

• 综述 •

铜绿假单胞菌和白假丝酵母的跨界相互作用

陈佳, 宋建新

华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科, 武汉 430030

摘要:铜绿假单胞菌和白假丝酵母(又称白念珠菌)这两种条件致病菌可共存于人体。两者间存在复杂的相互关系, 即跨界相互作用。铜绿假单胞菌抑制白念珠菌形态转换, 抑制其生物膜形成并毒杀其菌丝; 白念珠菌则抑制铜绿假单胞菌绿脓素形成并抑制其丛集运动。跨界相互作用可能存在3种机制:信号转导通路、生物膜和毒力因子。铜绿假单胞菌通过信号分子N-3-氧代十二烷酰-L-同型丝氨酸内酯(3-oxo-C₁₂-HSL)抑制白念珠菌形态转换, 而白念珠菌通过信号分子法呢醇抑制铜绿假单胞菌绿脓素生成和丛集运动, 即存在信号分子介导的跨界相互作用。跨界相互作用影响铜绿假单胞菌和白念珠菌各自的致病性。如能充分利用跨界相互作用, 将有助于优化治疗的选择。

关键词:白假丝酵母; 铜绿假单胞菌; 跨界相互作用; 群体感应

Cross-kingdom interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*

CHEN Jia, SONG Jian-Xin

Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* can coexist in the human body. There is a complex interaction between these two opportunistic pathogens, which has been defined as a cross-kingdom interaction where *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the morphological changes, formation of bacterial biofilm in *Candida albicans*, and *Candida albicans* inhibits the formation of pyocyanine and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. Cross-kingdom interactions may exist via three mechanisms: quorum sensing, biofilm, and toxicity. Through the secretion of the signaling molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL), *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the conversion of *Candida albicans* from yeast to hypha. By secretion of the signaling molecule farnesol, *Candida albicans* inhibits the formation of pyocyanine and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. These events suggest that these cross-kingdom interactions are partly mediated by signal molecules. Due to the presence of these cross-kingdom interactions, the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* is impacted, which may be helpful in choosing better treatment options.

Key words: *Candida albicans*; *Pseudomonas aeruginosa*; Cross-kingdom interaction; Quorum sensing

在研究细菌过程中, 与细菌群体活动密切相关的信号系统——群体感应(quorum sensing, QS)系

统的发现, 具有重要意义。细菌合成并释放信号分子, 胞外信号分子浓度随细菌密度的增加而增加, 达

基金项目: 国家自然科学基金(30873189)

通信作者: 宋建新

Corresponding author: SONG Jian-Xin, E-mail: songsingsjx@sina.com

到阈浓度后能启动菌体中相关基因表达,调控细菌生物行为,适应环境变化^[1]。细菌利用QS系统相互交流,以群体的形式改变菌群的生物学特性,从而达到整个菌群最适合的生存状态。同样,在研究白假丝酵母〔又称白念珠菌(*Candida Albicans*)〕过程中,具有相似交流作用的信号分子——法呢醇(farnesol)及其对应信号系统的发现,让人类对真菌的认识发生了较大改变^[2]。进一步研究表明,这种相互交流并非局限于种群内部。共存于各种环境的细菌与真菌间存在复杂的相互关系,既有竞争、拮抗作用,也有协同、互助作用。如混合生物膜(biofilm)中的细菌与真菌相互竞争黏附位点,同时口腔细菌通过为白念珠菌提供黏附位点而帮助其定植。于是,有人将细菌与真菌间的这种关系定义为跨界相互作用(cross-kingdom interaction)^[3]。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和白念珠菌这两种可共存于人体的条件致病菌,其相互作用很早就引起了人们的注意^[4-6]。早期研究认为,铜绿假单胞菌具有抗白念珠菌作用。如Gupta等通过分析烧伤患者伤口的病原菌类型,发现感染铜绿假单胞菌的伤口合并白念珠菌感染的概率明显低于对照组,因而认为铜绿假单胞菌抑制白念珠菌生长^[7,8]。而近期研究表明,白念珠菌的存在同样可制约铜绿假单胞菌的致病性^[9]。综合现有研究,两者间的跨界相互作用也并非简单的竞争、拮抗。本文将从几种可能的机制探讨铜绿假单胞菌与白念珠菌的跨界相互作用及其临床意义。

1 信号转导通路

铜绿假单胞菌和白念珠菌均存在信号分子和对应的QS系统。经研究发现,铜绿假单胞菌至少存在3套密度感应系统:以N-3-氧代十二烷酰-L-同型丝氨酸内酯〔N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone,3-oxo-C₁₂-HSL〕为信号分子的Las系统、以N-丁酰基-L-同型丝氨酸内酯(N-butyryl-L-homoserine lactone,C₄-HSL)为信号分子的Rhl系统和以2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮为信号分子的喹诺酮信号(*pseusomonas qinolone signal*,PQS)系统。Las包括LasR(一种正向转录激活蛋白)和LasI〔催化血浆纤溶酶原激活物抑制物(plasminogen activator inhibitor 1,PAI-1)合成〕;Rhl包括RhlR和RhII(催化PAI-2合成)。LasR和RhII协调铜绿假单胞菌多种毒力因子的转录,如弹性蛋白酶、溶血素、除铁色素、超氧化物歧化酶、

碱性蛋白酶、壳多糖酶等^[10]。PQS连接Las和Rhl系统,一方面Las和Rhl控制PQS生成,另一方面PQS又影响Las和Rhl的基因表达,两者存在微妙的平衡关系。此外,PQS还在调整细菌密度、释放毒力因子绿脓素等方面起一定作用^[11]。

目前学者一致认为,白念珠菌这一双相菌,通过分泌信号分子——法呢醇来调节基因表达、形态改变和毒力变化,即存在以法呢醇为信号分子的QS系统。法呢醇,这一12碳原子的倍半萜烯,不仅是一种致病因子,还可抑制白念珠菌形态转换和生物膜形成。Cao等通过cDNA微阵列分析发现,使用法尼醇抑制白念珠菌生物膜形成时伴有274个基因的表达水平发生改变,其中包括有关细胞壁蛋白、菌丝生长(形态转换)、外排泵及热休克蛋白的基因^[12]。据推测,法呢醇对生物膜的抑制作用是通过组氨酸激酶(CHK1)的表达或激活来实现的^[13]。

最新研究表明,白念珠菌的信号分子法呢醇和铜绿假单胞菌的信号分子3-oxo-C₁₂-HSL不仅在自身QS系统中发挥作用,还可改变对方的生物学行为,具体作用如下。

1.1 3-oxo-C₁₂-HSL对白念珠菌形态转换的抑制作用

当共同培养白念珠菌与铜绿假单胞菌时,即便生长于诱导假菌丝形成的环境中,白念珠菌仍以酵母形态存在,无法完成形态转换。进一步研究表明,铜绿假单胞菌分泌的信号分子3-oxo-C₁₂-HSL抑制白念珠菌酵母细胞的丝化,使其无法形成假菌丝^[14,15]。Hogan等研究发现,200 μmol/L的3-oxo-C₁₂-HSL即可完全抑制白念珠菌形态转换。相反,将不能分泌3-oxo-C₁₂-HSL的铜绿假单胞菌突变株与白念珠菌共同培养时,后者形态转换并未受影响^[14]。

白念珠菌从酵母形态转换为菌丝形态在其黏附中起至关重要的作用,而黏附于组织是白念珠菌最终定植并致病的前提条件。相关研究表明,菌丝形态生长的白念珠菌具有更强的黏附性和侵袭性,也具有更强的致病性^[16]。铜绿假单胞菌对白念珠菌形态转换的抑制,必将影响其黏附和定植,最终削弱其致病性。这也提示,广泛寄居于人体各部位的白念珠菌之所以呈酵母相,一定程度上归因于其他共存的微生物对其形态转换的抑制。而肠道菌群的平衡状态,与这种跨界制约作用有着密切的关系。本课题组初步研究表明,改变铜绿假单胞菌*pvdQ*基因(具有长链高丝氨酸内酯水解作用)表达,可影响

铜绿假单胞菌对白念珠菌形态转换的抑制作用。

1.2 法呢醇对 PQS 的抑制作用

Cugini 等^[9]将法呢醇加入铜绿假单胞菌的培养基 15 min 后,通过反转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)和实时 PCR 等方法观察到,编码 PQS 的相关基因 *pqsA* 表达下调,以及序贯发生 PQS 分子减少和绿脓素产量降低。绿脓素是铜绿假单胞菌较为重要的毒力因子。体外研究已证实,绿脓素具有钝化过氧化氢酶等各种酶、广泛损伤细胞、诱导细胞凋亡及改变机体免疫反应等作用^[17]。法呢醇对 PQS 的抑制作用导致绿脓素减少,必将影响铜绿假单胞菌的致病性。

1.3 法呢醇对丛集运动的抑制作用

丛集运动(swarming motility)是铜绿假单胞菌的 3 种运动形式之一,也是细菌应对黏稠环境的复杂适应过程。Overhage 等^[18]应用 DNA 微阵列实验观察到,在促丛集运动条件下,大量毒力相关基因表达上调,故推断丛集运动与铜绿假单胞菌的致病性有着密切关系。

McAlester 等^[15]研究表明,法呢醇有降低铜绿假单胞菌丛集运动的能力。目前已证实,鼠李糖脂(铜绿假单胞菌的一种致病因子)以生物表面活化剂的方式调节丛集运动,而鼠李糖脂的表达受 PQS 的调控。不难假设,法呢醇对丛集运动的抑制与其对 PQS 的抑制作用有关。鉴于丛集运动与致病性的关系,法呢醇的这种抑制作用势必影响铜绿假单胞菌的致病性。

综上所述,铜绿假单胞菌与白念珠菌的跨界相互作用依赖于各自的信号分子。因此,推测白念珠菌和铜绿假单胞菌的各自信号转导系统可感知彼此的存在并作出相应反应,也就是说它们之间可能存在信号系统的跨界作用,而且这种跨界相互作用影响彼此的致病性。

2 生物膜

在绝大多数环境中,微生物都倾向于以生物膜的形式存在。白念珠菌和铜绿假单胞菌均可形成各自的生物膜,也可与其他细菌(或真菌)混合存在于同一生物膜中。在混合生物膜中,各微生物相互竞争附着点。白念珠菌的凝集素样序列和细胞表面糖蛋白因牵涉到黏附于宿主表面的过程,通常在混合生物膜的形成中起重要作用。

体外研究证实,铜绿假单胞菌将从数量和质量

上抑制白念珠菌生物膜的形成^[19]。亦有学者观察到一个有趣的现象,将白念珠菌与铜绿假单胞菌混合培养时,铜绿假单胞菌可在白念珠菌菌丝上形成致密的生物膜。几乎在生物膜形成的同时,白念珠菌菌丝死亡,而对酵母细胞并无影响^[20]。通过对一系列铜绿假单胞菌突变株的研究,Hogan 等证实铜绿假单胞菌的某些毒力因子,包括菌毛和分泌的可溶性分子,参与杀菌丝的过程。随后的研究表明,菌丝死亡涉及直接接触和可溶性分子介导 2 种调控模式^[21]。

El-Azizi 等^[22]通过直接计数生物膜中细菌或真菌数量的变化,研究其相互作用。发现将铜绿假单胞菌加入白念珠菌的成熟生物膜中,细菌数量显著增加;相反,将白念珠菌加入铜绿假单胞菌的成熟生物膜中,真菌数量则不会增加。比较不同微生物对导尿管黏附能力的体外研究亦证实,白念珠菌的存在将增强铜绿假单胞菌对导尿管的黏附^[23]。上述现象可能与白念珠菌的黏附能力和形成生物膜的能力强于铜绿假单胞菌有关。混合生物膜中白念珠菌并未对铜绿假单胞菌产生竞争、拮抗作用;相反,它增强铜绿假单胞菌的黏附能力,促进其生物膜形成。

通过生物膜这一可能机制,铜绿假单胞菌发挥其对白念珠菌的杀菌丝作用,最终将限制白念珠菌的致病性;同时,白念珠菌对铜绿假单胞菌生物膜形成的协同作用,可能在一定程度上增强其致病性和耐药性。

3 毒力因子

早在 1973 年,就有研究发现,含绿脓素的铜绿假单胞菌氯仿粗提物具有抗白念珠菌作用。后来 Kerr 等^[24]通过高效液相层析仪分离细菌浸液(铜绿假单胞菌临床分离株),并经紫外分光及质谱分析验证,进一步证明绿脓素这一氧化还原色素发挥主要的抗真菌作用,其机制为绿脓素降低白念珠菌菌丝转换所依赖的胞内 cAMP 量^[25]。最新研究^[26]表明,绿脓素的前体 5-甲基-盐酸异丙嗪-1-羧酸(5-MPCA)间接发挥抗真菌作用,因为 5-MPCA 相关红色素与真菌活力下降有关,但绿脓素并非是其发挥抗真菌作用所必需的;这一 5-MPCA 衍生的红色素在真菌胞内聚集,并保留氧化还原的能力,因而推断这种氧化还原能力与真菌毒力下降有关。总之,铜绿假单胞菌分泌的某些毒力因子参与其抗白念珠菌的过程。

以上所述3种机制并非各自独立。已证实铜绿假单胞菌的某些毒力因子也参与菌丝表面生物膜形成和菌丝死亡过程。生物膜作为一种细菌群体、细菌间及细菌与环境间的信号传递,对生物膜的形成与成熟发挥重要作用。总之,信号转导、生物膜、毒力因子共同作用于白念珠菌与铜绿假单胞菌的跨界相互作用,详细机制还有待进一步研究。

4 结语

白念珠菌与铜绿假单胞菌均为条件致病菌。铜绿假单胞菌对白念珠菌形态转换的抑制以及杀菌丝和毒力因子的毒性作用,可能很大程度限制白念珠菌的致病性。而白念珠菌对铜绿假单胞菌PQS的抑制作用,导致其毒力因子绿脓素产量下降以及丛集运动减退,也将削弱其致病性。正是因为两者的跨界相互作用,相互制约而维持平衡,在一定条件下保证了各自的条件致病性。一旦这种平衡被打破,各自的致病性将会引起机体损害。铜绿假单胞菌和白念珠菌如何相互作用而影响彼此的致病性,具体机制还需要更深入研究。

临幊上,长期或大量使用抗生素常可导致真菌感染。这种继发感染的发生机制很可能与本文提及的跨界相互作用有关,即细菌被杀灭后其对真菌的抑制作用也随之消失。提示在对细菌感染性疾病的治疗过程中应充分重视跨界相互作用的存在,更合理使用抗菌药物,从而避免激发真菌感染。同样,在抗真菌治疗时也应考虑同时调整抗细菌药物的使用,以修复细菌和真菌的平衡,降低继发严重感染的风险。

跨界相互作用也为研究新药提供了方向。如果能充分利用其相互制约致病性的特点,选择合适靶点,将为治疗带来极大便利。

参考文献

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(2): 269-275.
- [2] Hornby JM, Jensen EC, Liseć AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 2982-2992.
- [3] Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 299(1): 1-8.
- [4] Kaleli I, Cevahir N, Demir M, Yildirim U, Sahin R. Anticandidal activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens [J]. *Mycoses*, 2007, 50(1): 74-78.
- [5] Kerr JR. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(2): 525-527.
- [6] Wargo MJ, Hogan DA. Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(4): 359-364.
- [7] Hughes WT, Kim HK. Mycoflora in cystic fibrosis: some ecologic aspects of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* [J]. *Mycopathol Mycol Appl*, 1973, 50(3): 261-269.
- [8] Gupta N, Haque A, Mukhopadhyay G, Narayan RP, Prasad R. Interactions between bacteria and *Candida* in the burn wound [J]. *Burns*, 2005, 31: 375-378.
- [9] Cugini C, Calfee MW, Farrow JM 3rd, Morales DK, Pesci EC, Hogan DA. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 65(4): 896-906.
- [10] Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors [J]. *EMBO J*, 2003, 22(15): 3803-3815.
- [11] Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámarra M, Williams P N. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density dependence of quorum sensing hierarchy, regulates Rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 50(1): 29-43.
- [12] Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(2): 584-589.
- [13] Kruppa M, Krom BP, Chauhan N, Bambach AV, Cihlar RL, Calderone RA. The two-component signal transduction protein Chklp regulates quorum sensing in *Candida albicans* [J]. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(4): 1062-1065.
- [14] Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 54(5): 1212-1223.
- [15] McAlester G, O'Gara F, Morrissey JP. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 5): 563-569.
- [16] Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1 [J]. *Science*, 1999, 283(5407): 1535-1538.

- [17] Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(12): 599-606.
- [18] Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock RE. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(8): 2671-2679.
- [19] Bandara HM, Yau JY, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in vitro *Candida* biofilm development [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 125.
- [20] Hogan DA, Kolter R. *Pseudomonas-Candida* interactions: An ecological role for virulence factors [J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2229-2232.
- [21] Brand A, Barnes JD, Mackenzie KS, Odds FC, Gow NA. Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 287(1): 48-55.
- [22] El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms [J]. *J Appl Microbiol*, 2004, 96 (5): 1067-1073.
- [23] Falleiros de Pádua RA, Norman Negri MF, Svidzinski AE, Nakamura CV, Svidzinski TI. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to urinary catheters [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2008, 25(3): 173-175.
- [24] Kerr JR, Taylor GW, Rutman A, Høiby N, Cole PJ, Wilson R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth [J]. *J Clin Pathol*, 1999, 52(5): 385-387.
- [25] Kanthakumar K, Taylor G, Tsang KW, Cundell DR, Rutman A, Smith S, Jeffery PK, Cole PJ, Wilson R. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro [J]. *Infect Immun*, 1993, 61 (7): 2848-2853.
- [26] Gibson J, Sood A, Hogan DA. *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* interactions: Localization and fungal toxicity of a phenazine derivative [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(2): 504-513.

(收稿日期:2009-12-08)