

# RND 家族外排泵及其与微生物群体感应系统的相互关系

梁志彬<sup>1,2</sup>, 陈豫梅<sup>1,2</sup>, 陈昱帆<sup>1,2</sup>, 程莹莹<sup>2</sup>, 张炼辉<sup>1,2</sup>

1. 华南农业大学群体微生物研究中心, 广州 510642;  
2. 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广州 510642

**摘要:** 抗生素耐药性一直是细菌病害防治的难题, 药物外排泵过量表达是细菌耐药性形成的重要机制之一。在革兰氏阴性细菌中, RND(Resistance-nodulation-cell division)家族外排泵在耐药性中发挥着重要作用, 近年来的研究表明, 依赖于小分子信号物质进行调控的群体感应系统与 RND 外排泵家族之间存在紧密的相互作用关系。本文在介绍 RND 家族外排泵的结构、转运机理和群体感应系统的类型及调控方式的基础上, 剖析了群体感应系统对 RND 外排泵的调控机理以及 RND 外排泵对群体感应系统信号分子转运的影响。深入研究 RND 家族外排泵与群体感应系统之间的相互依赖、相互制约关系有利于阐明 RND 家族外排泵的调控机理, 并有可能为克服微生物耐药性问题提供新的思路。

**关键词:** RND 外排泵; 群体感应; 调控机理; 信号转运

## RND efflux pump and its interrelationship with quorum sensing system

Zhibin Liang<sup>1,2</sup>, Yumei Chen<sup>1,2</sup>, Yufan Chen<sup>1,2</sup>, Yingying Cheng<sup>2</sup>, Lianhui Zhang<sup>1,2</sup>

1. Integrative Microbiology Research Centre, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
2. Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** Antibiotic resistance has become a serious concern in treatment of bacterial infections. Overexpression of efflux pump is one of the important mechanisms in antibiotic resistance. In Gram negative bacteria, RND (Resistance-nodulation-cell division) superfamily efflux pump plays a vital important role in antibiotics resistance. Recent research progress unveils an intriguing interrelationship between RND efflux pump and the bacterial quorum sensing system, whose regulation is dependent on small signal molecules. This article reviews the latest findings on the structure and transport mechanism of RND efflux pump, as well as the general features and regulatory mechanisms of quorum sensing, with a special focus on the role and mechanism of quorum sensing system in regulation of RND efflux pump, and the influence of efflux pump on quorum sensing signal transportation. Further investigation of the interrelationship between RND efflux pumps and the bacterial quorum sensing systems is critical for elucidation of

收稿日期: 2016-04-20; 修回日期: 2016-08-02

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973 计划)(编号: 2015CB150600)和国家自然科学基金项目(编号: 31270170, 31330002)资助[Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2015CB150600) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31270170, 31330002)]

作者简介: 梁志彬, 博士研究生, 专业方向: 植物病理学。E-mail: liangzb\_gz@163.com

通讯作者: 张炼辉, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 微生物学、植物病理学。E-mail: lhzhang01@scau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.16-139

网络出版时间: 2016/8/12 10:44:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160812.1044.004.html>

the regulatory mechanisms that govern the expression of the RND efflux pumps genes, and may also provide useful clues to overcome the efflux pump mediated antibiotic resistance.

**Keywords:** RND efflux pump; quorum sensing; regulation; signal transportation

细菌的耐药性主要源于抗生素药物降解酶、靶标的修饰、对药物吸收降低以及不同类型外排泵对药物的外排作用<sup>[1]</sup>。其中, 由于外排泵能对不同药物进行外排, 其介导的耐药机制一直是抗生素耐药研究领域的热点。细菌的外排泵主要分为 5 类, 分别是 MFS 家族(Major facilitator superfamily)、ABC 家族(ATP-binding cassette superfamily)、SMR 家族(Small multidrug resistance superfamily)、RND 家族(Resistancenodulation-cell division superfamily) 和 MATE 家族(Multidrug and toxic compound extrusion superfamily)<sup>[2]</sup>。研究发现, 在革兰氏阴性细菌中, 过量表达 RND 家族外排泵是细菌抗生素耐药性形成的主要原因之一<sup>[3]</sup>, 因此, 科学家对 RND 家族外排泵蛋白结构、底物识别和转运机理开展了系列研究。

近年来微生物群体感应现象的发现为研究 RND 家族外排泵的调控机理提供了新的思路。群体感应(Quorum sensing)是细菌细胞通过感应细胞外自身产生的信号分子继而对细菌生物学功能进行调控的现象, 研究表明群体感应系统在调控细菌抗生素产生<sup>[4]</sup>、运动性<sup>[5]</sup>、胞外多糖和蛋白酶产生<sup>[6,7]</sup>、质粒转移<sup>[8]</sup>以及生物膜的形成<sup>[9]</sup>起到了关键的作用, 近年来的研究表明, 群体感应系统参与了 RND 外排泵基因表达的调控, 同时 RND 外排泵又能对群体感应信号分子进行选择性地外排, 两者形成了互相影响、互相依赖的紧密联系。本文在介绍 RND 外排泵的结构和转运机理的基础上, 结合群体感应系统的类型和调控机理, 重点综述 RND 外排泵和群体感应系统之间的互作关系, 并针对抗生素耐药性调控机理和日益严重的微生物耐药性问题, 对研究两者关系的重要性展开讨论。

## 1 RND 外排泵的结构和转运机理

革兰氏阴性细菌 RND 家族外排泵主要由 3 部分组成, 分别是在细胞内膜上的转运蛋白[如大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的 AcrB 蛋白]、细胞周质空间中的融合蛋白(如大肠杆菌中的 AcrA 蛋白)和细胞外膜

上的孔道蛋白(如大肠杆菌中的 TolC 蛋白)<sup>[10]</sup>, 其中, 细胞内膜的转运蛋白负责细菌细胞膜上<sup>[11]</sup>和周质空间<sup>[12]</sup>药物的结合和转运。研究发现, 细菌对药物进行外排的过程中, 缺少任何蛋白都将会导致耐药性功能的丧失<sup>[13]</sup>。有些外排泵系统的外膜孔道蛋白是共用的, 如在绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中, MeXY 与 MexAB 共用孔道蛋白 OprM<sup>[14]</sup>, 异源表达发现, MeXY 蛋白同样可以利用大肠杆菌 KAM3 的孔道蛋白 TolC 对抗生素进行外排<sup>[15]</sup>。

革兰氏阴性细菌 RND 家族外排泵系统 3 个蛋白的编码基因一般位于同一个操纵子当中, 如绿脓杆菌中的 MexAB-OprM 系统<sup>[16]</sup>。编码细胞外膜上孔道蛋白的基因有时也会分布在基因组中的其他位置, 而其他两个蛋白的编码基因位于同一个操纵子中, 如大肠杆菌的 AcrAB-TolC 系统中融合蛋白 AcrA 和内膜转运蛋白 AcrB 的编码基因位于同一操纵子当中, 外膜的孔道蛋白 TolC 的编码基因则分布在基因组中的其它位置<sup>[17]</sup>。多套 RND 家族外排系统可以并存于一个细菌中, 如大肠杆菌中存在 AcrAB-TolC、AcrEF-TolC、AcrAD-TolC、MdtABC-TolC 和 MdtEF-TolC 系统<sup>[13]</sup>, 绿脓杆菌中存在 MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN 和 MexXY-OprM 系统<sup>[18]</sup>。同一个细菌中不同 RND 家族外排泵系统可外排的药物有同有异, 如 MexAB-OprM 和 MexCD-OprJ 都能转运氯霉素和四环素, MexAB-OprM 还能转运磺胺类药物, 而 MexCD-OprJ 却不能<sup>[19]</sup>。另外, 不同生长状态的细菌外排抗生素的系统可能不同, 如在洋葱伯克氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)的 RND 家族外排泵系统中, RND-3 和 RND-4 系统在细菌游离态时对妥布霉素和环丙沙星抗性起到了重要作用, 而 RND-8 和 RND-9 系统则在细菌形成生物膜时对妥布霉素的抗性起作用<sup>[20]</sup>。

RND 家族外排泵系统对多种抗生素有外排作用, 主要与细胞内膜的转运蛋白有关。在药物的转运过程中, 细胞内膜转运蛋白的 Porter 区最重要<sup>[21]</sup>, 该区域可以分为 3 个单元, 分别是进入单元、结合

单元和外排单元。Murakami 等<sup>[11]</sup>和 Nakashim 等<sup>[22]</sup>对 AcrB 蛋白与不同药物形成的结晶复合物进行研究,发现外排泵系统能够对多种药物进行外排,主要与 Porter 区的进入单元和结合单元上的药物活性识别位点有关。这两个区域存在不同药物的活性识别位点,活性识别位点与药物的亲和力较弱,同类药物能够与不同的活性位点结合,药物与活性位点独特的结合方式使得 RND 家族外排泵能高效地对不同药物进行外排<sup>[23]</sup>。

## 2 群体感应系统的类型及调控机理

群体感应现象最先在革兰氏阴性细菌费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)中发现<sup>[24]</sup>,后续研究中分离出第一个 AHL(*N*-acyl-homoserine lactone)类型群体感应信号 3-oxo-C6-HSL(当时被称为自我调控因子 autoinducer)<sup>[25]</sup>,其功能是调控费氏弧菌群体发光。随后的研究中发现,AHL 类型、AI-2(Autoinducer-2)类型<sup>[26]</sup>和 DSF(Diffusible signal factor)类型<sup>[27]</sup>群体感应信号系统广泛存在于革兰氏阴性细菌当中,同时还存在着分布在少数细菌的群体感应系统,如分别在青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)和绿脓杆菌中发现的 3-OH PAME(3-hydroxypalmitic acid methyl ester)信号和 PQS(2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone)信号介导的群体感应系统<sup>[28,29]</sup>。

在 AHL 类型信号调控系统中, *luxI* 与 *luxR* 基因是该系统的核心。*luxI* 及其同源基因负责群体感应信号的合成, *luxR* 及其同源基因负责信号分子受体蛋白的产生,此类受体蛋白是依赖于 AHL 信号的转录调控因子。在细菌细胞密度较低的时候, *LuxI* 只能产生本底水平的群体感应信号分子,当细菌细胞达到一定数量后,细胞外的群体感应信号达到一定的阈值,信号分子会进入细胞内与 *LuxR* 受体蛋白结合,形成的复合物与目标基因上游的非编码区结合,调控目标基因的表达<sup>[30,31]</sup>,从而实现对细菌生物学表型调控。不同细菌的 *luxI* 同源基因能产生不同结构的 AHL 类型信号分子(图 1),但它们都有相似的特征,由一个内酯化的高丝氨酸环和具有酰基的脂肪链组成,酰基脂肪链的长短可以从 4 个碳到 18 个碳,如绿脓杆菌中 *rhII* 基因产生的 4 个碳的 AHL 类型信号分子,通常被缩写为 C4-HSL;酰基

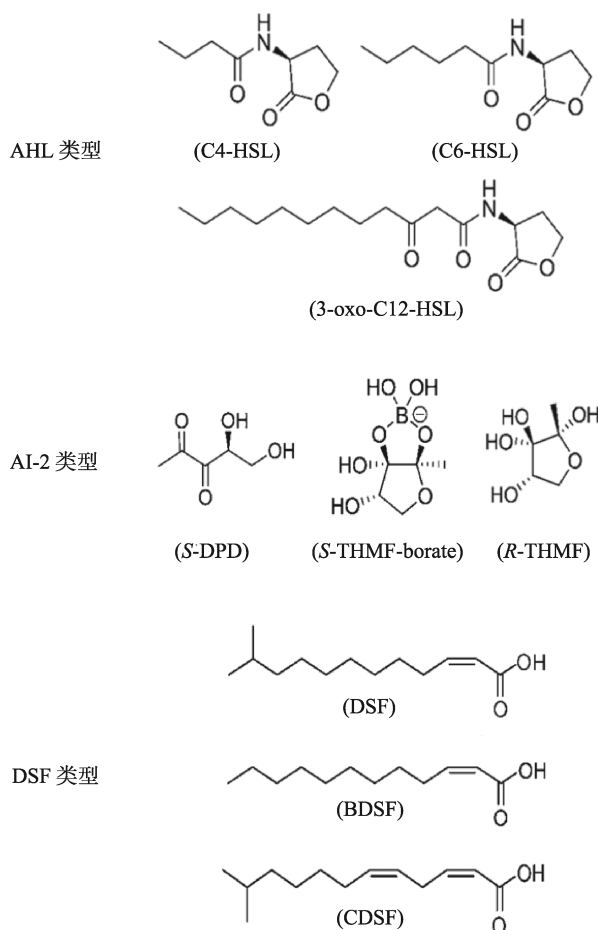


图 1 不同类型的群体感应信号分子

Fig. 1 Different types quorum sensing signals

根据参考文献<sup>[26,34,35]</sup>修改绘制。

脂肪链上的第 3 个碳的位置上有时候会出现一个羟基取代基,如在哈维氏弧菌(*Vibrio harvey*)中发现的 3-hydroxy-C4-HSL<sup>[26,32]</sup>,或是该位置被羰基所取代,如绿脓杆菌中 *lasI* 基因产生的 *N*-(3-oxo)-dodecanoyl-L-homoserine lactone,通常被缩写为 3-oxo-C12-HSL<sup>[30]</sup>,酰基脂肪链上还有可能出现双键,如类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)中的 7,8-*cis*-*N*-(tetradecenoyl)homoserine lactone 信号分子<sup>[33]</sup>。这些不同结构的 AHL 类型信号分子会与对应的 *luxR* 同源基因编码的受体蛋白相结合,启动下游基因的表达。

AI-2 类型的群体感应信号系统也被证明广泛存在于革兰氏阴性细菌当中,调控细菌抗生素的产生、致病因子和生物膜的形成<sup>[36]</sup>。在此系统中, *luxP* 基因合成了 *S*-DPD(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione)(图 1),该化合物通过自发重排形成了一系列的衍生物。

在哈维氏弧菌中, *S*-DPD 重排产生的 *S*-THMF-borate [(2*S*,4*S*)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate](图 1)与 LuxP 蛋白作用<sup>[37]</sup>, 在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中, *S*-DPD 产生的 *R*-THMF[(2*R*,4*S*)-2-methyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran](图 1)中与 LsrB 蛋白相互作用<sup>[38]</sup>, 从而对细菌的表型进行调控。

另外一类被证明广泛存在的是 DSF 类型群体感应信号(图 1), 该信号能调控细菌的运动型、生物膜形成和蛋白酶产生<sup>[7,27]</sup>。DSF 信号是由 *rpfF* 和 *rpfB* 基因负责合成, 在野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)中, RpfC/RpfG 组成的双组份调控系统负责信号的感应和传导<sup>[39]</sup>。但在洋葱伯克氏菌中, 信号的转导和调控则由 RpfR 负责<sup>[7]</sup>。RpfC/RpfG 和 RpfR 调控系统通过影响细胞内第二信使环二鸟苷酸(c-di-GMP)信号的浓度来对细菌的表型进行调控<sup>[7,40]</sup>。

### 3 RND 外排泵与群体感应系统之间的相互关系

RND 外排泵基因在细菌内过量表达是细菌耐药性形成的重要原因, 群体感应系统在调控 RND 外排泵基因表达中发挥了重要作用。此外, 基于 RND 外排泵的特殊转运机制, 部分群体感应信号能够作为 RND 外排泵的底物被排出细胞外, 两者在调控和信号转运当中形成了紧密的联系。

#### 3.1 群体感应系统对 RND 家族外排泵调控作用

在群体感应系统对 RND 家族外排泵调控的研究中, AHL 类型群体感应系统介导的调控研究取得较大进展, 尤其是在耐药细菌绿脓杆菌, 这为阐明该菌的耐药性机制打下了基础。而在其他细菌中, 也陆续发现群体感应系统调控 RND 家族外排泵的现象。

群体感应系统能够调控 RND 外排泵的现象最先在绿脓杆菌的研究中发现。在绿脓杆菌 AHL 类型群体感应系统中, 以 3-oxo-C12-HSL 和 C4-HSL 为信号分子的 las 和 rhl 群体感应系统在调控绿脓杆菌的生物学功能中发挥重要作用。1999 年, Whiteley 等<sup>[41]</sup>在绿脓杆菌中构建受群体感应信号调控的无启动子 *lacZ* 表达文库时, 发现 3-oxo-C12-HSL 和 C4-

HSL 能同时诱导 *qscI33* 基因的表达。基因序列分析发现 *qscI33* 基因为 RND 家族 MexEF-OprN 中 *mexF* 基因的同源基因。随后 Aendekerk<sup>[42]</sup>等证明, 前期报道的 *qscI33* 基因为绿脓杆菌中一个新型的 RND 外排泵系统 MexGHI-OpmD 的 *mexI* 基因, MexGHI-OpmD 外排泵系统与四环素的抗性相关。Dietrich 等<sup>[43]</sup>深入研究发现, 3-oxo-C12-HSL 和 C4-HSL 能够通过影响 PQS 群体感应信号系统间接影响外排泵系统 *mexGHI-opmD* 基因的表达。

在绿脓杆菌中, MexAB-OprM 外排泵与  $\beta$ -内酰胺类的药物抗性有关<sup>[18]</sup>。Maseda 等<sup>[44]</sup>在研究中发现, *mexAB-oprM* 外排泵基因在野生型菌株 PAO1S 中存在细胞密度依赖的情况, 其表达量在细菌细胞生长的稳定期达到最大值。在 las 和 rhl 信号合成的缺失突变体 TNP093 中, 外源加入 C4-HSL 群体感应信号分子能显著诱导 *mexAB-oprM* 基因的表达, 表明 C4-HSL 对 MexAB-OprM 外排泵的产生有诱导作用。在类鼻疽杆菌(*Burkholderia pseudomallei*) KHW 中, BpeAB-OprB 与庆大霉素、链霉素和红霉素的抗性相关, Chan 等<sup>[45]</sup>也发现外排泵系统的编码基因 *bpeAB-oprB* 的表达也存在着细胞密度依赖的现象, 外源添加 100 nM 的 C8-HSL 和 C10-HSL 群体感应信号分子能显著诱导 *bpeAB* 基因的表达。在缺少 *luxI* 同源基因的脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*) ATCC25285 中, Pumbwe 等<sup>[46]</sup>发现外源加入 C6-HSL 信号分子能显著增加外排泵基因 *bmeB3*、*bmeB6*、*bmeB7* 和 *bmeB10* 基因的表达。与添加 RND 外排泵抑制剂 CCCP 相比, 外源加入 C6-HSL 显著提高菌株对氨苄青霉素、头孢西丁、头孢哌酮和四环素的抗性。

此外, 在水稻细菌性谷枯病菌(*Burkholderia glumae*) BGR1 中, RND 外排泵 ToxFGH 参与了自身产生的毒素 toxoflavin 的转运, Kim 等<sup>[47]</sup>研究发现, 该菌株中 AHL 群体感应系统 TofI/TofR 通过调控转录调控因子 ToxJ 来间接调控 RND 外排泵系统 ToxFGH, 从而使 BGR1 菌株不会受到自身产生的 toxoflavin 的毒害。在对皱纹假单胞菌(*Pseudomonas corrugate*) CFBP 5454 的研究中, Licciardello 等<sup>[48]</sup>也发现 RND 外排泵 PcoABC 间接受到群体感应系统 PcoI/PcoR 的调控。



### 3.2 RND 外排泵对群体感应信号转运及影响

RND 外排泵的特殊转运机制决定了其能转运不同类型化合物,已经证明群体感应信号分子也能够作为 RND 外排泵的转运底物,RND 外排泵以此方式参与到了群体感应系统当中,通过群体感应系统进一步影响细菌的生物学表型。

过去对群体感应信号的研究认为,AHL 类型的群体感应信号分子是通过自由扩散进入和排出细菌细胞,如首先在费氏弧菌中发现的 3-oxo-C6-HSL<sup>[49]</sup>。随后在对绿脓杆菌的研究中,Pearson 等<sup>[50]</sup>发现 MexAB-OprM 对 las 系统中的 3-oxo-C12-HSL 有主动转运的能力,但对 rhl 系统中的 C4-HSL 信号分子无转运能力。Chan 等<sup>[45]</sup>发现在类鼻疽杆菌 KHW 中,与野生型菌株相比,BpeAB-OprB 系统中 *bpeAB* 基因突变体细胞内有过量积累外源添加的 [<sup>14</sup>C]acyl-HSL 现象,而 BpeAB-OprB 系统的过量表达菌株却不存在这种现象,这表明 BpeAB-OprB 系统参与到了群体感应信号转运当中。

对绿脓杆菌 MexEF-OprN 突变体进行研究时,Köhler 等<sup>[51]</sup>发现该 RND 外排泵的过量表达间接影响了群体感应系统 rhl 中信号合成基因 *rhlI* 的表达,*rhlI* 基因的表达量降低引起信号分子 C4-HSL 的产量下降,从而降低了 rhl 系统调控的致病因子绿脓菌素和鼠李糖脂的产生。Chan 等<sup>[45]</sup>发现在类鼻疽杆菌 KHW 的 BpeAB-OprB 系统中,*bpeAB* 的突变显著影响了群体感应系统 *bpsI* 基因的表达,使得该系统调控的致病因子铁载体、磷脂酶 C 和生物膜产量减少。

## 4 结语与展望

群体感应系统能够调控 RND 外排泵的表达,而 RND 外排泵亦能通过转运群体感应信号分子来影响群体感应系统,两者之间存在互相依赖、互相制约的联系。很明显,继续深入研究两者之间的互作关系将有利于阐明 RND 外排泵的调控机理,同时亦有可能为解决微生物耐药性问题提供新的思路。

尽管 RND 外排泵对不同抗生素的转运作用在许多细菌中已经被报道和研究,但在 RND 外排泵与群体感应系统的关系上,目前的研究主要集中在耐药细菌绿脓杆菌,主要源于绿脓杆菌的群体感应系

统已经得到深入研究,而在其他耐药细菌中如洋葱伯克氏菌、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)和粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)中,虽然也发现 RND 外排泵存在依赖群体密度的现象<sup>[52]</sup>,但两者的关系尚待进一步研究探讨。

群体感应系统能调控 RND 外排泵,而 RND 外排泵又能通过转运群体感应信号分子影响群体感应调控,说明以群体感应信号分子作为媒介,两者能够形成相互调控的关系(图 2),但目前仍缺少对两者形成的相互调控关系的系统研究,另外,与研究较为深入的游离态细菌的耐药性相比,细菌群体行为所引起的耐药性研究才处于起步阶段<sup>[53]</sup>,这种个体(RND 家族外排泵)生理功能与群体(群体感应系统)调控系统之间互作而形成的耐药机制值得进一步关注。

目前已经证明 RND 外排泵具有转运 AHL 类型群体感应信号的能力,而在群体感应系统的研究中,已发现 AHL 类型信号分子以外的广泛存在于革兰氏阴性细菌的群体感应信号,其中比较重要的两类是 DSF 类型和 AI-2 类型群体感应信号。DSF 类型信号分子是 11 个碳到 13 个碳的脂肪酸类化合物

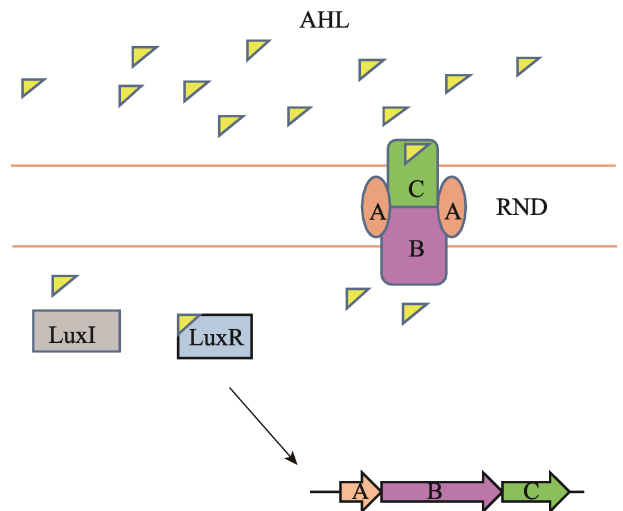


图 2 群体感应系统与 RND 外排泵系统之间的相互作用关系

Fig. 2 Interaction between quorum sensing system and RND system

以 AHL 群体感应系统为例,RND 外排泵能够对特定的群体感应信号分子进行外排,胞外的信号分子达到阈值后,AHL 信号分子与对应的 LuxR 蛋白形成的复合物提高 RND 外排泵基因的表达,RND 外排泵基因的过量表达进一步促进群体感应系统的调控作用。

(图 1)<sup>[35]</sup>,其结构与 RND 外排泵的转运底物 AHL 类信号分子同是脂肪酸衍生物,所以 DSF 类型信号分子能否被 RND 外排泵转运并调控细胞功能需要深入探讨。此外还有 AI-2 类型群体感应信号,该类型信号已被证明通过 ABC 类型转运蛋白进入细胞内<sup>[54]</sup>,RND 外排泵是否会参与到 AI-2 的转运同样值得关注。值得注意的是,在对野油菜黄单胞菌的转录组分析中发现,敲除 DSF 信号合成酶基因 *rpfF* 显著降低 RND 外排泵同源基因 *mexAB* 的表达<sup>[55]</sup>,表明 DSF 群体感应系统很可能亦参与对 RND 外排泵的调控。

群体感应系统对 RND 外排泵的调控主要是以 AHL 系统为研究对象,AHL 系统中调控的关键是 LuxI 及其同源蛋白产生的 AHL 信号分子与 LuxR 及其同源蛋白相结合,形成的复合物通过与靶基因的非编码区结合来调控细菌的生物学功能。虽然研究发现外源添加 AHL 类型群体感应信号分子能够明显诱导 RND 外排泵基因的表达,但前期研究结果已表明 AHL 信号对 RND 家族外排泵的调控可以通过其它信号物质和转录调控因子,这说明除了直接调控外,AHL 类型群体感应系统可以通过其他的调控因子间接对 RND 外排泵进行调控,因此,AHL 信号系统对 RND 外排泵的调控网络仍存在不少值得深究的地方。

细菌耐药性是细菌病害防治的难点,与其它形式的抗生素耐药机制相比,外排泵介导的耐药机制广泛存在于各种细菌当中。革兰氏阴性细菌 RND 外排泵的类型与转运机理的研究结果表明,细菌存在能够转运多种药物的不同外排泵,这种底物的广谱适应性预示可能比较难于设计合成针对 RND 外排泵的有效抑制剂。近年来的研究表明群体感应系统与 RND 外排泵之间存在紧密的互作关系,这个发现为研究微生物耐药性形成和调控机理提供了新的途径,深入研究 RND 家族外排泵与群体感应系统之间的相互依赖、相互制约关系有利于阐明 RND 家族外排泵的调控机理,并有可能为克服微生物耐药性问题提供新的思路。

## 参考文献(References):

- [1] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(1): 42–51. [DOI]
- [2] Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(2): 337–418. [DOI]
- [3] Blair JMA, Piddock LJV. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(5): 512–519. [DOI]
- [4] Roggiani M, Dubnau D. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J Bacteriol*, 1993, 175(10): 3182–3187. [DOI]
- [5] Eberl L, Winson MK, Sternberg C, Stewart GSAB, Christiansen G, Chhabra SR, Bycroft B, Williams P, Molin S, Givskov M. Involvement of *N*-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol*, 1996, 20(1): 127–136. [DOI]
- [6] Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, González JE. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 2003, 185(1): 325–331. [DOI]
- [7] Deng YY, Schmid N, Wang C, Wang JH, Pessi G, Wu DH, Lee J, Aguilar C, Ahrens CH, Chang CQ, Song HW, Eberl L, Zhang LH. Cis-2-dodecenoic acid receptor RpfR links quorum-sensing signal perception with regulation of virulence through cyclic dimeric guanosine monophosphate turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(38): 15479–15484. [DOI]
- [8] Zhang LH, Murphy PJ, Kerr A, Tate ME. *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by *N*-acyl-L-homoserine lactones. *Nature*, 1993, 362(6419): 446–448. [DOI]
- [9] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998, 280(5361): 295–298. [DOI]
- [10] Daury L, Orange F, Taveau JC, Verchère A, Monlezun L, Gounou C, Marreddy RKR, Picard M, Broutin I, Pos KM, Lambert O. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun*, 2016, 7: 10731. [DOI]
- [11] Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, 2006, 443(7108): 173–179. [DOI]
- [12] Husain F, Bikhchandani M, Nikaido H. Vestibules are part of the substrate path in the multidrug efflux transporter

- AcrB of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2011, 193(20): 5847–5849. [DOI]
- [13] Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 2015, 6: 587. [DOI]
- [14] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(9): 2242–2246. [DOI]
- [15] Mine T, Morita Y, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(2): 415–417. [DOI]
- [16] Poole K, Krebes K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol*, 1993, 175(22): 7363–7372. [DOI]
- [17] Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000, 405(6789): 914–919. [DOI]
- [18] Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 2015, 6: 660. [DOI]
- [19] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(4): 582–610. [DOI]
- [20] Buroni S, Matthijs N, Spadaro F, Van Acker H, Scoffone VC, Pasca MR, Riccardi G, Coenye T. Differential roles of RND efflux pumps in antimicrobial drug resistance of sessile and planktonic *Burkholderia cenocepacia* cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(12): 7424–7429. [DOI]
- [21] Yamaguchi A, Nakashima R, Sakurai K. Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front Microbiol*, 2015, 6: 327. [DOI]
- [22] Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*, 2011, 480(7378): 565–569. [DOI]
- [23] Eicher T, Cha HJ, Seeger MA, Brandstätter L, El-Delik J, Bohnert JA, Kern WV, Verrey F, Grütter MG, Diederichs K, Pos KM. Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(15): 5687–5692. [DOI]
- [24] Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol*, 1970, 104(1): 313–322. [DOI]
- [25] Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 1981, 20(9): 2444–2449. [DOI]
- [26] Galloway WRJD, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 28–67. [DOI]
- [27] Wang LH, He YW, Gao YF, Wu JE, Dong YH, He CZ, Wang SX, Weng LX, Xu JL, Tay L, Fang RX, Zhang LH. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol*, 2004, 51(3): 903–912. [DOI]
- [28] Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol*, 1997, 26(2): 251–259. [DOI]
- [29] Pesci EC, Milbank BJB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(20): 11229–11234. [DOI]
- [30] Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(9): 685–695. [DOI]
- [31] Zhang LH. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(5): 238–244. [DOI]
- [32] Cao JG, Meighen EA. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J Biol Chem*, 1989, 264(36): 21670–21676. [DOI]
- [33] Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol*, 1997, 179(23): 7530–7537. [DOI]
- [34] Stevens AM, Queneau Y, Soulère L, von Bodman S, Doutheau A. Mechanisms and synthetic modulators of AHL-dependent gene regulation. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 4–27. [DOI]
- [35] Deng YY, Wu JE, Tao F, Zhang LH. Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 160–173. [DOI]
- [36] Xavier KB, Bassler BL. LuxS quorum sensing: more than

- just a numbers game. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(2): 191–197. [DOI]
- [37] Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 2002, 415(6871): 545–549. [DOI]
- [38] Miller ST, Xavier KB, Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, Bassler BL, Hughson FM. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol Cell*, 2004, 15(5): 677–687. [DOI]
- [39] Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE, Daniels MJ, Dow JM. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol*, 2000, 38(5): 986–1003. [DOI]
- [40] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Crossman LC, Spiro S, He YW, Zhang LH, Heeb S, Cámara M, Williams P, Dow JM. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6712–6717. [DOI]
- [41] Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(24): 13904–13909. [DOI]
- [42] Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology*, 2002, 148(8): 2371–2381. [DOI]
- [43] Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 2006, 61(5): 1308–1321. [DOI]
- [44] Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(4): 1320–1328. [DOI]
- [45] Chan YY, Chua KL. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. *J Bacteriol*, 2005, 187(14): 4707–4719. [DOI]
- [46] Pumbwe L, Skilbeck CA, Wexler HM. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb Ecol*, 2008, 56(3): 412–419. [DOI]
- [47] Kim J, Kim JG, Kang Y, Jang JY, Jog GJ, Lim JY, Kim S, Suga H, Nagamatsu T, Hwang I. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol Microbiol*, 2004, 54(4): 921–934. [DOI]
- [48] Licciardello G, Bertani I, Steindler L, Bella P, Venturi V, Catara V. The transcriptional activator *rflA* is quorum-sensing regulated by cotranscription with the *luxI* homolog *pcol* and is essential for plant virulence in *Pseudomonas corrugata*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2009, 22(12): 1514–1522. [DOI]
- [49] Kaplan HB, Greenberg EP. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol*, 1985, 163(3): 1210–1214. [DOI]
- [50] Pearson JP, Van Delden CV, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol*, 1999, 181(4): 1203–1210. [DOI]
- [51] Köhler T, van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MM, Pechere JC. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2001, 183(18): 5213–5222. [DOI]
- [52] Fernando D, Kumar A. Growth phase-dependent expression of RND efflux pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(3): 569–572. [DOI]
- [53] Meredith HR, Srimani JK, Lee AJ, Lopatkin AJ, You LC. Collective antibiotic tolerance: mechanisms, dynamics and intervention. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(3): 182–188. [DOI]
- [54] Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL. The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 2001, 42(3): 777–793. [DOI]
- [55] He YW, Xu M, Lin K, Ng YJA, Wen CM, Wang LH, Liu ZD, Zhang HB, Dong YH, Dow JM, Zhang LH. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol*, 2006, 59(2): 610–622. [DOI]