

therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2013, 208 (2):199-202.

[34] KROESEN V M, RODRIGUEZ-MARTINEZ P, GARCI-A E, et al. A beneficial effect of low-dose aspirin in a murine model of active tuberculosis[J]. Front Immunol, 2018, 9:798.

[35] MATTEUCCI K C, CORREA A A S, COSTA D L. Recent advances in host-directed therapies for tuberculosis and malaria[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12:905278.

[36] CECCATO A, RUSSO A, BARBETA E, et al. Real-world corticosteroid use in severe pneumonia: a propensity-score-matched study[J]. Crit Care, 2021, 25(1):432.

[37] TORRETTA S, SCAGLIOLA A, RICCI L, et al. D-mannose suppresses macrophage IL-1beta production[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):6343.

[38] FOX D, MATHUR A, XUE Y, et al. Bacillus cereus non-haemolytic enterotoxin activates the NLRP3 inflammasome[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):760.

[39] OUSINGSAWAT J, CENTEIO R, CABRITA I, et al. Airway delivery of Hydrogel-Encapsulated niclosamide for the treatment of inflammatory airway disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3):1085.

[40] YANG J. Mechanism of azithromycin in airway diseases [J]. J Int Med Res, 2020, 48(6):300060520932104.

[41] MISHRA S K, HIDAU M, RAI S. Memantine and ibuprofen pretreatment exerts anti-inflammatory effect against streptozotocin-induced astroglial inflammation via modulation of NMDA receptor-associated downstream calcium ion signaling[J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(1):183-192.

[42] PINHEIRO N M, BANZATO R, TIBERIO I, et al. Acute lung injury in cholinergic-deficient mice supports anti-inflammatory role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14):7552.

[43] YU J Y, ZHANG B, PENG L, et al. Repositioning of memantine as a potential novel therapeutic agent against meningitic e. coli-induced pathogenicities through disease-associated alpha7 cholinergic pathway and RNA sequencing-based transcriptome analysis of host inflammatory responses[J]. PLoS One, 2015, 10(5):e0121911.

[44] WANG S, HE X, YU J Y, et al. Characterisation of a multidrug-resistant meningitic escherichia coli strain (O75;K1:H5) isolated from an infant that is sensitive to memantine, a newly identified host-directed antimicrobial drug[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 46(5):598-600.

[45] XIAO Y, ZHANG TS, LI Y H, et al. Memantine promotes bactericidal effect of neutrophils against infection with pseudomonas aeruginosa and its drug-resistant strain, by improving reactive oxygen species generation [J]. Microb Drug Resist, 2022, 28(1):7-17.

[46] PENG L, LI L, HE XL, et al. Memantine displays antimicrobial activity by enhancing escherichia coli pathogen-induced formation of neutrophil extracellular traps [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:47.

(收稿日期:2023-03-16 修回日期:2023-06-26)

• 综 述 •

铁元素在抗铜绿假单胞菌生物膜感染中应用进展*

崔亚斌¹综述, 沈 娜², 苏卫东^{1△} 审核
天津市第四中心医院:1. 检验科;2. 中心实验室, 天津 300140

摘 要:铜绿假单胞菌生物膜形成是使其具有更强的适应生存环境的能力,也是导致耐药性增加及感染难以根除的重要原因之一。铜绿假单胞菌高效的铁摄取能力赋予其多样的生存适应表现,被认为是其毒力标志之一。铁元素是参与铜绿假单胞菌黏附、微菌落形成和生物膜成熟的重要信号分子,通过破坏铁稳态来干预铜绿假单胞菌生物膜发育成熟进程是临床抗铜绿假单胞菌生物膜感染的新策略。该文仅就铁元素在铜绿假单胞菌生物膜发生发展及抗生物膜感染的新进展做一综述,为临床治疗铜绿假单胞菌感染提供新思路。

关键词:铁; 铜绿假单胞菌; 生物膜; 细菌感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.21.021 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2023)21-2664-07 **文献标志码:**A

Research progress in the application of iron in anti-Pseudomonas aeruginosa biofilm*
CUI Yabin¹, SHEN Na², SU Weidong^{1△}
1. Department of Clinical Laboratory; 2. Central Laboratory, Tianjin Fourth

* 基金项目:天津市卫生健康科技项目(TJWJ2021QN055)。
△ 通信作者, E-mail:suweidong@sina.com。

Central Hospital, Tianjin 300140, China

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is a stronger adaptation to the environment, and it is also one of the important reasons for the increase in drug resistance and the difficulty of eradicating infections. The high capacity of this bacterium to acquire iron facilitates its versatility and is considered one of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence hallmarks. Iron is an important signaling molecule involved in *Pseudomonas aeruginosa* adhesion, microcolony formation and biofilm maturation, and to influence the process of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm maturation by disrupting iron homeostasis is a new strategy for clinical anti-*Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. This paper only reviews the new progress of iron in the development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and anti-biofilm infection, by which provides new ideas for the clinical treatment of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: iron; *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; bacterial infections

铜绿假单胞菌(PA)是由世界卫生组织(WHO)提出必须迅速开发的新抗菌药物广泛清单上最优先病原体 ESKAPE(屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、PA、肠杆菌属)的成员之一,其对生存环境变化具有很强的遗传灵活性和生理适应性,表现在对抗菌药物耐受性增强(MDR-PA、XDR-PA、PDR-PA、CR-PA)、细菌生存方式改变(生物膜形成)以及细菌表型改变(小菌落变异株、黏液型菌株)^[1]。PA 通过分泌黏性和保护性基质,菌体以群体的形式存在于胞外聚合物(EPS)中,形成“生物膜”。生物膜形成能帮助 PA 实现免疫逃逸和(或)增强抗菌药物耐受性^[2];另外生物膜内细菌细胞的最小抑菌浓度(MIC)可能比浮游状态高 10~10 000 倍^[3],因此一旦生物膜形成,临床感染就很难根除。

宿主感染期间,宿主通过“营养免疫”来限制 PA 对铁的摄取。作为回应,菌细胞能分泌铁载体、还原血红素等机制获取铁,以满足生存需要。铁争夺战是宿主-病原体相互作用中的一个重要过程,病原体获得这种金属的有效性可以决定感染的成败。因此,阻断铁获取正成为预防和/或治疗 PA 感染的一种新策略。本文仅就铁元素在 PA 生物膜发生发展及抗生物膜感染的新进展做以下综述。

1 PA 的铁摄取系统

PA 通过多种铁摄取系统来获取铁元素:(1)铁载体系统;(2)血红素系统;(3)Feo 和 BqsR/BqsS 双组分的 Fe²⁺ 摄取系统;(4)PQS 系统介导铁摄取;(5)铁稳态调节。

1.1 铁载体系统 铁载体是 PA 最主要的铁摄取途径,其对 Fe³⁺ 有很强的亲和力,是在铁缺乏条件下合成和分泌的。PA 能合成两种内源性铁载体:荧光嗜铁素(PVD)和螯铁蛋白(PCH)。PVD 是一种肽类铁载体,含有两个异羟肟基团和一个荧光二羟基喹啉发色团;而 PCH 是以水杨酸为基础的铁载体,相比 PVD 而言,PCH 对铁的亲和力较低。PA 优先合成 PCH,但在环境铁浓度非常低时,PVD 的合成明显增多^[4]。二者在与各自特定的 TonB 依赖性转运蛋白

(TBDT)结合(FptA 和 FpvA)后,借助质膜上 TonB-ExbB-ExbD 复合物提供的能量将 Fe³⁺ 铁载体转运到细胞周质;Fe³⁺ 在周质中完成解离并还原成 Fe²⁺,Fe²⁺ 经周质三磷酸腺苷(ATP)依赖的通透酶(ABC 转运蛋白)跨质膜进入细胞质^[5]。

在铁充足的培养基中,PVD 突变体(PvdA-)菌株仅在介质表面形成平坦均匀的菌层,而 PCH 突变体(PchA-)则形成类似野生型的复杂生物膜^[6],表明 PVD 对生物膜生成影响更大。事实上,PVD 发挥双重作用,既是铁载体,也是毒力因子(胞外蛋白酶 PrpL 和外毒素 A)的激活信号。PVD 对铁的高亲和力允许其能从宿主的转铁蛋白中螯合铁,是引起小鼠烧伤模型和肺病模型的感染所必需的^[7]。PCH-Fe³⁺ 复合物不仅通过铁摄取促进 PA 毒力表达,而且还通过氧化还原反应引起宿主的氧化损伤和炎症反应。囊性肺纤维化(CF)患者痰标本中,PCH 合成量显著增加,并引起持续的炎症反应和导致组织损伤^[8]。因此 PVD 和 PCH 二者都是显著影响 PA 致病性的关键毒力因子。

PA 可以利用多种异源性铁载体,如肠杆菌素(大肠杆菌产生)、铁络素(构巢曲霉和黄青霉产生)和外螯合素(新金分枝杆菌产生)。铁络素可以影响 PA 生物膜的发育和弹性蛋白酶的活性,外螯合素介导的铁摄取系统对生物膜的形成至关重要^[5]。PA 利用异源性铁载体能力有助于增强其在多种微生物混合感染中的竞争力,机制可能是通过对铁的竞争来抑制其他微生物的生长。

1.2 血红素摄取系统 血红素无法以游离形式存在,因此铁元素必须从血红蛋白或血液结合素中摄取,PA 可通过 Phu 系统、Has 系统和 Hxu 系统获得铁。在 Phu 和 Hxu 系统中,分别通过 PhuR 和 HxuR 直接结合血红素将其转运到细胞周质;而在 Has 系统中,首先胞外血红素结合蛋白(HasAp)结合血红素,形成“HasAp-血红素”复合物输送至 HasR,而后再将血红素转运到细胞周质^[9]。

周质中,血红素结合蛋白 PhuT 结合血红素并将

其输送到 PhuUV ABC 转运蛋白,然后穿过质膜进入细胞质。血红素进入细胞质内,血红素被血红素分子伴侣 Phus 结合,运输给血红素加氧酶(Hemo),进一步裂解生成胆绿素 IX β (BVIX β)和 IX δ (BVIX δ)、CO 和 Fe $^{3+}$ ^[10]。PA 产生另一种血红素加氧酶 BphO 切割血红素产生 BVIX α 。BVIX α 是 PA 色素 BphP 的发光团,能感知红光和远红光,这种感光调节能力与生物膜的形成和毒力高度相关^[10]。

在 Hxu 系统被鉴定出之前,尽管在 PA 感染期间,HasAp 和 PhuR 表达上调,但是血红素系统在影响 PA 毒力的重要性长期被低估。最新研究发现血流感染中分离出的 PA, Hxu 系统呈高表达,并且 Hxu 系统缺失能降低了 PA 的致病力。另外 Hxu 系统过表达会增加 PA 败血症的风险^[11]。

1.3 Feo 系统和 BqsR/BqsS 双组分摄取系统 在囊性纤维化(CF)患者的肺部黏液层或生物膜的底部极易形成厌氧和(或)较低 pH 值的微需氧环境,Fe $^{3+}$ 还原为水溶性的 Fe $^{2+}$,Fe $^{2+}$ 成为铁的主要来源。细胞胞外 Fe $^{2+}$ 通过未定义的孔蛋白通道自由扩散到周质,通过周质中 β -1,2 葡聚糖螯合 Fe $^{2+}$,选择性实现富铁条件下限制游离铁诱导的细胞毒性和限铁条件下促进菌株生长^[6]。

周质中 Fe $^{2+}$ 大部分通过 Feo ABC 系统转运至胞内,该系统由 FeoB 渗透酶、FeoA 和 FeoC 蛋白组成;同时 PA 在生物膜中形成另一个 Fe $^{2+}$ 转运系统,即 BqsR/BqsS 双组分系统^[10]。二者都受到吩嗪的调节,吩嗪是 PA 产生的二级代谢产物。吩嗪-1-羧酸(PCA)是绿脓菌素(PYO)的前体,PCA 和 PYO 均具有氧化还原能力,能将 Fe $^{3+}$ 还原为 Fe $^{2+}$ 。BqsR/BqsS 系统可通过调节假单胞菌喹诺酮信号(PQS)(pqsA 和 phnA)和鼠李糖脂(rhlA)的生物合成而调节生物膜形成。当病情加重时,CF 患者肺部检测到吩嗪和 Fe $^{2+}$ 的大量积累,给予 Fe $^{2+}$ 和 Fe $^{3+}$ 两种离子的螯合剂联用可以很大程度上降低 PA 生物膜形成能力^[12]。

1.4 PQS 系统介导的铁摄取 群体感应系统(QS)是细菌细胞间信号交换的过程,依赖于对称自动诱导剂的细胞外信号分子的产生、检测和反应,并允许细菌群同步改变行为,以响应邻近群落的种群密度和物种组成的变化。QS 对于 PA 多重毒力表达和生物膜形成至关重要。

PA 有 PQS、LasIR 和 RhlIR 3 种主要 QS 系统。PQS 系统产生特异性的 2-烷基-4-喹诺酮信号(AQs),包括信号分子 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(PQS)及其前体 2-庚基-4-喹诺酮(HHQ)。PQS 中 3'-OH 基团能螯合生理 pH 下的 Fe $^{3+}$,降低环境中铁的含量,最终诱导 PVD 和 PCH 基因表达,借此增强铁摄取。另外 PA 还能通过 H3 型 VI 分泌系统(H3-T6SS)

效应分子 TseF 利用 PQS 与 FptA 的连接来实现整合的 Fe $^{3+}$,但其利用效率低于其他铁摄取途径^[13]。

1.5 铁稳态调节 过量摄取铁会出现不良后果,铁通过 Fenton 反应和 Haber-Weiss 反应与氧结合生成活性氧(ROS),导致大分子(如脂质和蛋白质)的破坏,引起细菌死亡。因此保持铁稳态是至关重要的。

PA 铁稳态主要由铁摄取调节因子(Fur)进行调节,而且 Fur 的调节作用是 PA 必不可少的。Fur 不仅作为基因转录的直接抑制因子,直接激活 Fur 与靶基因的启动子区域的结合;而且作为基因转录的间接抑制因子,通过间接激活小 RNA 的 Fur 依赖性表达(即 PrrF1、PrrF2 和 PrrH)、置换丝氨酸蛋白样蛋白或阻断结合丝氨酸蛋白抑制剂^[14]。Fur 不仅调节铁稳态基因的表达,还参与调节许多其他重要功能的基因,如毒力、呼吸、中枢代谢和应激反应等。

PrrF1 和 PrrF2 的表达在富铁条件下被 Fur 阻断;而在限铁条件下被激活,通过下调非必需含铁蛋白质的表达来满足铁需求。PrrH 被编码在 prrF 位点内,铁和血红素都能通过血红素运输蛋白 PhuS 抑制 PrrH 的表达^[15]。血红素合成基因(hemB 和 nirL)和 PVD 基因 pvdL 是 prrF 位点的靶标,通过调节 prrF/prrH sRNA 基因的转录,PhuS 可以整合胞外血红素的代谢进入铁稳态调节网络^[16]。另外 PA 的毒力也依赖于 PrrF 和 PrrH 调控相关蛋白表达来实现,比如抗氧化应激蛋白质的基因表达,如超氧化物歧化酶和过氧化氢酶;铁螯合相关蛋白,如细菌铁蛋白以及有氧或无氧呼吸相关蛋白,如乌头酸酶、富马酶和琥珀酸脱氢酶等^[17]。

铁载体能够充当诱导自身合成的信号分子,但 PVD 的生物合成和吸收不是由 Fur 直接调控的,而是通过两个 ECF σ 因子 PvdS 和 FpvI 间接调节 PVD 生物合成。这两个 ECF σ 因子被跨内膜抗 σ 因子(FpvR)的细胞质结构域隔离,当在 Fe $^{3+}$ PVD 复合物与外膜 FpvA-TBDT 复合物结合后,触发 FpvR 蛋白水解,从而释放 PvdS 和 FpvI,使其能够与核心 RNA 聚合酶结合来促进铁代谢相关基因的转录^[18]。

总之,PA 通过动态调节限铁条件下的铁摄取和富铁条件下的铁外排,一方面应对宿主感染期间的营养免疫带来的铁缺乏,另一方面消除胞内铁富足导致的细胞毒性,保证自身铁稳态来实现生存需求。

2 铁元素参与生物膜形成调控

外源添加铁螯合剂乳铁蛋白明显抑制 PA 生物膜的形成,而适宜的高铁浓度环境反而可促进 PA 生物膜的形成,说明铁可作为一种信号调节 PA 生物膜的发育^[6]。PA 生物膜生成受多个系统调控,包括 QS 系统、Gac/Rsm 和 c-di-GMP 双组分调控系统。

PA 3 个主要 QS 系统(即 PQS、LasI 和 RhlI 系统),通过这 3 个 QS 系统的相互作用来调控多种毒力

基因表达和生物膜发育。LasI 和 RhlI 系统分别产生 N-3-氧代十二烷酰基-L-高丝氨酸内酯 (3-oxo-C12-HSL) 和 N-丁酰基-L-高丝氨酸内酯 (C4-HSL), 并与相应的受体蛋白 (转录因子 LasR 和 RhlR) 结合后激活一系列基因 (包括 lasI 和 rhlI 基因) 的转录; PQS 系统产生信号分子 PQS 及其前体 HHQ。

3-oxo-C12-HSL 的降解产物 3-(1-羟基茛基)-5-(2-羟乙基)吡咯烷-2,4-二酮 (C12-TA) 对 Fe^{3+} 具有很高的亲和力, C12-TA 能够溶解金黄色葡萄球菌并进入其胞内铁存储池来获取铁^[19]。PQS 系统螯合 Fe^{3+} , 诱导铁饥饿和铁载体介导的铁摄取。PA 外膜囊泡 (OMV) 通常存储有含铁的 PQS 分子, 可作为铁饥饿条件铁的替代来源^[13]。LIU 等^[20]发现 PCH 合成基因簇 (包括 pchDCBA 操纵子、PCH 合成酶基因 phcF 和 Fe^{3+} -PCH 外膜受体 fptA) 和 PVD 合成酶基因 (pvdJ、pvdA 和 pvdD) 在响应 PQS 时上调。RhlI 系统调控表面活性剂鼠李糖脂的表达, 在生物膜形成的早期, 限制铁能诱导鼠李糖脂的产生, 使细胞发生抽搐运动, 形成扁平的无结构生物膜^[21]。铁可以通过干扰 PrrF1 和 PrrF2 的表达, 与 PQS 建立联系, 促进 HHQ 和 PQS 的产生^[22]。

Gac/Rsm 和 c-di-GMP 通过调节 EPS, 与细菌在浮游生物和生物膜之间的生活方式转换有关。细胞外多糖作为 EPS 的基本成分, 构成了 PA 的生物膜结构, 藻酸盐、Pel 和 Psl 是 PA 产生的主要胞外多糖。环境低铁可以加速藻酸盐的表达, 而增加铁能通过抑制 ArmZ 来刺激 Psl 的合成, ArmZ 是一种转录调节因子, 能够灭活 Psl 基因操纵子并激活藻酸盐的产生。铁还可以通过抑制鼠李糖脂的合成来促进 Psl 的生成^[23]。此外, 还发现胞外多糖能够结合铁。Psl 既能结合 Fe^{2+} , 又能结合 Fe^{3+} , Pel 常与 Fe^{2+} 结合, 而藻酸盐仅与 Fe^{3+} 结合。CF 患者痰液样本中 Fe^{2+} 浓度与肺纤维化严重程度呈正相关, 高浓度铁能诱导刺激 Psl 的合成及 Psl 介导的生物膜形成^[24]。Gac 和 c-di-GMP 通过促进 PVD 的表达, 协同作用增强铁摄取。Gac 和 c-di-GMP 需要 Pel 和 Psl 来介导 PVD 的产生。细胞外 DNA (eDNA) 也是生物膜基质的组成部分, 由裂解细胞释放, 促进细胞间最初的黏附和表面聚集。YANG 等^[25]发现低铁通过提高 eDNA 的表达促进铜绿假单胞菌生物膜的发育, 而高铁水平则抑制 eDNA 的表达。

PA 生物膜发育成熟与 QS 系统精细调节密切相关, 铁元素在其中发挥重要作用, 因此对铁摄取的干预也成为阻断 PA 生物膜形成的潜在靶点。

3 铁元素抗生物膜感染的策略

生物膜形成是临床抗 PA 感染失败的主要原因之一, 因此破坏或阻断参与生物膜发育成熟可作为抗生物膜感染的有效策略。鉴于铁在生物膜发育成熟

中的作用, 因此通过靶向干预铁摄取和/或通过铁螯合剂调节铁摄取来影响生物膜的发育成熟是抗感染的新策略。

3.1 铁拮抗剂 金属镓 (Ga^{3+}) 与 Fe^{3+} 有相同的原子大小和氧化态, 但不能进行氧化还原反应。 Ga^{3+} 通过模拟铁元素和抑制多种酶的催化活性, 阻断依赖于铁的氧化还原循环过程来发挥抗菌活性。 Ga^{3+} 能抑制 PA 生物膜的生长, 并能分散已形成的生物膜。给予局部给药, Ga^{3+} 明显促进 PA 感染伤口愈合^[26]。镓可以在胞外与 PVD 结合, 减少胞外 Fe^{3+} -PVD 合成和依赖 PVD 的铁摄取来抑制 PA 生长^[7]。

基于镓的组合策略比单独使用镓更能增强抗感染的作用。镓-原卟啉 IX (Ga-PP IX) 化合物, 通过 PhuR 进入细胞内, 靶向结合血红素依赖性 b 型细胞色素并抑制细胞呼吸实现抗生物膜作用^[27]。镓-去铁胺比镓盐更好地抑制 PA 浮游生长, 并通过减少细胞内铁的量来阻止生物膜的形成^[28]。目前一些含镓生物材料, 包括介入生物活性玻璃支架、含镓磷硅酸盐玻璃和镓接枝钛植入物, 正被应用于医学假体设备和涂层导管中, 以减少生物膜形成。

需要注意的是 GA 是一种肾毒性药物, 使用过程中应当缓慢静脉输注, 同时要求患者在输注期间补充水份, 一方面不会影响肾功能、电解质水平和血细胞计数, 另一方面能改善 CF 患者的肺功能^[29]。

3.2 铁螯合剂 铁螯合剂能螯合生长环境中的铁达到限制病原体的可用铁源而实现抗菌目的。乳铁蛋白是中性粒细胞和外分泌腺产生的内源性螯合剂, 是一种急性期蛋白质, 在感染引起炎症期间就会产生并增加, 该分子的抗菌特性也存在于乳铁蛋白衍生肽和合成类似物肽中。乳铁蛋白螯合 Fe^{3+} , 刺激 PA 抽搐运动, 使细菌在表面上移动而不是附着和形成生物膜^[17]。Alaxia SAS 开发的乳铁蛋白和硫氰酸盐组成的螯合剂 ALX-009, 用于治疗 CF 患者的 PA 感染^[30]。转铁蛋白是由人体肝脏合成内源性螯合剂, 使用去铁的转铁蛋白可来螯合游离铁, 发挥抗菌活性^[31]。

FDA 已批准的铁螯合剂, 去铁胺、地拉罗司和去铁酮临床应用表现出比其他治疗方案更高的安全性。去铁胺可作为治疗 CF 肺炎的替代方案之一^[32]。尽管 2,20-联吡啶、二乙烯三胺五乙酸和 EDTA 被证实具有抑制 PA 生长和生物膜形成的能力, 但是使用铁螯合剂作为抗菌药物的佐剂比单独使用具有更明显的抗生物膜作用。铁螯合剂 N,N'-双(2-羟苄基)乙二胺-N,N'-二乙酸 (HBED) 已被证明是黏菌素的有效佐剂。二者联用成功地抑制了需氧和厌氧条件下的 PA 生物膜形成^[33]。妥布霉素和去铁胺或地拉罗司的联合治疗使生物膜形成减少了 90%, 且增强妥布霉素的抗菌作用^[34]。

临床应用中要注意细胞毒性是铁螯合剂治疗的缺点,专家建议通过吸入给药途径,这不仅减少了铁螯合剂的潜在全身不良反应,而且还增加了药物对肺部的局部作用^[32,35]。

3.3 “特洛伊木马”策略 生物膜耐药性的原因在于细菌胞外膜和生物膜通透性降低。大多数抗 PA 感染的抗菌药物必须穿透细胞膜才能到达胞内靶点发挥作用。“特洛伊木马”策略基于抗菌药物与铁载体的偶联,通过外膜上特异性铁载体的 TBDT,促使与铁载体偶联药物透过低渗透性 PA 外膜从而进入胞内,实现药物跨膜转运。

头孢地尔-铁载体偶联物基于此原理,该偶联物一方面增强了对 β 内酰胺酶的稳定性,同时利用其铁载体样特性进入周质空间的能力大大提高,因此头孢地尔-铁载体被认为比头孢他啶-阿维巴坦和美罗培南对所有耐药的 PA 更有效^[36]。环丙沙星-铁载体偶联物,能明显提高膜内环丙沙星的药物浓度,对环丙沙星耐药菌株 AM85 也有抗菌活性^[37]。

3.4 QS 抑制剂 鉴于 QS 在生物膜发育中的重要作用,具有抗 QS 活性的药物,也称为 QS 抑制剂(QSIs),这些抑制剂具有特定的小范围靶标,不会对有益菌造成伤害,同时降低了细菌耐药性的风险。近年来,使用 QSI 来治疗 PA 感染已被广泛研究。姜黄素、儿茶素、咖啡因、水杨酸、丁香酚、姜黄素、迷迭香酸、柚皮苷、绿原酸、桑色素、植物醇和 2,5-哌嗪二酮等 QSI 可通过抑制 QS 信号分子及其前体的合成,或作为信号分子的拮抗剂或抗体,以非杀菌或非抑菌的方式减弱 PA 毒力和抑制生物膜形成^[38-39]。蛋白质组学分析表明,给予姜黄素后,PVD 上调和亚铁氧化酶的下调伴随胞内 Fe^{3+} 含量升高,随之 Fe^{3+} 通过 Fenton 反应转化为 Fe^{2+} ,最终导致大分子的损伤^[40]。

3.5 纳米粒子 具有体积小、可修饰、比表面积大、对疏水性和亲水性药物分子适应性强、在生理体液中的稳定性高、对靶点的特异性等特点,被认为是理想的抗菌材料。纳米银颗粒(AgNPs)破坏 Fe-S 簇,通过 Fenton 反应产生 Fe^{2+} ,引起羟基自由基的产生,破坏 DNAs、蛋白质和脂质,从而导致细菌死亡。AG-NPs 还可以通过破坏细菌细胞壁或细胞膜的完整性、破坏二硫键和干扰细胞信号通路来破坏生物膜。AGNPs 与妥布霉素或氨基糖苷类联合用药能显著降低生物膜内细菌浓度和细菌生物活性^[41]。

小鼠肺炎模型,纳米颗粒微泡(Mbs)内含封装哌拉西林和 Fe_3O_4 纳米粒子的核芯。在超声波刺激下,Mbs 能物理地破坏生物膜的结构,并增强 Fe_3O_4 纳米颗粒和哌拉西林对生物膜的渗透。一方面在哌拉西林的帮助下, Fe_3O_4 纳米粒子能降解生物膜基质并杀死细菌;再者 Fe_3O_4 微粒可通过将巨噬细胞极化为促

炎表型来激活生物膜消除的免疫逃逸,有效地治疗小鼠模型的慢性肺部感染^[42]。

此外通过研发铁代谢途径的疫苗,制备单克隆抗体来与铁摄取竞争;利用晶体学方法确定细菌铁代谢途径中酶的结构成分,合成针对铁代谢过程酶的人工抑制剂。尽管这些都尚未形成针对 PA 的许可疫苗和药物,但这都是值得高度重视的抗 PA 生物膜感染的新靶点。

总之,生物膜形成赋予 PA 对外界环境更强的适应能力并增强抗菌药物耐药性,是 PA 感染性疾病难以治疗的重要原因。铁元素是 PA 生物膜生长所必需的。PA 的铁摄取能力被认为是其毒力和生物膜形成的重要标志,因此以干预和阻断铁代谢为目标的药物正在成为抗菌研究领域的新热点。令人鼓舞的是,一系列铁拮抗剂和螯合剂已经开发出来,有的已经进入临床试验。可以预见,随着对铁元素在 PA 生物膜形成中作用认识的不断深入,在不久的将来,靶向铁稳态药物将在临床上应用于 PA 及其生物膜感染相关疾病的治疗。

参考文献

[1] SAINZ-MEJIAS M, JURADO-MARTIN I, MCCLEAN S. Understanding *Pseudomonas aeruginosa*-host interactions; the ongoing quest for an efficacious vaccine[J]. Cells, 2020, 9(12): 2617.

[2] AL-WRAFY F, BRZOZOWSKA E, GORSKA S, et al. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*-the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2017, 71: 78-91.

[3] JAMAL M, AHMAD W, ANDLEEB S, et al. Bacterial biofilm and associated infections[J]. J Chin Med Assoc, 2018, 81(1): 7-11.

[4] DUMAS Z, ROSS-GILLESPIE A, KUMMERLI R. Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments[J]. Proc Biol Sci, 2013, 280(1764): 20131055.

[5] LLAMAS M A, SANCHEZ-JIMENEZ A. Iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*: targeting iron acquisition and storage as an antimicrobial strategy[J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1386: 29-68.

[6] KANG D, KIRIENKO N V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Microbiol, 2018, 56(7): 449-457.

[7] KANG D, REVTOVICH A V, DEYANOV A E, et al. Pyoverdine inhibitors and gallium nitrate synergistically affect *Pseudomonas aeruginosa*[J]. mSphere, 2021, 6(3): e0040121.

[8] HARE N J, SOE C Z, ROSE B, et al. Proteomics of *Pseudomonas aeruginosa* Australian epidemic strain 1 (AES-1) cultured under conditions mimicking the cystic fibrosis lung reveals increased iron acquisition via the sid-

- erophore pyochelin[J]. J Proteome Res, 2012, 11 (2): 776-795.
- [9] OTERO-ASMAN J R, GARCIA-GARCIA A I, CIVANTOS C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem[J]. Environ Microbiol, 2019, 21(12): 4629-4647.
- [10] MOURINO S, WILKS A. Extracellular haem utilization by the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* and its role in virulence and pathogenesis[J]. Adv Microb Physiol, 2021, 79: 89-132.
- [11] YANG F, ZHOU Y, CHEN P, et al. High-level expression of cell-surface signaling system Hxu enhances *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection[J]. Infect Immun, 2022, 90(10): e0032922.
- [12] KLEBBA P E, NEWTON S M C, SIX D A, et al. Iron acquisition systems of Gram-negative bacterial pathogens define TonB-dependent pathways to novel antibiotics[J]. Chem Rev, 2021, 121(9): 5193-5239.
- [13] LIN J, ZHANG W, CHENG J, et al. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14888.
- [14] BRADLEY J M, SVISTUNENKO D A, WILSON M T, et al. Bacterial iron detoxification at the molecular level [J]. J Biol Chem, 2020, 295(51): 17602-17623.
- [15] WILSON T, MOURINO S, WILKS A. The heme-binding protein PhuS transcriptionally regulates the *Pseudomonas aeruginosa* tandem sRNA prrF1, F2 locus [J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100275.
- [16] COLEMAN S R, BAINS M, SMITH M L, et al. The small RNAs PA2952. 1 and PrrH as regulators of virulence, motility, and iron metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Appl Environ Microbiol, 2021, 87 (3): e02182-2220.
- [17] NELSON C E, HUANG W, BREWER LK, et al. Proteomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* iron starvation response reveals PrrF small regulatory RNA-dependent iron regulation of twitching motility, amino acid metabolism, and Zinc homeostasis proteins[J]. J Bacteriol, 2019, 201(12): e00754.
- [18] CHEVALIER S, BOUFFARTIGUES E, BAZIRE A, et al. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2019, 1862(7): 706-721.
- [19] ROMANO A A, HAHN T, DAVIS N, et al. The Fe(III) and Ga(III) coordination chemistry of 3-(1-hydroxymethylidene) and 3-(1-hydroxydecylidene)-5-(2-hydroxyethyl)pyrrolidine-2,4-dione: novel tetramic acid degradation products of homoserine lactone bacterial quorum sensing molecules[J]. J Inorg Biochem, 2012, 107(1): 96-103.
- [20] LIU J, HOU J S, LI Y B, et al. Novel 2-Substituted 3-Hydroxy-1, 6-dimethylpyridin-4 (1H)-ones as Dual-Acting Biofilm Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Med Chem, 2020, 63(19): 10921-10945.
- [21] SOLDANO A, YAO H, CHANDLER J R, et al. Inhibiting iron mobilization from bacterioferritin in *Pseudomonas aeruginosa* impairs biofilm formation irrespective of environmental iron availability [J]. ACS Infect Dis, 2020, 6(3): 447-458.
- [22] DJAPGNE L, PANJA S, BREWER LK, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PrrF1 and PrrF2 small regulatory RNAs promote 2-Alkyl-4-Quinolone production through redundant regulation of the antR mRNA [J]. J Bacteriol, 2018, 200(10): e00704-17.
- [23] HOU L, DEBRU A, CHEN Q, et al. AmrZ regulates swarming motility through cyclic di-GMP-dependent motility inhibition and controlling Pel polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1847.
- [24] WIENS J R, VASIL A I, SCHURR M J, et al. Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. mBio, 2014, 5(1): e01010-01013.
- [25] YANG L, BARKEN K B, SKINDERSOE ME, et al. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology (Reading), 2007, 153 (Pt 5): 1318-1328.
- [26] ZHENG H, HUANG Z, CHEN T, et al. Gallium ions incorporated silk fibroin hydrogel with antibacterial efficacy for promoting healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wound [J]. Front Chem, 2022, 10: 1017548.
- [27] HIJAZI S, VISCA P, FRANGIPANI E. Gallium-Protoporphyrin IX Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting Cytochromes [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 12.
- [28] QIAO J, LIU Z, CUI S, et al. Synthesis and evaluation of an amphiphilic deferoxamine: gallium-conjugated cationic random copolymer against a murine wound healing infection model of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Acta Biomater, 2021, 126: 384-393.
- [29] GOSS C H, KANEKO Y, KHUU L, et al. Gallium disrupts bacterial iron metabolism and has therapeutic effects in mice and humans with lung infections [J]. Sci Transl Med, 2018, 10(460): eaat7520.
- [30] YAEGER L N, COLES V E, CHAN DCK, et al. How to kill *Pseudomonas*-emerging therapies for a challenging pathogen [J]. Ann N Y Acad Sci, 2021, 1496(1): 59-81.
- [31] HENDRICKS M R, LASHUA L P, FISCHER D K, et al. Respiratory syncytial virus infection enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth through dysregulation of nutritional immunity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(6): 1642-1647.
- [32] AALI M, CALDWELL A, HOUSE K, et al. Iron chelation as novel treatment for lung inflammation in cystic fibrosis [J]. Med Hypotheses, 2017, 104: 86-88. (下转第 2688 页)

达很多抑制型受体,包括 Siglec-6。用 siRNA 敲除可以下调 Siglec,能使 B 细胞功能恢复^[8]。虽然 Siglec-2/CD22 knockout 和 knockin 小鼠在最近几十年得以广泛的研究,但是经常得到相互矛盾的结论,因此 Siglecs 在 B 细胞中的功能还没有定论。对突变小鼠的研究表明,Siglec/SIAE/Lyn/SHP-1 路径对 B 细胞耐受和防止自身免疫都起着积极作用^[9]。唾液酸乙酰酯酶在疾病中很少出现遗传性变型,揭示了它可以避免人类的自身免疫和慢性炎症混乱^[10],但是其在细胞中的生化功能仍然不完全了解。

对 Siglecs 的研究进一步证实了 Siglec-6 可能在感染和免疫疾病的诊断和治疗中发挥重要作用,具有广阔的应用前景。这也说明了 Siglec-6 单克隆抗体和多克隆抗体等相关产品的开发具有潜在的应用价值。综上所述,采用合成多肽技术,对不同 Siglec-6 表位的多克隆抗体进行制备,不但提供了一种简单、高效的方法,而且为 Siglec-6 相关产品的开发以及 Siglec-6 相关的基础和临床研究提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] SHITENG D,JAMES C P. Siglecs as immune cell checkpoints in disease[J]. Annu Rev Immunol,2020,38(4):365-395.

[2] DÂLIA R R,PATRICIA R I,MARÇAL G,et al. Role of Siglecs in viral infections;a double-edged sword interaction[J]. Mol Aspects Med,2023,90(4):101113.

[3] BEATA O,MIROSLAWA F S. Seminal plasma glycopro-

(上接第 2669 页)

[33] METTRICK K,HASSAN K,LAMONT I,et al. The Iron-chelator, N, N'-bis (2-hydroxybenzyl) Ethylenediamine-N, N'-Diacetic acid is an effective colistin adjunct against clinical strains of biofilm-dwelling Pseudomonas aeruginosa[J]. Antibiotics (Basel),2020,9(4):144.

[34] NAIR A,PERRY A,PERRY J D,et al. In vitro effects of combined iron chelation,antibiotics and matrix disruption on clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa[J]. J Antimicrob Chemother,2020,75(3):586-592.

[35] THI MTT,WIBOWO D,REHM BHA. Pseudomonas aeruginosa Biofilms[J]. Int J Mol Sci,2020,21(22):8671.

[36] ZHANEL G G,GOLDEN A R,ZELENITSKY S,et al. Cefiderocol;a siderophore cephalosporin with activity against Carbapenem-resistant and multidrug-resistant Gram-negative bacilli[J]. Drugs,2019,79(3):271-289.

[37] LOUPIAS P,LAUMAILLE P,MORANDAT S,et al. Synthesis and study of new siderophore analog-ciprofloxacin conjugates with antibiotic activities against Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia spp[J]. Eur J Med Chem,2023,245(Pt 2):114921.

[38] SETHUPATHY S,PRASATH K G,ANANTHI S,et al. Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis

teins as potential ligands of lectins engaged in immunity regulation[J]. Int J Environ Res Public Health,2022,19(17):10489.

[4] BAX M,KUIJF M L,HEIKEMA A P,et al. Campylobacter jejuni lipooligosaccharides modulate dendritic cell-mediated T cell polarization in a sialic acid linkage-dependent manner[J]. Infect Immun,2011,79(7):2681-2689.

[5] RICHA D,JYOTI P S. Protein function prediction using functional inter-relationship [J]. Comput Biol Chem,2021,95(12):107593.

[6] EDGAR A H,MARK A B,KELLY K L. Bridging protein structure,dynamics,and function using hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry[J]. Protein Sci,2020,29(4):843-855.

[7] ALBERTO J E,LORRAINE V K,ZIV G O,et al. Disease modification and biomarker development in Parkinson disease: revision or reconstruction? [J]. Neurology,2020,94(11):481-494.

[8] KARDAVA L,MOIR S,WANG W,et al. Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA down-regulation of inhibitory receptors[J]. J Clin Invest,2011,121(7):2614-2624.

[9] MENEZES J CJ MDS,DIEDER ICH M F. Bioactivity of natural biflavonoids in metabolism-related disease and cancer therapies[J]. Pharmacol Res,2021,167(5):105525.

[10] VINAY S M,SHIV P. Sialic acids and autoimmune disease[J]. Immunol Rev,2016,269(1):145-61.

(收稿日期:2023-03-02 修回日期:2023-05-26)

and oxidative stress response in Pseudomonas aeruginosa PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production[J]. J Proteomics,2016,145:112-126.

[39] PANG Z,RAUDONIS R,GLICK B R,et al. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies [J]. Biotechnol Adv,2019,37(1):177-192.

[40] YADAV S,SINGH A K,AGRAHARI A K,et al. Making of water soluble curcumin to potentiate conventional antimicrobials by inducing apoptosis-like phenomena among drug-resistant bacteria[J]. Sci Rep,2020,10(1):14204.

[41] HABASH M B,GOODYEAR M C,PARK A J,et al. Potentiation of tobramycin by silver nanoparticles against pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother,2017,61(11):e00415-17.

[42] XIU W,REN L,XIAO H,et al. Ultrasound-responsive catalytic microbubbles enhance biofilm elimination and immune activation to treat chronic lung infections[J]. Sci Adv,2023,9(4):eade5446.

(收稿日期:2023-02-03 修回日期:2023-05-28)