

一、项目名称：铜绿假单胞菌的致病性和耐药性机制研究

二、主要完成人情况：

姓名	行政职务	排名	技术职称	工作单位	对本项目主要学术合技术创造性贡献
梁海华	无	1	教授	西北大学	带领团队并作为主要完成人完成了“重要科学发现”中所列的第一、二、三、四、七和八项等研究成果。发现若干参与调节铜绿假单胞菌群体感应系统的蛋白并拓展了对该信号传导系统的认识；发展和优化了ChIP-seq技术在铜绿假单胞中的应用；阐述了亚抑制浓度的抗生素可作为信号分子参与铜绿假单胞菌基因调节的机理。
沈立新	无	2	教授	西北大学	该项目的中坚力量，完成了“重要科学发现”中所列的第五、六、七、八等内容。发现了亚抑制浓度抗生素对铜绿假单胞菌毒性因子的调节作用；筛选到新的药物靶点，并依据分子研究基础，对中药有效成分进行了鉴定和作用机制的研究。
张亚妮	无	3	副教授	西北大学	作为项目主要完成人，完成了“重要科学发现”中所列的第四、五项内容。研究临床致病菌的耐药趋势和致病机理，并对实验室研究结果进行了完善补充；发现抗氧化剂谷胱甘肽可作为信号分子调节铜绿假单胞菌毒性因子表达并影响生物被膜的形成。
段康民	无	4	教授	西北大学	作为主要完成人，完成了“重要科学发现”中所列的第一、三、四、五、六、七和八项等内容。在国际上首次证实不同细菌间相互作用在感染中的重要作用，并应用到临床治疗上。提出并初步证实中药抗菌主要通过抑制病原菌致病因子这一新的抗菌机理
孔伟娜	无	5	讲师	西北	作为本项目的骨干力量，参与完成了“重要科学发现”中所列的第三、五内容。发现了一个感应激酶-反

				大学	应调节子复合体PA1611，该蛋白可同时显著影响III型分泌系统和生物被膜的形成，表明它是急慢性感染转化过程中的潜在关键调节子。
陈林	无	6	讲师	西北 大学	作为本项目的骨干力量，参与完成了“重要科学发现”中所列的第五、六、七内容。发现一个ABC转运器（由PA4456-4452操纵子编码）通过外排抗生素或者化合物的方式提高自身对抗生素的抗性。同时，进一步确定了解了该转运器受到双组份调节系统PhoP-PhoQ的调节。

三、完成人合作关系说明：

梁海华作为项目第一完成人，全面负责项目的设计、指导和完成。主要负责铜绿假单胞菌致病性机制和基因功能的研究，其中在铜绿假单胞菌群体感应系统方面做了大量细致深入的研究；

项目第二完成人沈立新为该项目的中坚力量，主要负责细菌耐药性相关研究，发现亚抑制浓度抗生素对铜绿假单胞菌毒性因子的调节机制，并依据分子研究基础，完成了中药有效成分鉴定和作用机制的研究。项目第三完成人张亚妮，主要负责抗氧化系统与铜绿假单胞菌致病性的关系以及临床病原菌耐药趋势及机制的研究。项目第四完成人段康民主要负责铜绿假单胞菌三型分泌系统和抗细菌中草药活性成分研究。

孔伟娜和陈林作为本项目的骨干力量，参与项目的设计和完成，做了大量基础性和原创性的工作。

四、项目简介

抗生素的发现是20世纪医学史上最伟大的革命，然而，抗生素在发挥其疗效的同时也给予细菌强大的选择压力，从而催生、富集了耐药性菌株的产生。据不完全统计，全球每年约有1000万人死于耐药性病原菌感染，数量超过癌症死亡人数。因此，预防和控制耐药菌的产生和蔓延已是人类亟待解决的重要问题之一。面对细菌抗生素耐药的严峻挑战，人们开始探索新的抗细菌感染策略如开发新型抗细菌致病力药物、噬菌体疗法和粪菌移植等。其中，基于病原菌致病机制的抗致病力药物研发正在成为人们研究的焦点。

铜绿假单胞菌是一种机会致病菌，在院内获得性呼吸系统感染病例中，检出率仅次于金黄色葡萄球菌，严重危害着人类的生命健康。2017年2月，世界卫生组织将对治疗耐药性铜绿假单胞菌感染药物的需求列为“极为重要”（critical）级。本项目以铜绿假单胞菌为研究对象，聚焦于致病性与耐药性形成机制，致力于为新型抗细菌感染药物特别是抗致病力药物（anti-virulence drugs）的研究提供关键的靶点和新的理论基础。基于上述研究目的，我们近些年来主要开展了以下方面的研究工作：（1）细菌毒力基因调控网络的构建。铜绿假单胞菌利用复杂的基因调控系统控制大量的毒性因子及相关基因的表达，从而决定细菌的致病力和耐药性，使其能够适应不同的宿主环境。其中，群体感应系统（Quorum-sensing system）、环二鸟苷酸（c-di-GMP）信号传导系统、双组份系统、三型和六型分泌系统是铜绿假单胞菌的重要信号传导和毒性因子表达调控系统。本项目围绕这些重要调控网络，抽丝剥茧、层层递进，寻找确定其中关键调控基因，以期找到阻断毒性因子表达关键位点。其中群体感应系统是革兰氏阴性菌最重要的信号调解网络，控制着铜绿假单胞菌至少300个左右的基因。该项目在群体感应系统方面作了大量细致深入的研究工作，发现了QteE, RsaL, VqsM, VqsR和CdpR等多个与群体感应系统相关的调控蛋白，扩充了对群体感应调控网络的认识。此外，我们发现感应激酶-反应调节子复合体PA1611，可同时显著影响三型分泌系统和生物被膜的形成，证明它是急-慢性感染转化过程中的潜在关键调节子。这些工作有力推进了对铜绿假单胞菌致病性机制的认识，并为探索潜在的药物靶点、筛选或设计抗致病性的小分子研究提供了可靠的理论基础。（2）抗细菌致病力中草药活性成分的筛选及机制研究。中草药作为抗细菌感染药物具有显著的疗效，且具有几千年的应用历史，但中药抗生素成分及作用机制尚未被深入研究，也严重影响了中药的现代化应用。我们在铜绿假单胞菌致病及耐药分子机制研究基础上，以77种与“清热解毒”有关的中药为对象，对铜绿假单胞菌关键的致病因子基因和群体感应基因进行筛选，发现约60%的中药材如黄芩、艾叶等提取物中含有有效抗致病成分。在完成具有抗致病性中药及其功能有效成份筛选的同时，并分离和鉴定单一有效的活性物质的抗致病机制。此方面的研究为寻找抗致病力药物提供了更多的可能性并将开启中草药发展的新篇章。

该研究获得了国家自然科学基金优秀青年基金、多项国家自然科学基金面上项目以及省自然科学基金的资助。共发表论文82篇，其中SCI收录59篇，包括PLoS Biol、Nucleic Acids Res和Mol Microbiol等。申请专利1项。我们利用近年发展起来的高通量测序技术

(ChIP-seq和RNA-seq)，结合化学生物学、反向遗传学、分子生物学、功能基因组学等多种技术，系统地研究了病原菌中的信号传递途径及耐药性的具体调控机制，在多个层次推进了对其致病性和耐药性机制的认识，并进行了新型抗致病力药物的筛选。这些研究成果为更好地控制病原菌的感染，以及为新抗致病力药物的开发和探索其它潜在的药物靶点提供了可行的研究范例并积累了经验。

五、主要论文专著目录

序号	论文专著名称	刊名	作者	影响因子	年卷页码	发表时间	通讯作者	第一作者	国内作者	SCI他因次数	他引总次数	知识产权是否归国内所有
1	Crystal structure of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> RsaL bound to promoter DNA reaffirms its role as a global regulator involved in quorum-sensing	Nucleic Acids Res	Huaping Kang, Jianhua Gan, Jingru Zhao, Weina Kong, Jing Zhang, Miao Zhu, Fan Li, Yaqin Song, Jin Qin and Haihua Liang	10.16	2017,45(2):699-710	2016-10-18	梁海华	康华平	康华平,甘建华,赵静茹,孔伟娜,张静,祝淼,李帆,宋雅琴,秦静,梁海华	2	2	是
2	Structural and molecular mechanism of CdpR involved in quorum-sensing and bacterial virulence in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>PLoS Biol</i>	Jingru Zhao, Xiang Yu, Miao Zhu, Huaping Kang, Jinbiao Ma, Jianhua Gan, Xin Deng* and Haihua Liang	9.79	2016.14(4):e1002449	2016-04-27	梁海华	赵静茹	赵静茹,于翔,祝淼,康华平,马金彪,甘建华,邓欣,梁海华	3	4	是
3	ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nucleic Acids Res	Weina Kong, Jingru Zhao, Huaping Kang, Miao Zhu, Xin Deng* and Haihua Liang	10.16	2015,43(17):8268-8282	2015-07-22	梁海华	孔伟娜	孔伟娜,赵静茹,康华平,祝淼,邓欣,梁海华	7	12	是
4	Modulation of type III secretion system in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Involvement of the PA4857 gene product	Front Microbiol.	Miao Zhu, Jingru Zhao, Huaping Kang, Weina Kong and Haihua Liang	4.07	2016,28(7): 1-7	2016-02-28	梁海华	祝淼	祝淼,赵静茹,康华平,孔伟娜,梁海华	3	5	是
5	Molecular mechanism of master regulator VqsM mediating quorum-sensing and antibiotic resistance in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Nucleic Acids Res.	Haihua Liang*, Xin Deng, Yan Ye and Min Wu	10.16	2014,42(16): 10307-10320	2014-07-17	梁海华	梁海华	梁海华,邓欣,叶妍	7	12	是
6	Molecular mechanisms of two-component system RhpRS regulating type III secretion	Nucleic Acids Res.	Xin Deng1, Haihua Liang1, Chuan He, Lefu Lan* and Xiaoyan Tang	10.16	(2014), 42(18): 11472-1	2014-09-23	唐晓燕	梁海华	邓欣,梁海华,蓝乐夫,唐晓燕	5	8	是

	system in <i>Pseudomonas syringae</i> .				1486.							
7	The <i>Pseudomonas aeruginosa</i> global regulator VqsR directly inhibits QscR to control quorum-sensing and virulence gene expression.	J Bacteriol.	Haihua Liang, Xin Deng, Quanjiangji, Tuo Shen and Chuan He	3.14	2012,194 (12): 3098-3108.	2012-04-13	梁海华	梁海华	梁海华, 邓欣, 纪管强, 沈拓	17	27	是
8	Characterization of a novel gene related to antibiotic susceptibility in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	The Journal of Antibiotics,	Lixin Shen, Yanling Ma, Haihua Liang	2.23	2012, 65(2): 59-65	2011-12-07	梁海华	沈立新	沈立新, 马艳玲, 梁海华	3	8	是
9	Effect of Glutathione on Pyocyanin Production in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .,	Asian J. Chem.	Yani Zhang*, Xiaolong Shao, Shihong Wang, Siqu Zhang.	0.35	2014, 26(11), 3265-3269	2014-05-25	张亚妮	张亚妮	张亚妮, 邵小龙, 王世红, 张思琪	0	0	是
10	Inhibition of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biofilm Formation by Traditional Chinese Medicinal Herb <i>Herba patriniae</i> .	BioMed Research International	Fu, B., Q. Wu, M. Dang, D. Bai, Q. Guo, L. Shen, K. Duan	2.47	2017: (136) :1-10	2017-03-09	段康民	付博	付博, 武巧连, 白档档, 郭俏, 沈立新,	0	3	是
11	A PhoPQ-Regulated ABC Transporter System Exports Tetracycline in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	Antimicrob Agents Chemother	Chen L, Duan K*.	4.3	2016,60: 3016-3024.	2016-03-07	段康民	陈林	陈林, 段康民	3	7	是
12	Potential Use of Dimethyl Sulfoxide in Treatment of Infections Caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Antimicrob Agents Chemother.	Guo Q, Wu Q, Bai D, Liu Y, Chen L, Jin S, Wu Y, Duan K	4.3	2016, 60:7159-7169.	2016-09-19	段康民	郭俏	郭俏, 武巧连, 白档档, 刘玉, 陈林, 晋升, 武玉婷, 段康民	1	2	是
13	The role of the temperature-regulated acyltransferase (PA3242) on growth, antibiotic resistance and virulence in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Microbial Pathogenesis.	Y Liang, Z Guo, L Gao, Q Guo, L Wang, Y Han, K Duan, L Shen	2	2016, 101: 126-135	2016-10-13	沈立新	梁鹰	梁鹰, 郭子晟, 高浪, 郭倩倩, 王荔月, 韩妍, 段康民, 沈立新	2	2	是
14	Pleiotropic effects of temperature-regulated 2-OH-lauroyltransferase (PA0011) on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> antibiotic resistance, virulence and typeIII secretion system,	Microbial Pathogenesis,	Bobo Wang, Bo Li, Ying Liang, Jing Li, Lngao Gao, Lin Chen, Kangmin Duan, Lixin Shen*,	2	2016, 91: 5-17	2015-10-13	沈立新	王波波	王波波, 李博, 梁鹰, 李晶, 高浪, 陈林, 段康民, 沈立新	1	4	是

15	PqsR-dependent and PqsR-independent regulation of motility and biofilm formation by PQS in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	J Basic Microbiol.	Guo Q, Kong W, Jin S, Chen L, Xu Y, Duan K	1.4	2014, 54:633-643.	2013-07-21	段康民	郭俏	郭俏, 孔伟娜, 晋林升, 陈林, 徐洋洋, 段康民	10	19	是
16	Hybrid sensor kinase PA1611 in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS	Mol Microbiol.	Kong W, Chen L, Zhao J, Shen T, Surette MG, Shen L, Duan K	3.89	. 2013, 88:784-797.	2013-04-21	段康民	孔伟娜	孔伟娜, 陈林, 赵洁琼, 沈立托, 沈立新, 段康民	21	41	是
17	Construction of a tightly-controlled expression system for use in <i>Pseudomonas</i>	Biotechnol Lett	Yang L, Chen L, Shen L, Duan K*.	1.73	2013, 35:1901-1906.	2013-07-24	段康民	杨亮	杨亮, 陈林, 沈立新	2	3	是
18	Inhibition of Quorum Sensing-Associated Virulence Factors in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 by Folium <i>Artemisiae Argyi</i> Extract	Journal of Pure and Applied Microbiology	Qiao Guo, Sheng Jin, Jun Xiao, Deqing Zhang, Lixin Shen, Kangmin Duan*.	0.1	2013, 7(1):261-270.	2013-07-21	段康民	郭俏	郭俏, 孔伟娜, 晋林升, 陈林, 徐洋洋, 段康民	1	2	是
19	PA2800 Plays an Important Role in Both Antibiotic Susceptibility and Virulence in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ,	Curr Microbiol	Lixin Shen, Xiangli Gao, Jinhua Wei, Lin Chen, Xin Zhao, Bo Li, Kangmin Duan	1.32	2012, 65(5):601-610	2012-08-10	段康民	沈立新	沈立新, 高向丽, 魏金华, 陈林, 赵博欣, 李博, 段康民	7	9	是
20	Inactivation of MuxABC-OpmB Transporter system in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> leads to increased ampicillin and carbenicillin in resistance and decreased virulence	J Microbiol	Yang L, Chen L, Shen L, Surette M, Duan K	1.92	2011, 49(1):107-114	2010-10-05	段康民	杨亮	杨亮, 陈林, 沈立新	15	21	是

六、主要知识产权证明目录：

序号	知识产权类别	知识产权具体名称	国家 (地区)	授权号	授权日期	证书编号	权利人	发明人	专利有效 状态	对应 附件 编号
1	专利	用于假单胞菌属细菌的可控表达载体及应用及控制母的产物或mRNA产生的方法	中国	ZL201010143481.3	2014-07-02	1445902	西北 大学	段康民等	公开	2-1-1

七、客观评价

本项目以铜绿假单胞菌为研究对象，瞄准国际前沿，重点阐述了细菌致病性及耐药性机理，以及细胞内活性氧的感应及应答机制。与经典遗传学不同，该项目利用近年发展起来的高通量测序技术（ChIP-seq和RNA-seq），结合化学生物学、反向遗传学、分子生物学、功能基因组学等多种技术，系统地研究了病原菌中最重要的信号传递途径的具体调控机制。研究成果发表在生物学领域的顶级期刊，如Nucleic Acids Research（影响因子10.2）， PLoS Biology（影响因子9.8）， J Am Chem Soc（影响因子13.0）， 和Proc Natl Acad Sci USA（影响因子9.7）。这说明本项目的研究成果在这一领域的创新性、前沿性和重要性。

1. 扩充了群体感应系统的调节机制并得到了国内外著名学者的引用。

发现YebC、QteE、RsaL, CdpR, VqsR和VqsM等蛋白与*las*、*rhl*和*pqs*系统的关系，并确认它们为群体感应系统的上游调控基因。这些研究发现进一步扩充了对群体感用系统认识，从而为阐明铜绿假单胞菌致病性机制及关键靶位点、为合理设计抗致病力药物提供有力的理论支持。美国科学院院士E. Peter Greenberg教授，是群体感应系统研究的奠基人之一，在其文章（An evolving perspective on the

Pseudomonas aeruginosa orphan quorum sensing regulator QscR. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, 10(4):152)中引用我们的文章(Haihua Liang, et al., 2012), 表述基于我们对VqsR与qscR关系的研究, 未来的研究可以集中在寻找更多的*qscR*调节子, 并拓宽对群体感应系统的认识。耶鲁大学著名病原微生物学专家Eduardo A. Groisman 在其文章(Sequestration from Protease Adaptor Confers Differential Stability to Protease Substrate. *Molecular Cell*, 2017, 2(66): 234-246.e5)中, 引用我们的文章(Jingru Zhao, et al., 2016), 并评价了我们关于ClpS促使ClpAP降解底物具有潜在的新机制的成果。上海交通大学何亚文教授团队也在其文章(Characterization of the multiple molecular mechanisms underlying RsaL control of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in the rhizosphere bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201, *Molecular Microbiology* 2017, 104(6), 931-947)中也引用了CdpR(zhao et al., 2016)对群体感应系统的调节作用。

2. 发现了细菌急慢性感染转化过程中的潜在关键因子, 并可作为颇具前景的新药靶点, 相应成果已被引用33次。发现一个感应激酶-反应调节子复合体PA1611, 可同时显著影响T3SS型分泌系统和生物被膜的形成, 表明它是急慢性感染转化过程中的潜在关键调节子。该研究成果进一步明确了铜绿假单胞菌的急慢性感染转换过程的作用机制。瑞士巴塞尔大学的微生物学家Urs Jenal在其文章(LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Microbiology*. 2016, 2, 16184)和华盛顿大学 Mougous, Joseph D教授在其文章(Bacterial danger sensing *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427 (23, 3744-3755)都肯定了PA1611的作用。

3. 从中草药中分离到抗致病力的有效活性成分。中草药是我国丰富的医用化合物的宝藏, 且由于中药的特殊性, 细菌较少对中药产生耐药性。基于铜绿假单胞菌致病及耐药分子机制, 对中药的活性成分及作用机制进行了深入研究, 获得了若干作用机制明确的具抗致病力的中药活性成分。研究发现约60%的中药材如黄芩、艾叶等提取物含有效抗致病成分, 在完成具有抗致病性中药及其功能有效成份筛选的同时, 并完成中药中抗致病有效成分如黄芩中抗致病物质黄芩苷的抗致病机制及作用靶点的确定。这将为控制细菌感染

并寻找新型抗感染药物和抗感染中药制剂带来新的思路。

4. 构建了一套用于铜绿假单胞菌基因表达测定的体系以及3万多个突变体组成的突变库。我们已经构建了一套以荧光素酶基因操纵子（luxCDABE）为报道基因的全基因组启动子库，用于研究铜绿假单胞菌基因表达水平的测定。这套系统不仅可代替基因微阵列（Microarray）基因表达研究系统，而且显示比许多微阵列更优越的特性，具有高通量、灵敏度高、好的时间分辨率、价格低廉。

以上研究成果对于建立病原菌群体感应系统和致病因子的多层次调控网络具有重要意义并为新抗致病力药物的开发提供必要的理论基础。