

### III 型分泌系统抑制剂对铜绿假单胞菌 PAO1 毒性因子的影响

顾玲玲<sup>1Δ</sup> 吴小刚<sup>2Δ</sup> 袁小琛<sup>2</sup> 方力为<sup>2</sup> 张成芳<sup>1</sup> 陈新<sup>1\*</sup> YANG Ching-Hong<sup>2\*</sup>

(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】进一步研究 III 型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)抑制剂对条件致病菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 的 TTSS 相关蛋白、鞭毛和纤毛等主要毒性因子的影响, 评估 TTSS 抑制剂的防治效果及潜在风险。【方法】构建 TTSS 效应蛋白合成基因 *exoY* 和 *exoT* 转录报告质粒 pAT-*exoY*、pAT-*exoT*, 并将其转入菌株 PAO1 中。菌株 PAO1(pAT-*exoY*)、PAO1(pAT-*exoT*) 与 TTSS 抑制剂共同培养后, 检测 *exoY* 和 *exoT* 的表达。通过 SDS-PAGE 检测 TTSS 抑制剂对鞭毛结构蛋白 FliC 的影响。将 PAO1 单菌落穿刺接种于含有 TTSS 抑制剂的 1%琼脂糖平板, 观察细菌纤毛介导的蹭行运动(Twitching motility)。【结果】转录报告实验结果表明 4 个 TTSS 抑制剂可显著抑制 *exoY* 和 *exoT* 的转录; 化合物 TS52、TS53 和 TS94 虽不影响胞内 TTSS 针状顶端结构蛋白 PcrV 的产量, 但可抑制 PcrV 蛋白的胞外运输。化合物 TS53 可降低鞭毛结构蛋白 FliC 的产生。另外, 化合物 TS52、TS53 和 TS88 可降低菌株 PAO1 的蹭行运动能力, 但 TS94 可提高菌株 PAO1 的这种运动能力。【结论】TTSS 抑制剂除通过抑制 TTSS 表达外, 还可能通过影响其它毒性因子如鞭毛的合成、IV 型分泌系统介导的蹭行运动等方式影响菌株 PAO1 致病性。

**关键词:** *Pseudomonas aeruginosa*, 抑制剂, III 型分泌系统, 毒性因子

### Regulation of type III secretion system inhibitors on virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

GU Ling-Ling<sup>1Δ</sup> WU Xiao-Gang<sup>2Δ</sup> YUAN Xiao-Chen<sup>2</sup> FANG Li-Wei<sup>2</sup>  
ZHANG Cheng-Fang<sup>1</sup> CHEN Xin<sup>1\*</sup> YANG Ching-Hong<sup>2\*</sup>

(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] To study the effect of type III secretion system (TTSS) inhibitors on

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 21272029); The Research Growth Initiative of the University of Wisconsin-Milwaukee; 常州市国际科技合作项目(No. CZ20130024)

\*通讯作者: 陈新: Tel/Fax: 86-519-86334598; ✉: xinchen@cczu.edu.cn

YANG Ching-Hong: Tel/Fax: 1-4142296331; ✉: chyang@uwm.edu

Δ并列第一作者

收稿日期: 2014-02-13; 接受日期: 2014-04-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-17

virulence factors, TTSS, bacterial flagella and pilin, of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **[Methods]** The transcriptional reporters of *exoT* and *exoY* genes were used to monitor the *exoT* and *exoY* expression in the wild type strain PAO1 supplemented with TTSS inhibitors. The protein level of FliC was analyzed by SDS-PAGE. The twitching motility mediated by bacterial pilin was examined on the BM2 medium. **[Results]** Transcriptional fusion assay indicated that the expression of *exoT* and *exoY* was decreased when the TTSS inhibitors were supplemented. Although the production of PcrV was not changed in the cells when compounds TS52, TS53 and TS94 were added in the medium, the translocation of PcrV protein in the medium was decreased. The level of flagella structural protein FliC was decreased when the compound TS53 was supplemented in the medium. In addition, compounds TS52, TS53 and TS88 inhibited the ability of twitching motility, whereas TS94 increased the twitching motility. **[Conclusion]** Besides the TTSS effector genes, TTSS inhibitors influence other virulence factors, such as flagella and type IV pilus-dependent twitching motility. These data will provide the theoretical basis for further clinical trials.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Inhibitor, Type III secretion system, Virulence factor

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种革兰氏阴性条件致病菌,易感染免疫系统受损的人群,同时也是囊肿性纤维化(Cystic fibrosis, CF)病人的主要致病菌。前期研究发现多种毒性因子参与 *P. aeruginosa* 病原菌的致病过程<sup>[1-2]</sup>。其中 III 型分泌系统(Type III secretion system, TTSS)将效应蛋白(Effector)注射到寄主细胞中,这些效应蛋白则影响宿主细胞基因表达,抑制宿主的免疫反应并清除细菌的能力<sup>[3]</sup>。病原菌 *P. aeruginosa* 中共发现 4 个效应蛋白:胞外酶 S (ExoS)、胞外酶 T (ExoT)、胞外酶 U (ExoU)和胞外酶 Y (ExoY),而 ExoS 和 ExoY 不会同时存在于一个菌株之中<sup>[4-5]</sup>。临床对照研究数据表明,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<sup>[6]</sup>。

TTSS 编码及相关调控基因与细菌鞭毛合成及相关调控基因具有较高的同源性<sup>[7]</sup>。鞭毛是细菌菌体表面的一种细长特殊结构,是细菌的运动器官。细菌鞭毛在趋化、附着、毒性因子的产生、生物膜形成及定殖过程中起着重要的作用,是潜在的致病因子之一<sup>[8]</sup>。多种动物模式侵染实验表明 *P. aeruginosa* 鞭毛缺失突变体的侵染能力明显低于野生菌株<sup>[9]</sup>。菌株 *P. aeruginosa* 中,鞭毛主要组分由 *fliC* 编码的 FliC 蛋白构成,而 *fliC* 受依赖于  $\sigma^{54}$  转录激活子 FleQ 调控<sup>[10]</sup>。除 TTSS 和鞭毛等毒性因子外,IV 型系统也在 *P. aeruginosa* 致病过程中发挥重要作用。IV 型

系统菌毛介导的蹭行运动(Twitching motility)是生物膜形成的第一阶段(不可逆性黏附阶段)必不可少的因素,并影响后期生物膜的形态与结构<sup>[11]</sup>。而 *P. aeruginosa* 菌株在病人肺部感染形成的囊性纤维变性、肺结核、尿路感染、呼吸道感染和大约 25% 的肾结石等症状都是由生物膜造成的<sup>[12]</sup>。

本文利用前期筛选得到的 TTSS 抑制剂 5a (本文命名为 TS52)、5e (本文命名为 TS53)、5o (本文命名为 TS88)和 5r (本文命名为 TS94)为研究对象<sup>[13]</sup>,进一步研究这些化合物对 TTSS 其它效应蛋白以及 TTSS 结构蛋白的影响,并对细菌鞭毛的形成、IV 型系统介导的蹭行运动能力等性状进行研究,更加全面地分析这些化合物对 *P. aeruginosa* 菌株毒性因子的影响,为这些化合物将来临床前实验提供理论依据(图 1)。

## 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。菌株 *P. aeruginosa* PAO1 及 *Escherichia coli* DH5a 于 LB 培养基中 37 °C 培养 12-16 h。菌株 PAO1 TTSS 诱导培养基配方为(g/L):胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、200 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 氨三乙酸(Nitritotriacetic acid, NTA)。BM2 培养基配方参考文献[14]。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。

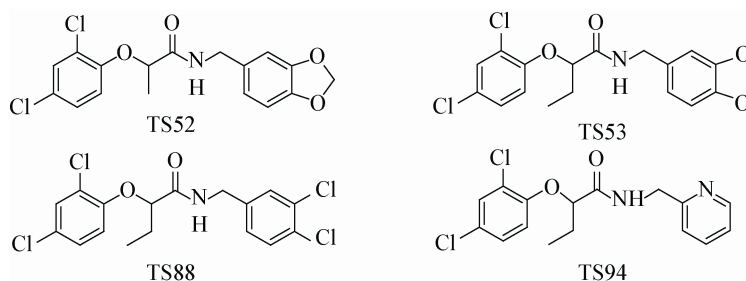
图1 本文使用的 $\alpha$ -苯氧基酰胺化合物结构式Figure 1 The  $\alpha$ -phenoxyacetamide compounds used in this study

表1 本实验所用菌株、质粒和引物

Table 1 Bacteria strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒或引物 Strains, plasmids or primers	描述 Description	参考文献或来源 Reference or source
Strains		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild type; Ap <sup>r</sup>	
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169 (<math>\phi</math>80lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[15]
Plasmids		
pPROBE-AT	Promoter-probe vector; Cb <sup>r</sup>	[16]
pAT-exoS	pPROBE-AT containing a 510-bp fragment containing <i>exoS</i> promoter region; Cb <sup>r</sup>	[17]
pAT-exoY	pPROBE-AT containing a 360-bp fragment containing <i>exoY</i> promoter region; Cb <sup>r</sup>	This study
pAT-exoT	pPROBE-AT containing a 300-bp fragment containing <i>exoT</i> promoter region; Cb <sup>r</sup>	This study
Primers		
exoYBamHI	5'-ATGGATCCGACGGCGTACTTCGCGAC-3'	
exoYEcoRI360	5'-ATGAATTCTGCATCCGCAGGGCGCAG-3'	
exoTBamHI	5'-TAGGATCCCACCAAGCCCGTCGCTGC-3'	
exoTEcoRI300	5'-ATGAATCCCAGGGCCCGCCACGGC-3'	

注: Ap<sup>r</sup>和 Cb<sup>r</sup>分别表示抗氨基青霉素和羧苄青霉素。

Note: Ap<sup>r</sup> and Cb<sup>r</sup> indicate resistance to ampicillin and carbenicillin, respectively.

## 1.2 主要试剂和仪器

*Taq* 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。 $\alpha$ -苯氧基酰胺类化合物 TS52、TS53、TS88 和 TS94 由本实验室合成,具体合成方法参照文献[13]。ExoS 多克隆抗体购自 Accurate Chemical & Scientific 公司; RNA 聚合酶抗体购自 Neoclone 公司; PcrV 抗体为 Dara W. Frank 博士馈赠; AP 标记的羊抗鸡二抗和 HRP 标记的羊抗兔二抗均购自

SouthernBiotech 公司。HRP 显影底物(ECL prime)购自 GE 公司。荧光激活细胞分选仪(Fluorescence-activated cell sorter; FACS)购自 BD 公司;分光光度计购自 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[18]。

## 1.4 构建 *exoY-gfp* 和 *exoT-gfp* 转录融合质粒

以 *P. aeruginosa* PAO1 基因组为模板,利用引物 exoYBamHI/exoYEcoRI360 和 exoTBamHI/exo

TEcoRI300 PCR 分别扩增 *exsY* 和 *exoT* 启动子区域。得到的 DNA 片段用 *Bam*HI-*Eco*RI 酶切后, 与经 *Bam*HI-*Eco*RI 酶切的 pPROBE-AT 连接得到 *exoY* 和 *exoT* 转录融合质粒 pAT-*exoY* 和 pAT-*exoT*。将获得的载体利用电击的方法转入野生型菌株 PAO1 中。*exoY-gfp* 和 *exoT-gfp* 转录融合结构检测方法参照文献[17]。

### 1.5 Western blot 检测 ExoS(T)和 PcrV 蛋白水平

菌株 PAO1 于 LB 培养液中过夜培养后, 按 1:1 000 稀释到含有 TTSS 抑制剂的诱导培养液中 (TTSS 抑制剂终浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ , DMSO 为对照), 培养 6 h 后, 离心收集菌体, 检测 PAO1 胞内 EoxY、EoxT 和 PcrV 蛋白水平。PAO1 胞外分泌的蛋白 PcrV 收集方法参照文献[19]。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后, 用 Bio-Rad 半干转膜仪将蛋白样品转移到 PVDF 膜中。5%脱脂奶粉过夜封闭后, 添加 ExoS 抗体或 PcrV 抗体(1:5 000 稀释)反应 1 h; PVDF 膜经 PBST 清洗 3 次后, 加入对应的二抗 (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  $\text{MgCl}_2$ )中即可检测 ExoS(T)蛋白水平; 取等量 HRP 显影底物溶液 A 和溶液 B, 均匀混合后滴加到 PVDF 膜上以检测 PcrV 蛋白水平。

### 1.6 鞭毛结构蛋白 FliC 的检测

将菌株 PAO1 培养于含有 TTSS 抑制剂(终浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ )的诱导培养液中, 培养 6 h 后, 取 1 mL 菌液, 2 000 $\times g$  室温离心 5 min。将 850  $\mu\text{L}$  上清与 150  $\mu\text{L}$  预冷的 100% TCA 混合静置 30 min。13 000 $\times g$  室温离心 5 min, 收集沉淀, 沉淀经丙酮清洗后, 溶解于适量 PBS 溶液中。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后, 考马斯亮蓝染色检测 FliC 蛋白水平。具体方法参照文献[11]。

### 1.7 细菌纤毛介导的蹭行运动 (Twitching motility)及鞭毛介导的群集运动能力 (Swarming motility)检测

为检测蹭行运动, 配制含有 TTSS 抑制剂

(TTSS 抑制剂终浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ , DMSO 为对照)的 1% BM2 培养基, 用无菌牙签挑选单菌落穿刺接种于平板交接处, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 记录细菌在平板与琼脂之间运动环的直径。为检测群集运动能力, 将过夜培养的菌液滴到含有 TTSS 抑制剂 (TTSS 抑制剂终浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ , DMSO 为对照)的 0.5% BM2 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后观察结果。具体方法参照文献[12]。

## 2 结果与分析

### 2.1 TTSS 抑制剂对 TTSS 其它效应蛋白的影响

本实验室利用 *exoS-gfp* 转录融合结构从 21 个  $\alpha$ -苯氧基酰胺类化合物中筛选得到可显著影响 TTSS 效应蛋白编码基因 *exoS* 表达的化合物 TS52、TS53、TS88 和 TS94<sup>[13]</sup>。为进一步研究这些化合物对 TTSS 的抑制作用, 本文构建了另外两个效应蛋白合成基因 *exoT* 和 *exoY* 转录报告融合结构 *exoT-gfp* 和 *exoY-gfp*, 并检测其表达。结果表明这些化合物除影响 *exoS* 表达外(图 2A), 还可显著影响 *exoY* 和 *exoT* 的转录(图 2B、C)。Western blot 实验进一步表明这些化合物可显著抑制 ExoS 和 ExoT 蛋白的产生(图 2D)。

### 2.2 $\alpha$ -苯氧基酰胺类化合物对菌株 PAO1 TTSS 结构组件的影响

菌株 PAO1 中, PcrV 蛋白是 TTSS 针状结构顶端的结构组件, 而且是 TTSS 中 PopB 和 PopD 蛋白组装及运输到寄主细胞必需的, 缺失 *pcrV* 可显著影响 TTSS 功能及菌株的致病性<sup>[19]</sup>。为进一步研究 TTSS 抑制剂对菌株 PAO1 TTSS 的影响, 本文检测了这些化合物对 PcrV 蛋白的影响。研究结果表明, 这些化合物虽不影响胞内 PcrV 蛋白的水平, 但除化合物 TS88 外, TS52、TS53 和 TS94 可显著抑制 PcrV 蛋白向胞外的分泌(图 3)。

### 2.3 TTSS 抑制剂对鞭毛结构蛋白 FliC 及其介导的群集运动能力 (Swarming motility)的影响

多种动物侵染实验结果表明鞭毛在菌株 PAO1 的致病过程中起到了重要作用<sup>[9-10]</sup>。为研究 TTSS

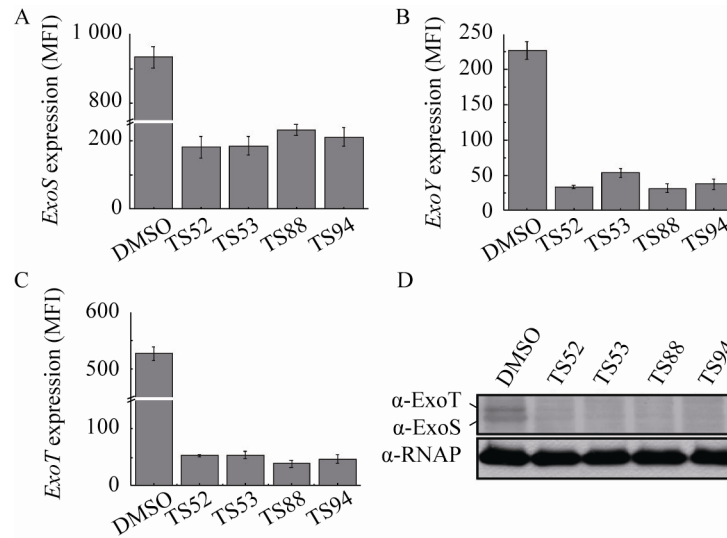


图2  $\alpha$ -苯氧基酰胺类化合物影响菌株 PAO1 TTSS

Figure 2 The effect of TS52, TS53, TS88 and TS94 on TTSS of *P. aeruginosa* PAO1

注：将携带质粒 pAT-exoS (A), pAT-exoT (B)和 pAT-exoY (C)的菌株 PAO1 在含有 TTSS 抑制剂的诱导培养液中培养 6 h 后,测定 *exoT* 和 *exoY* 的表达；为检测 ExoT 和 ExoS 蛋白的产量,菌株 PAO1 生长在 TTSS 诱导培养基中,并将 TTSS 抑制剂(终浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ )添加到诱导培养液中,培养 6 h 后取样。使用 ExoS 多克隆抗体检测菌株 PAO1 中 ExoS 和 ExoT 蛋白的产量(以 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基多克隆抗体检测蛋白上样量)(D)。

Note: Promoter activities of *exoS* (A), *exoY* (B), and *exoT* (C) in *P. aeruginosa* PAO1 were measured in the TTSS-induced medium with the inhibitors TS52, TS53, TS88 and TS94. The same volume of DMSO was added into the medium as a negative control. Values of mean fluorescence intensity (MFI) were an average GFP fluorescence intensity of total bacterial cells with SD. To check the levels of ExoS and ExoT, *P. aeruginosa* PAO1 strain was grown in TTSS induction medium supplemented with 250  $\mu\text{mol/L}$  compounds. The Western blot was performed using an anti-ExoS polyclonal antibody. An antibody directed against RNA polymerase subunit  $\beta$  subunit ( $\alpha$ -RNAP) was used as a loading control (D). All experiments were performed in triplicate, and the  $x \pm s$  were indicated.

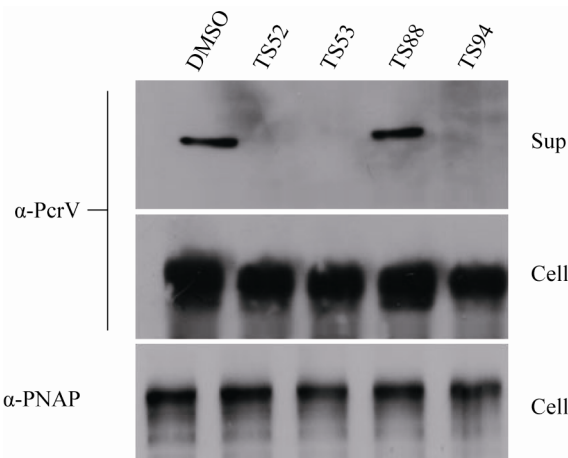


图3 TTSS 抑制剂影响菌株 PAO1 PcrV 蛋白的产量  
Figure 3 The effect of TTSS inhibitors on the production of PcrV protein

注：菌株 PAO1 生长于含有 TTSS 抑制剂的诱导培养基中,培养 6 h 后,按 1.5 节分别取样,使用 PcrV 多克隆抗体检测菌株 PAO1 中 PcrV 蛋白的产量。

Note: *P. aeruginosa* PAO1 strain was grown in TTSS-induced medium with TTSS inhibitors. The western blot was performed using an anti-PcrV polyclonal antibody. An antibody directed against RNA polymerase subunit  $\beta$  subunit ( $\alpha$ -RNAP) is used as a loading control. All experiments were performed in triplicate.

抑制剂是否影响鞭毛的形成,本文检测了各处理中鞭毛主要结构蛋白 FliC 的产量。研究结果表明 4 个化合物中只有化合物 TS53 可显著抑制 FliC 的合成(图 4A)。同样,TTSS 抑制剂 TS53 也可显著抑制鞭毛介导的群集运动能力,而其它 3 个化合物则不影响菌株 PAO1 群集运动能力(图 4B)。

#### 2.4 TTSS 抑制剂影响菌株 PAO1 蹭行运动能力(Twitching motility)

菌株 PAO1 IV 型纤毛介导的蹭行运动与该菌株早期黏附寄主组织细胞密切相关,IV 型纤毛突变的菌株可丧失蹭行运动的能力,并导致生物膜(Biofilm)形成缺陷<sup>[11]</sup>。为研究 TTSS 抑制剂是否影响 IV 型系统,本文检测了 TTSS 抑制剂对菌株 PAO1 蹭行运动能力的影响。研究结果发现化合物 TS52、TS53 和 TS88 可显著降低菌株 PAO1 的蹭行运动,然而化合物 TS94 则可显著提高菌株 PAO1 的蹭行运动(图 5)。

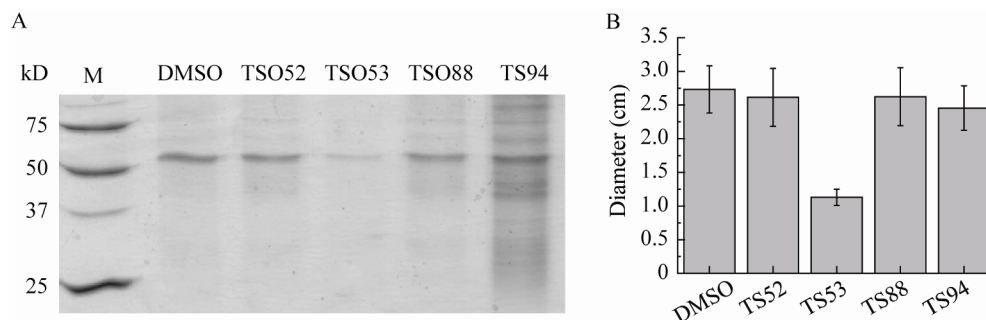


图 4 TTSS 抑制剂影响鞭毛结构蛋白 FliC 及群集运动能力

Figure 4 The effect of TTSS inhibitors on the flagella structural protein FliC and swarming motility

注: M: Marker; A: 菌株 PAO1 在添加有抑制剂的 TTSS 诱导培养液培养 6 h 后, 取样, SDS-PAGE 检测 FliC 蛋白含量; B: 将 PAO1 菌液滴到 0.5% BM2 培养基中检测群集运动能力。

Note: M: Marker; A: *P. aeruginosa* PAO1 was grown in the TTSS-induced medium with inhibitors. The SDS-PAGE was performed to check the levels of FliC; B: Strain PAO1 was cultured on the 0.5% BM2 medium to measure the swarming motility. All experiments were performed in triplicate, and the  $x \pm s$  were indicated.

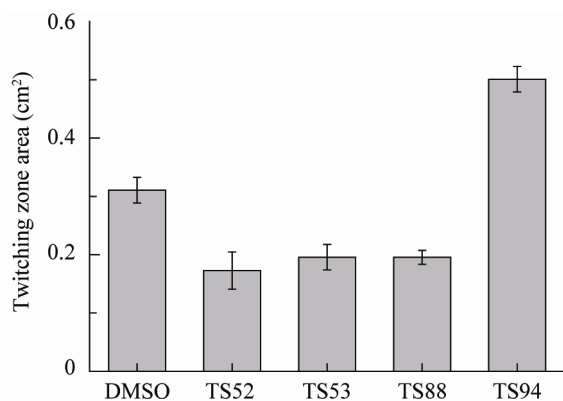


图 5 TTSS 抑制剂对菌株 PAO1 蹭行运动能力的影响  
Figure 5 The effect of TTSS inhibitors on the ability of twitching motility in strain PAO1

注: 将菌株 PAO1 穿刺到含有 TTSS 抑制剂的 BM2 培养基与平板之间, 37 °C 培养 24 h 检测蹭行运动形成的菌圈直径。

Note: Strain PAO1 was stabbed into the bottom of a petri dish containing the above 1% BM2 medium to measure the twitching motility. The zone of twitching motility was visualized by staining with 1% crystal violet. All experiments were performed in triplicate, and the  $x \pm s$  were indicated.

### 3 讨论

近年来, 由于传统抗生素药物的不合理使用, 在临床治疗过程中出现了许多耐药性菌株。细菌耐药性的不断增强, 可导致临床治疗的失败, 死亡的危险性也会增加。传统抗生素作用机制一般是直接杀死病原微生物, 而这也是导致耐药性菌株出现的

主要原因。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, 但 TTSS 系统并不是细菌生长所必需的, 因此寻找、设计以 TTSS 为靶标的抗生素成为很有前景的抗感染策略<sup>[20]</sup>。

前期研究表明  $\alpha$ -苯氧基酰胺类化合物 TS52、TS53、TS88 和 TS94 可抑制 TTSS 效应蛋白编码基因 *exoS* 的表达及蛋白的产生, 本文研究结果进一步表明这些化合物也可影响另外两个效应蛋白编码基因 *exoT* 和 *exoY* 的表达(图 2)。另外, 对 TTSS 针状结构顶端结构组件 PcrV 蛋白的分析发现, 除化合物 TS88 外, 其它 3 个化合物虽不影响胞内 PcrV 蛋白的水平, 但影响 PcrV 蛋白的分泌。因此这 3 个化合物可能影响到 III 型分泌系统的组装, 进而影响到 PcrV 蛋白从胞内向胞外的运输。而 TTSS 几乎所有基因都受到 AraC 转录激活因子家族成员 ExsA 的直接调控<sup>[21]</sup>。综上所述, 化合物 TS52、TS53 和 TS94 可能是通过影响 ExsA 的功能, 从而影响这些效应蛋白的产生。

分析化合物 TS52、TS53、TS88 和 TS94 的化学结构发现, 它们的基本骨架是  $\alpha$ -(2,4-二氯苯氧) 酰胺(图 1)。从这些化合物对菌株 PAO1 毒性因子的检测实验中发现, 这种结构骨架有利于抑制 TTSS 效应子产生(图 2), 然而它们的具体化学结构还是有很大区别: (1) 与 TS52 相比, 化合物 TS53

中酰胺侧链增加了 1 个碳原子,该化合物即可明显抑制鞭毛蛋白 FliC 的产生,因此对酰胺侧链的修饰可能有利于这类化合物对鞭毛蛋白 FliC 的抑制作用;(2) TS88 酰胺侧链的长度同 TS53 一样,为 3 个碳原子,但右侧苄基部分的取代基明显不同:TS53 右侧取代基是给电子的 3,4-(次甲基二氧)基团,而 TS88 右侧取代基是吸电子的 3,4-二氯基团,这种改变影响了抑制鞭毛蛋白 FliC 的功能;(3) 与 TS53 相比,TS94 右侧苄基部分取代基是吡啶,属于碱性基团,即氢键给体。TS94 右侧取代基化学性质的明显差异,影响到该化合物对 IV 型纤毛介导的蹭行运动的抑制作用。因此,今后设计和合成新型 TTSS 抑制剂,会在保持 $\alpha$ -(2,4-二氯苯氧)酰胺基本骨架的基础上,适当增加酰胺侧链的长度,并在右侧苄基上尝试其他的给电子取代基团。

由于细菌耐药性的出现,单靠一种作用机制筛选抗生素并不是非常理想的方法。因此本文以筛选 TTSS 抑制剂为出发点,结合分析 TTSS 抑制剂对其他毒性因子的分析,不仅便于研究抗菌药物的作用机制,也可用于药物应用前景的评估。

## 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] Gomelsky M, Galperin MY, Romling U. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(1): 1-52.
- [3] 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.
- [4] Feltman H, Schulert G, Khan S, et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology, 2001, 147(10): 2659-2669.
- [5] Fleiszig SM, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion 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] Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(9): 654-665.
- [8] Feldman M, Bryan R, Rajan S, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(1): 43-51.
- [9] Drake D, Montie TC. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection by passive transfer of anti-flagellar serum[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1987, 33(9): 755-763.
- [10] Kohler T, Curty LK, Barja F, et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(21): 5990-5996.
- [11] Mattick JS. Type IV pili and twitching motility[J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56: 289-314.
- [12] Harshey RM. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 249-273.
- [13] 张成芳, 吴小刚, 李燕, 等. 铜绿假单胞菌 PAO1 III 型分泌系统新型抑制剂的合成和生物活性研究[J]. 有机化学, 2013, 33: 1309-1318.
- [14] Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(6): 1621-1629.
- [15] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 557-580.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [19] Allmond LR, Karaca TJ, Nguyen VN, et al. Protein binding between PcrG-PcrV and PcrH-PopB/PopD encoded by the pcrGVH-popBD operon of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(4): 2230-2233.
- [20] Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(2): 185-230.
- [21] Kim J, Ahn K, Min S, et al. Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology, 2005, 151(11): 3575-3587.