分子的合成受抑制后不容易达到阈值,QS系统调节的细菌多种生理功能便会受到影响,如毒力因子的产生等,这样便减少了生物膜感染对人体造成的损害。本实验结果为氨溴索的抗BF应用提供了理论基础,为新生儿难治性铜绿假单胞菌感染的临床治疗提供新的思路。但氨溴索是否能影响AHL的播散以及与其受体的结合,是否能作用于下游的基因或通过其他的途径作用于BF,这些有待进一步研究。

参考文献:

[1] 杨 华, 余加林, 刘官信, 等. 氨溴索对环丙沙星透过铜绿假单胞菌生物膜的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(4): 221-224.

[2] 陈波曼, 余加林, 刘官信, 等. SYTO9/PI荧光探针标记的铜绿假单胞菌PAO1菌株生物被膜形成的动态观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 390-392.

[3] 李 芳, 余加林, 杨 华, 等. 盐酸氨溴索联合环丙沙星抗铜绿假单胞菌成熟生物膜作用研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(8): 503-505.

[4] 李 芳, 余加林, 刘官信, 等. 氨溴索对铜绿假单胞菌生物膜结构的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 60-63.

[5] Li F, Yu J, Yang H, *et al*. Effects of ambroxol on alginate of mature Pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. Curr Microbiol, 2008, 57(1): 1-7.

[6] Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 881-890.

[7] Gillis R J, White K G, Choi K H, *et al*. Molecular basis of azithromycin-resistant Pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(9): 3858-3867.

[8] 张驰宇, 徐顺高, 黄新祥. 一种新颖简便的荧光实时RT-PCR相对定量方法的建立[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(9): 883-888.

[9] Charlton T S, de-Nys R, Netting A, *et al*. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm[J]. Environ Microbiol, 2000, 2(5): 530-541.

[10] Sio C F, Otten L G, Cool R H, *et al*. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from Pseudomonas aeruginosa PAO1[J]. Infect Immun, 2006, 74(3): 1673-1682.

[11] Rello J, Lorente C, Diaz E, *et al*. Incidence, etiology, and outcome of nosocomial pneumonia in ICU patients requiring percutaneous tracheotomy for mechanical ventilation[J]. Chest, 2003, 124(6): 2239-2243.

[12] George M, Pierce G, Gabriel M, *et al*. Effects of quorum sensing molecules of Pseudomonas aeruginosa on organism growth, elastase B production, and primary adhesion to hydrogel contact lenses[J]. Eye Contact Lens, 2005, 31(2): 54-61.

[13] Smith K M, Bu Y, Suga H. Induction and inhibition of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing by synthetic autoinducer analogs[J]. Chem Biol, 2003, 10(1): 81-89.

[14] Morici L A, Carterson A J, Wagner V E, *et al*. Pseudomonas aeruginosa AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner[J]. J Bacteriol, 2007, 189(21): 7752-7764.

(编辑 龙 亮)