

具有群体感应抑制活性海洋放 线菌的分离和鉴定

王为善 邹姗姗 尹守亮 官倩红 于文功*

(中国海洋大学医药学院海洋药物教育部重点实验室 山东 青岛 266003)

摘要: 群体感应系统在许多致病菌的致病过程中发挥了重要的作用, 可作为开发新型抗菌药物的理想的靶标, 筛选高效的群体感应抑制剂有望成为解决细菌耐药问题的一个有效途径。我们从胶州湾海泥中分离得到放线菌 47 株, 其发酵提取物经紫色杆菌 CV026 模型筛选后, 发现放线菌 WA-7 提取物具有群体感应抑制活性, 且在有效浓度时对细菌的生长没有影响。16S rDNA 分析表明 WA-7 应属于 *Streptomyces* 属。进一步研究表明, WA-7 提取物能够显著降低紫色杆菌受群体感应调节的紫色菌素产量和相关蛋白酶的表达量, 且呈浓度依赖性。

关键词: 紫色杆菌 CV026, 海洋放线菌, 群体感应抑制活性, 紫色菌素, 系统发育分析

Isolation and Identification of Marine Actinomycetes with Quorum Sensing Inhibitory Activity

WANG Wei-Shan ZOU Shan-Shan YIN Shou-Liang GONG Qian-Hong YU Wen-Gong*

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, College of Medicine and Pharmaceutics, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: Quorum sensing systems of pathogens are central regulators for the expression of virulence factors. Increasing evidence implies that targeting the quorum sensing system of many pathogenic bacteria is a promising therapeutic approach to control infections. In this work, we isolated 47 strains of actinomycetes from the mud sample of Jiaozhou Bay. Quorum sensing inhibitory activity was monitored by *Chromobacterium violaceum* CV026. As a result, the culture broth extract of actinomycetes WA-7 was found to have significant quorum sensing inhibitory activity. This strain was assigned to the genus *Streptomyces* based on its 16S rDNA sequence. Further investigation revealed that the extract could inhibit the quorum sensing-controlled violacein and proteases production of *C. violaceum* in a concentration-dependent manner.

Keywords: *Chromobacterium violaceum* CV026, Marine actinomycetes, Quorum sensing inhibitory activity, Violacein, Phylogenetic analysis

细菌感染一直威胁着人类健康, 以青霉素为代表的抗菌药物的出现使有效治疗各种细菌感染成为

可能, 为人类健康做出了卓越贡献。然而, 感染性疾病并未随着抗菌药物的不断发现和大量使用而减轻

和消失,越来越严重的细菌耐药性问题,已成为全球关注的重大难题^[1]。因此,寻找和利用新的靶点开发新型抗菌药物已成为我们的紧迫任务^[2]。

群体感应(Quorum Sensing, QS)是细菌根据自身细胞密度变化进行自我协调的一种群体行为^[3]。许多细菌能产生并释放一种被称为自诱导物(Auto Inducer, AI)的信号分子,随着细菌密度的增加,信号分子积累到一定浓度时则会与胞浆受体蛋白结合,调控细菌相关基因的表达,使细菌形成一种群体行为来有效地抵御环境压力、攻击宿主等^[4]。在一些机会致病菌(如铜绿假单胞菌、聚团肠杆菌、粘质沙雷氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌等)中,群体感应系统调控相关致病因子的产生,如促进毒素的产生、黏附、生物膜(Biofilm)的形成等^[5]。大量文献表明缺失了群体感应系统的菌株其致病能力大大降低,因此,细菌群体感应系统可作为抗感染药物研发的新靶标^[6]。

近几年来,利用不同的筛选模型,人们发现 Furanone^[7]、4-NPO^[8]、Solenopsin A^[9]等化合物具有细菌群体感应抑制作用。紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)为一种革兰氏阴性细菌,具有群体感应系统,随着自身密度的增加,向环境释放的信号分子(C6-HSL)的浓度随之增加,当达到一定的阈值,C6-HSL便能在胞浆和转录调节蛋白CviR结合,从而启动紫色菌素等群体感应相关基因的表达^[10];由于紫色菌素这一直观表型受群体感应信号系统严谨调控,所以紫色杆菌可作为一种简便、直接的群体感应抑制因子筛选模型^[11]。本文从胶州湾海泥中分离放线菌株,利用紫色杆菌CV026菌株筛选得到一株具有细菌群体感应抑制活性的链霉菌WA-7,并初步探讨了其发酵上清液提取物对紫色杆菌群体感应的抑制机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品:2008年6月从胶州湾不同地区采集海泥8份,存放在无菌瓶中。

1.1.2 试剂:己酰基高丝氨酸内酯(C6-HSL)购于Cayman Chemical公司,人工底物偶氮酪蛋白(Azocasein)购于Sigma公司,其他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基:分离和斜面保存培养基:可溶性淀粉20g,硝酸钾1g,磷酸氢二钾0.5g,硫酸镁

0.5g,硫酸亚铁0.01g,琼脂20g,陈海水1000mL,pH7.2~7.4,1×10⁵Pa灭菌20min备用,分离培养基灭菌后加终浓度为50mg/L的放线菌酮和25mg/L的萘啶酮酸。

放线菌发酵培养基:葡萄糖10g,磷酸氢二钾0.5g,氯化钠0.5g,硫酸镁0.5g,牛肉膏0.3g,可溶性淀粉10g,酵母提取物10g,蛋白胨10g,碳酸钙2g,陈海水1000mL,pH7.2~7.4,1×10⁵Pa灭菌20min,备用。

PTSB培养基^[12]:蛋白胨50g,胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基2.5g,以蒸馏水溶解并定容至1000mL,pH7.2~7.4,1×10⁵Pa灭菌20min,备用。

1.2 方法

1.2.1 放线菌的分离:向1g海泥中加入15mL无菌海水,55℃孵育6min,梯度稀释后涂布于分离培养基平板,在28℃培养6d~10d,将菌落挑出划线分离纯化,观察和排重。

1.2.2 放线菌提取物的制备:将上述所得放线菌从固体斜面培养基取适量接种到含有10mL发酵培养基的50mL螺口管中,28℃、240r/min振荡培养15d。将菌体及上清混合液超声破碎,加入20mL乙酸乙酯充分振荡后静止过夜,6000r/min离心,取上清液低温浓缩至干,干燥物用100μL DMSO溶解,备用。

放线菌提取物大量制备时接种到含有150mL培养基的500mL三角瓶中,28℃、240r/min振荡培养15d,萃取方法同上,粗提物干燥后称重,DMSO溶解至100mg/mL。

1.2.3 群体感应抑制活性的筛选:15mL融化的固体LB培养基冷却至40℃,加入100μL过夜培养的紫色杆菌CV026菌液、15μL5mmol/L的C6-HSL和15μL20mg/mL的卡那霉素,混匀后倒平板^[13]。待平板凝固后,于30℃培养1h,然后用打孔器打孔,每个孔内加3μL提取物,然后30℃培养18h,观察结果。

1.2.4 WA-7提取物对紫色杆菌CV026生长的影响^[14]:将生长至对数期的紫色杆菌CV026用新鲜LB稀释至OD₆₀₀为0.05,均匀分装至5个试管中,分别加WA-7提取物至终浓度为0、200mg/L、300mg/L、400mg/L、600mg/L和终浓度为5mg/L的庆大霉素,空白用DMSO补平。30℃、225r/min振荡培养,每隔4h测其OD₆₀₀。

1.2.5 WA-7 提取物对紫色杆菌 CV026 紫色菌素产量的影响: 将过夜培养的紫色杆菌 CV026 用新鲜 LB 稀释至 OD_{600} 为 0.20, 分装至 6 组试管中, 每管 5 mL, 每组 3 个平行。各组分别加入 I: 0 mmol/L C6-HSL、WA-7 提取物; II: 5 mmol/L C6-HSL、0 mmol/L WA-7 提取物; III: 5 mmol/L C6-HSL、50 mg/L WA-7 提取物; IV: 5 mmol/L C6-HSL、100 mg/L WA-7 提取物; V: 5 mmol/L C6-HSL、200 mg/L WA-7 提取物; VI: 7.5 mmol/L C6-HSL、200 mg/L WA-7 提取物; 30°C、225 r/min 振荡培养 18 h。

定量紫色菌素方法为^[15]: 吸取 1 mL 菌液于 Eppendorf 管, 13000 r/min 离心 10 min, 使紫色菌素充分沉淀。除去上清液, 加 1 mL DMSO 于 Eppendorf 管, 充分振荡使紫色菌素溶解于 DMSO。13000 r/min 再离心 10 min, 沉淀菌体及碎屑。测定 OD_{585} 处的光吸收。

1.2.6 WA-7 提取物对野生型紫色杆菌 ATCC31532 总蛋白酶的影响: 将过夜培养的紫色杆菌 ATCC31532 用新鲜 PTSB 培养基稀释至 OD_{600} 为 0.10, 分装至 4 组试管中, 每管 5 mL, 每组 3 个平行, 分别加入 WA-7 提取物至终浓度为 0、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L, 30°C, 225 r/min 振荡培养 15 h。

总蛋白酶量测定方法按 Rudrappa T 和 Bais HP 总结的方法^[12], 首先将菌液离心除去菌体, 将上清用 0.22 μm 滤膜过滤, 除尽上清中的细菌; 将 100 μL 上清加入 400 μL 0.8% 的人工底物偶氮酪蛋白溶液(用 pH 7.0 的 50 mmol/L K_2HPO_4 配制), 37°C 反应 2 h; 随后加 500 μL 1.5 mol/L HCl 溶液中止反应, 冰浴 30 min; 12000 r/min 离心 5 min, 将上清吸出, 加 500 μL 1 mol/L NaOH 中和反应体系; OD_{400} 测其紫外吸收。

测试 WA-7 提取物对总蛋白酶活性的影响时, 将过夜培养的紫色杆菌 ATCC31532 制备上清液, 分成 2 组, 每组 3 个平行, 分别加 0 和终浓度 400 mg/L 的 WA-7 提取物, 37°C 放置 30 min, 然后方法同上测试酶活。

1.2.7 16S rDNA 序列测定和系统发育分析: 提取菌株基因组 DNA, 作为 PCR 模板。16S rDNA 基因克隆的 PCR 引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACGGHTACCTTACGACTT-3'。PCR 反应条件: 95°C 预变性 4 min; 95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1.5 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸

10 min。PCR 产物经胶回收纯化后由上海生物工程有限公司测序。测序结果先利用 Blast 软件从 GenBank 与 EMBL 等数据库中调出相关的放线菌的 16S rDNA 序列, 用 Clustal X1.8 软件包排序, 随后用 Mega 4.1 软件进行序列分析, 采用 Neighbour-joining 法进行系统发育树的构建。将所测得的 16S rDNA 序列提交 GenBank。

2 结果

2.1 海洋放线菌的分离及提取物制备

从胶州湾海泥分离到放线菌 71 株, 经形态学初步排重后得 47 株, 分别命名为 WA-1 至 WA-47。小体积发酵上清液经乙酸乙酯萃取, 干燥, 制得提取物 47 份。

2.2 提取物抑制群体感应活性的筛选

检测菌株紫色杆菌 CV026 为野生型紫色杆菌 ATCC31532 的 C6-HSL 信号分子合成酶基因 *cviI* 缺失突变体, 通过外加适量的 C6-HSL 信号分子, 能诱导其发生群体感应, 产生紫色表型; 如果筛选样品中含有群体感应抑制因子, 则该菌产生紫色菌素的量降低^[13]。将 47 份放线菌提取物进行群体感应抑制活性筛选, 结果表明大部分样品能够抑制紫色杆菌 CV026 生长或能够杀死紫色杆菌 CV026, 表现为透明的抑菌圈(如图 1 中庆大霉素产生的抑菌圈 4); 而放线菌 WA-7 提取物不抑制紫色杆菌 CV026 生长, 只抑制紫色菌素的产生, 表现为不透明的白色浑浊圈(如图 1 中 2 和 3)。这表明 WA-7 提取物可能具有群体感应抑制活性。

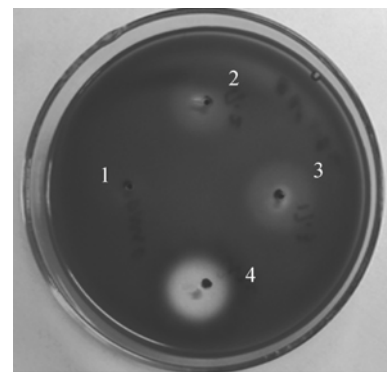


图 1 WA-7 提取物抑制紫色菌素的产生

Fig. 1 Inhibition of violacein production by WA-7 extract

注: 1: 对照; 2: 0.2 mg WA-7 提取物; 3: 0.3 mg WA-7 提取物; 4: 25 μg 庆大霉素。

Note: 1: Blank; 2: 0.2 mg WA-7 extract; 3: 0.3 mg WA-7 extract; 4: 25 μg gentamicin.

2.3 WA-7 提取物对紫色杆菌 CV026 生长的影响
不同浓度的 WA-7 提取物对紫色杆菌 CV026 生长的影响如图 2 所示, WA-7 提取物在 0~400 mg/L 对紫色杆菌 CV026 的生长没有抑制作用, 这说明该提取物对紫色菌素的抑制不是通过抑制菌体生长实现的。

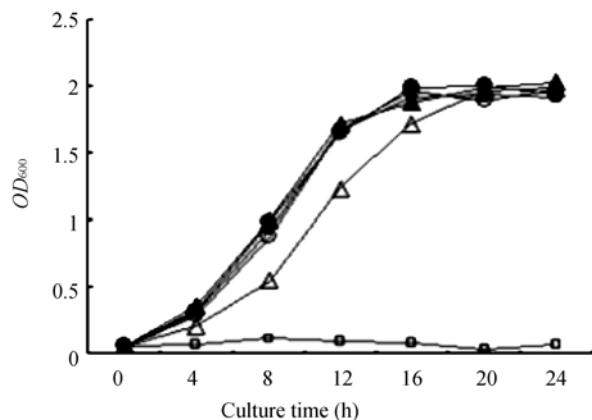


图 2 WA-7 提取物对紫色杆菌 CV026 生长的影响
Fig. 2 Effect of WA-7 extract on the growth of *C. violaceum* CV026

注: ●—●: 空白对照; ▲—▲: 200 mg/L WA-7 提取物; ■—■: 300 mg/L WA-7 提取物; ○—○: 400 mg/L WA-7 提取物; △—△: 600 mg/L WA-7 提取物; □—□: 5 mg/L 庆大霉素。

Note: ●—●: Blank; ▲—▲: 200 mg/L WA-7 extract; ■—■: 300 mg/L WA-7 extract; ○—○: 400 mg/L WA-7 extract; △—△: 600 mg/L WA-7 extract; □—□: 5 mg/L gentamicin.

2.4 WA-7 提取物对紫色杆菌 CV026 紫色菌素产量的影响

紫色菌素在紫色杆菌中是受群体感应严格调控的^[15], 不同浓度的 WA-7 提取物对紫色杆菌 CV026 紫色菌素产量的影响如图 3 所示, WA-7 提取物可有效抑制 C6-HSL 诱导产生的紫色菌素, 并且呈浓度依赖性; 当补加 C6-HSL 时, 紫色菌素的产量又能

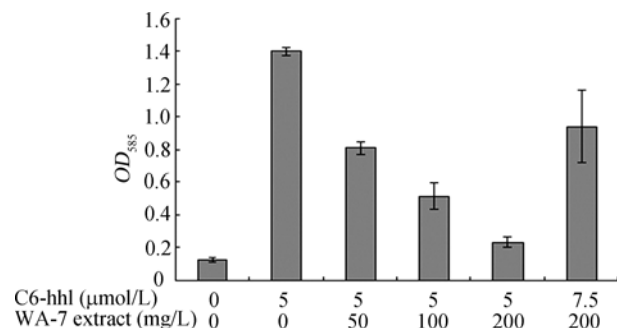


图 3 不同浓度 WA-7 提取物和 C6-HSL 对紫色菌素的影响
Fig. 3 Inhibition of violacein production by different concentration of WA-7 extract

得到一定的恢复。这进一步说明 WA-7 提取物是通过抑制紫色杆菌 CV026 群体感应系统来降低其紫色菌素产量的。

2.5 WA-7 提取物对野生型紫色杆菌 ATCC31532 总蛋白酶的影响

在紫色杆菌中胞外蛋白酶的产量受群体感应系统调控^[16]。我们测试不同浓度 WA-7 提取物对野生型紫色杆菌 ATCC31532 总蛋白酶的影响。首先测定了 WA-7 提取物对总蛋白酶活性的影响, 结果如图 4 A, 表明了 WA-7 提取物对总蛋白酶活性没有显著影响。不同浓度 WA-7 提取物处理的紫色杆菌 ATCC31532 胞外总蛋白酶的产量(用酶活性表示)如图 4 B 所示, WA-7 提取物能有效降低紫色杆菌胞外蛋白酶的产量, 并呈浓度依赖性。这一结果也进一步表明 WA-7 提取物确实抑制了紫色杆菌群体感应系统。

2.6 16S rDNA 序列测定和系统发育分析

菌株 WA-7 的 16S rDNA 测序后得 1344 bp 部分序列(GenBank 登录号为 FJ560748), 将其与 GenBank 等数据库中的 16S rDNA 序列进行比较, 发现 WA-7 应属 *Streptomyces* 属, 与该属合格发表种卡伍尔链霉菌华盛顿亚种(*Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis*) 序列同源性最高, 达到 100%。采用 Neighbour-joining 法构建系统发育树(图 5), 表明 WA-7 与卡伍尔链霉菌华盛顿亚种的进化距离相隔最近。

3 讨论

细菌耐药是目前人类面临的重大生存危机。现在临床上广泛使用的抗生素都是以细菌的蛋白质合成、细胞壁合成、DNA 超螺旋、叶酸合成等为靶点, 通过干扰这些重要生命过程直接杀死微生物或抑制微生物生长来实现抗感染的。在这种生存压力下, 微生物极易产生耐药性。显然以传统方法筛选获得的抗生素无法从根本上解决细菌的耐药性问题^[2]。而以细菌的群体感应系统为靶标筛选的抗菌药物, 与传统的抗生素的作用机制完全不同, 只抑制细菌群体感应调控的致病行为, 不影响细菌的生长, 因此, 理论上不会产生细菌耐药性^[5]。

海洋环境独特, 是一个正在开发的重要生物资源宝库。海洋微生物种类约为陆生微生物的 20 倍以上, 代谢途径特异, 可产生完全不同于陆地微生

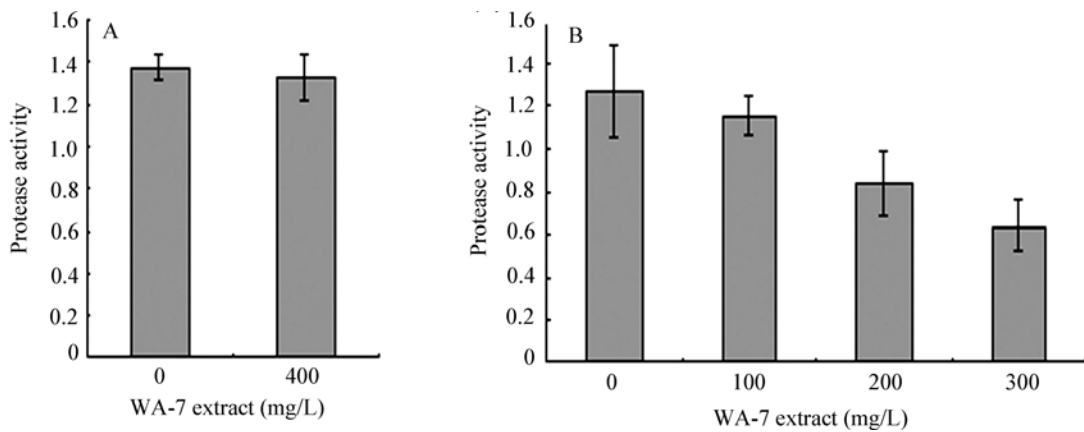


图 4 WA-7 提取物对总蛋白酶活及酶量的影响

Fig. 4 Inhibition of Proteases productivity by WA-7 extract

注: A: WA-7 提取物对上清中总蛋白酶活的影响; B: WA-7 提取物对总蛋白酶产量的影响.

Note: A: The effects of WA-7 extract on proteases activity; B: The effect of WA-7 extract on proteases productivity.

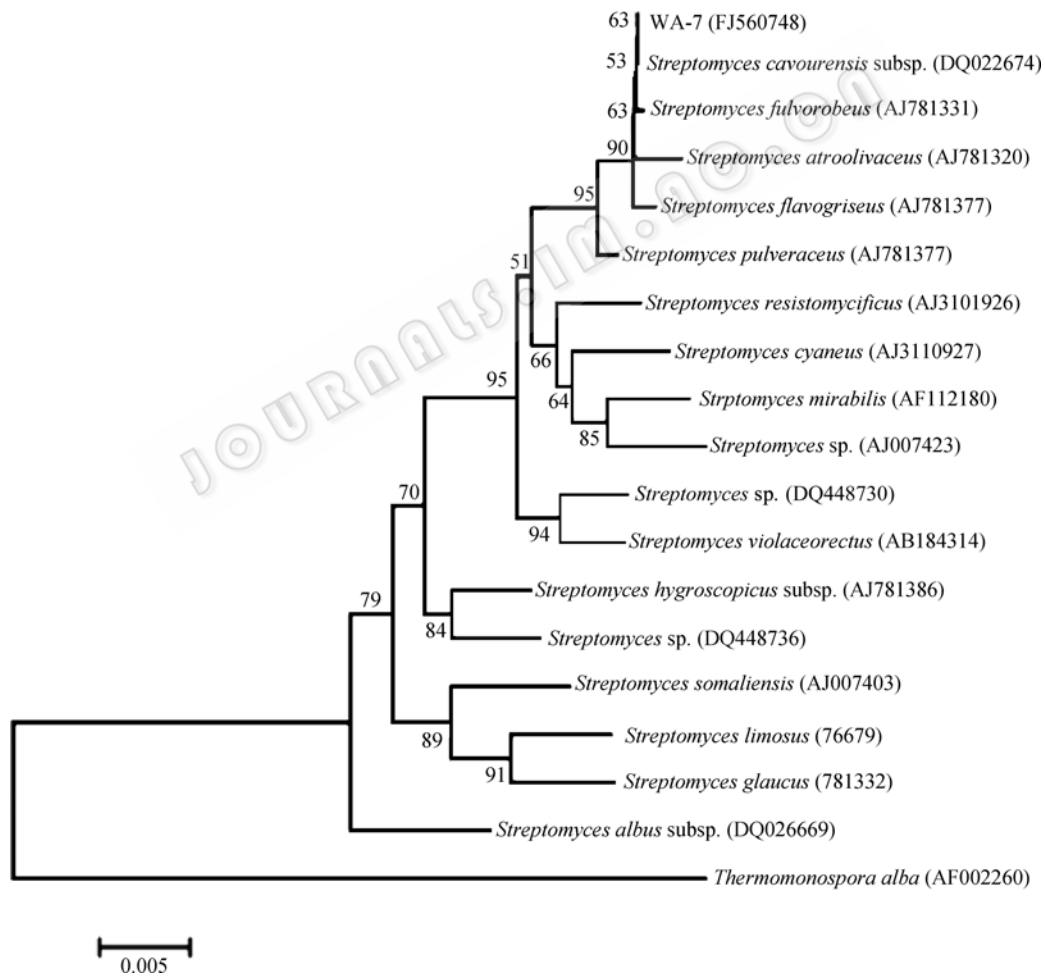


图 5 WA-7 及近缘属种以 16S rDNA 序列为基础构建的系统发育树状关系图

Fig. 5 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among WA-7 and other related strains

注: 线段 0.005 代表 1/200 进化距离单位; 分支上的树值为自举 1000 次的结果.

Note: Scale bar: 0.005 nucleotide substitution per 200 nucleotides of 16S rDNA sequence; Nuerals on branches are the supporting percentage by 1000 replicates.

物的结构新颖生物活性物质^[17]。目前的天然抗菌药物大约有 2/3 来自放线菌,且近年来不断有新的海洋放线菌菌种及其产生的新抗菌药物的报道^[18,19]。我们从胶州湾海泥中分离海洋放线菌,并用紫色杆菌 CV026 筛选模型对放线菌提取物进行群体感应抑制活性的筛选,得到 WA-7 提取物具有群体感应抑制活性,能够有效抑制紫色杆菌群体感应调控的紫色菌素和胞外蛋白酶的产生,且在有效浓度范围不影响细菌生长。因此,WA-7 发酵提取物中存在抑制群体感应的有效成分,具有进一步研究与开发的价值。目前 WA-7 提取物中功能化合物的分离纯化和该提取物影响紫色杆菌群体感应的具体机制正在进一步研究中。

致谢:感谢美国 Texas State University McLean RJC 教授提供菌株紫色杆菌 CV026 和紫色杆菌 ATCC31532。

参 考 文 献

- [1] Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**(5): 452–456.
- [2] Bush, K. Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clin Microbiol Infect*, 2004, **10**(4): 10–17.
- [3] Bassler BL. Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse. *Harvey Lect*, 2004, **100**: 123–142.
- [4] Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*, 2005, **7**(4): 459–471.
- [5] Hentzer M, Eberl L, Nielsen J, *et al.* Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections. *BioDrugs*, 2003, **17**(4): 241–250.
- [6] Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*, 2003, **112**(9): 1300–1307.
- [7] Hentzer M, Wu H, Andersen JB, *et al.* Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo J*, 2003, **22**(15): 3803–3815.
- [8] Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, *et al.* Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol*, 2005, **187**(5): 1799–1814.
- [9] Park J, Kaufmann GF, Bowen JP, *et al.* Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis*, 2008, **198**(8): 1198–1201.
- [10] McClean KH, Winson MK, Fish L, *et al.* Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 1997, **143** (Pt 12): 3703–3711.
- [11] Martinelli D, Grossmann G, Séquin U, *et al.* Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiol*, 2004, **4**: 25.
- [12] Zhu H, Sun SJ. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract. *Curr Microbiol*, 2008, **57**(5): 418–422.
- [13] Rudrappa T, Bais HP. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J Agric Food Chem*, 2008, **56**(6): 1955–1962.
- [14] Bosgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Ugur A, *et al.* Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sardasica*. *Curr Microbiol*, 2007, **55**(2): 114–118.
- [15] Choo JH, Rukayadi Y, Hwang JK. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Lett Appl Microbiol*, 2006, **42**(6): 637–641.
- [16] Thompson JM, Winson MK, Bycroft BW, *et al.* Quorum sensing regulation of protease production in *Chromobacterium violaceum*. In Abstracts of the 133rd Ordinary Meeting of the Society for General Microbiology. Society for General Microbiology, 1996, pp.8–26
- [17] Munro MH, Blunt JW, Dumdei EJ, *et al.* The discovery of marine natural products with therapeutic potential. *Biotechnology*, 1994, **26**: 109–174.
- [18] Cho KW, Lee HS, Rho JR, *et al.* New lactone-containing metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J Nat Prod*, 2001, **64**(5): 664–667.
- [19] Mukku VJ, Speitling M, Laatsch H, *et al.* New butenolides from two marine *streptomyces*. *J Nat Prod*, 2000, **63**(11): 1570–1572.