

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.05.021

· 综述 ·

D-氨基酸调节细菌生物被膜解离的研究进展

Advances in D-amino acids in regulating bacterial biofilm dispersal

王琴琴(WANG Qin-qin) 周燕斌(ZHOU Yan-bin)

(中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080)

(First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[关键词] D-氨基酸; 细菌; 生物被膜; 氨基酸消旋酶

[中图分类号] R378 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2015)05-0357-04

自然环境和医疗设备中普遍存在细菌生物被膜, 往往引起难见治疗成效的慢性感染, 探索和开发新的药物以防止细菌生物被膜的形成和/或破坏已形成的生物被膜引起了研究人员极大兴趣。本文就细菌 D-氨基酸的生成及其在调节生物被膜解离过程中的作用进行综述。

一直以来, 人们认为在生命物质中只存在 L-氨基酸, 随着分析方法的发展, 相继在海洋动物、陆生动物、脊椎和无脊椎动物、藻类、种子植物, 以及人体内发现了各种 D-氨基酸, 除甘氨酸外, 其他均有互称镜像的对映体 L 型和 D 型, 并且逐渐认识到 D-氨基酸在调节生物体生命活动中充当着重要角色^[1]。

细菌生物被膜是指细菌附着于惰性或者活性实体的表面, 繁殖、分化并分泌一些多糖基质, 将菌体群落包裹其中而形成的细菌聚集体膜状物^[2]。细菌稳定期产生的 D-氨基酸不仅影响生物被膜形成, 也会导致生物被膜解离。本文将阐述细菌 D-氨基酸的生成及其在调节细菌生物被膜解离中的作用。

1 细菌 D-氨基酸的生成

细菌中的 D-氨基酸主要由氨基酸消旋酶催化 L-氨基酸生成^[3]。氨基酸消旋酶有两大类, 一类是以磷酸吡哆醛(pyridoxal-5-phosphate, PLP)为辅酶的消旋酶, 如丙氨酸消旋酶和丝氨酸消旋酶等; 另一

类消旋酶则不依赖于 PLP, 这类酶主要包括谷氨酸消旋酶、天冬氨酸消旋酶和脯氨酸消旋酶等。下面详细介绍这两大类消旋酶是如何催化 D-氨基酸的生成。

1.1 依赖于 PLP 的消旋酶

1.1.1 丙氨酸消旋酶 丙氨酸消旋酶依赖于 PLP 在丙氨酸的 α -位点上脱氢, 然后在 α -位点的反侧加氢生成 L-丙氨酸的对映体^[4]。大多数细菌可编码 2 种不同的丙氨酸消旋酶, 分别被命名为 DadB 和 Alr, 两者的反应机制相同, 但参与的代谢途径不同。DadB 参与 L-氨基酸的分解代谢, 生成的 D-丙氨酸通过 D-丙氨酸脱氢酶形成丙酮酸。而 Alr 生成的 D-丙氨酸则参与合成肽聚糖(peptidoglycan, PG)的胞壁肽前体^[5-6]。

1.1.2 丝氨酸消旋酶 细菌丝氨酸消旋酶是丙氨酸消旋酶的同系物^[7-8]。丝氨酸消旋酶 VanT 催化 L-丝氨酸产生 D-丝氨酸, 丝氨酸消旋酶 VanT 像丙氨酸消旋酶一样, 也需要 PLP 作为辅酶, 并且可能使用第二种反应机制催化反应。第 1 种反应机制为通过丝氨酸消旋酶的单个赖氨酸残基催化完成 L-丝氨酸 α -位加氢与脱氢, 从而生成 D-丝氨酸; 第 2 种反应机制则是由丝氨酸消旋酶的两个不同的催化残基, 即酪氨酸和赖氨酸残基完成 L-丝氨酸 α -位加氢与脱氢, 从而催化生成 D-丝氨酸。丝氨酸消旋酶 VanT 和丙氨酸消旋酶的相似性表明, 这两种酶可能有着相同的进化史^[9]。

[收稿日期] 2014-12-12

[基金项目] 广东省自然科学基金(2014A030313052); 广州市科技计划(2014J4100132)

[作者简介] 王琴琴(1984-), 女(汉族), 江西省乐平市人, 博士研究生, 主要从事呼吸病发病机制与治疗研究。

[通信作者] 周燕斌 E-mail: sysuzyb@aliyun.com

1.2 不依赖于 PLP 的消旋酶

1.2.1 谷氨酸消旋酶 与 D-丙氨酸一样, D-谷氨酸也是细菌细胞壁 PG 的组成成分, 但是这种 D-氨基酸是由一种不依赖于 PLP 的谷氨酸消旋酶催化生成。谷氨酸消旋酶的反应机制与丙氨酸消旋酶类似, 也是由 2 个催化残基来完成, 即由 2 个半胱氨酸残基参与催化反应^[10-12]。

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)编码 2 种分别命名为 Glr 和 YrpC 的谷氨酸消旋酶, 两者具有相似的生化性能。不同之处在于 Glr 消旋酶生成的 D-谷氨酸主要参与合成聚- γ -D-谷氨酸, 它是孢子包膜的结构成分之一; 而 YrpC 消旋酶产生的 D-谷氨酸则构成细胞壁 PG^[13-14]。

1.2.2 天冬氨酸消旋酶和脯氨酸消旋酶 天冬氨酸消旋酶催化 L-天冬氨酸生成的 D-天冬氨酸是某些细菌细胞壁 PG 的组成成分。天冬氨酸消旋酶存在于各种革兰阳性菌中, 例如乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)^[15]、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)^[16]、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermenti*)^[17]、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)^[18], 以及一些古细菌^[19]。和谷氨酸消旋酶一样, 天门冬氨酸消旋酶也包含 1 个必需的半胱氨酸残基, 在催化反应中不需要辅助因子, 通过 2 个不同的催化残基反应机制来完成底物氨基酸 α -位点的脱氢与加氢反应^[20]。

脯氨酸消旋酶也是一种不依赖于 PLP 的消旋酶。在艰难梭菌(*Clostridium difficile*)和斯蒂克兰德梭状芽胞杆菌(*Clostridium sticklandii*)中已鉴定出此酶, 但是目前尚不清楚 D-脯氨酸是否为这些微生物细胞壁 PG 的组成成分, 推测其存在可能有利于病原体逃逸宿主的免疫系统^[21]。

2 D-氨基酸在调控细菌生物被膜解离中的作用

在自然环境和医疗设备中细菌生物被膜普遍存在。细菌生物被膜附着于医疗设备, 如血管内置导管, 导致已发生的感染难以根除。因为生物被膜中细胞外基质保护相关的细菌, 耐受抗菌药物, 逃避宿主的免疫系统。因此, 探索新的药物防治细菌生物被膜的形成和/或破坏已形成的生物被膜成为研究新方向^[22-28], 而 D-氨基酸在众多的研究中崭露头角。

2.1 D-氨基酸在调控革兰阴性菌生物被膜解离中的作用 枯草芽胞杆菌在静置培养的液体培养基表面或半固体琼脂平板上可形成肉眼可见的生物被

膜。液体培养基表面的生物被膜静置培养大约 6~8 d 后开始解离, Kolodkin-Gal 等^[29]发现这种现象是由生物被膜中的枯草芽胞杆菌产生的 D-亮氨酸、D-甲硫氨酸、D-色氨酸和 D-酪氨酸的混合物所引起的; 而且, 培养基中添加外源性的 D-氨基酸可以预防静置培养的枯草芽胞杆菌形成生物被膜。D-氨基酸的积累仅限于成熟生物被膜, 并且部分 D-氨基酸是由消旋酶 YlmE 和 RacX 产生的。另外, 以上 4 种 D-氨基酸中, D-酪氨酸作用最强, 其最低抑菌浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$, 但 4 种 D-氨基酸的混合物作用更有效, 其最低抑菌浓度约为 10 nmol/L^[29]。与此相反, 相对应的 L-氨基酸混合物既不能抑制生物被膜的形成, 也不能破坏已经形成的生物被膜^[29]。此外, 单独的 D-酪氨酸及上述 4 种 D-氨基酸混合物均能有效抑制铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)生物被膜形成^[29]。

2.2 D-氨基酸在调控革兰阳性菌生物被膜解离中的作用 Hochbaum AI 等^[30]发现, D-氨基酸能有效抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)生物被膜的形成, 并且破坏成熟的生物被膜。采用荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观察到 D-氨基酸通过破坏细胞表面蛋白的定位, 从而抑制金黄色葡萄球菌生物被膜形成, 对胞外多糖的生成影响不大, 与其在枯草芽胞杆菌中的作用机制相似。另外, 将环氧树脂材料在 1 mmol/L 的 D-酪氨酸、D-苯丙氨酸和 D-脯氨酸的混合物中浸泡过夜, 可以得到与培养基中 D-氨基酸相同的防止生物被膜形成的效果^[30]。此外, 研究^[31-32]表明, D-氨基酸还能抑制表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)和变形链球菌(*Streptococcus mutans*)生物被膜形成。

2.3 D-氨基酸在调控细菌生物被膜解离中的作用机制探讨 不同种类的 D-氨基酸对不同细菌生物被膜的作用存在差异。在枯草芽胞杆菌中, 仅 D-亮氨酸、D-甲硫氨酸、D-色氨酸和 D-酪氨酸能有效抑制生物被膜的形成, 而其他 D-氨基酸, 如 D-苯丙氨酸则无这种作用; 然而, 在金黄色葡萄球菌中, 除 D-亮氨酸、D-色氨酸和 D-酪氨酸外, D-苯丙氨酸和 D-脯氨酸也能有效抑制生物被膜的形成。另外, D-酪氨酸、D-苯丙氨酸和 D-脯氨酸的混合物比 D-亮氨酸、D-甲硫氨酸、D-色氨酸和 D-酪氨酸混合物抑制细菌生物被膜形成的能力更强。这些差异显示, 革兰阴性菌和革兰阳性菌(如金黄色葡萄球菌)中, D-氨基酸掺入细胞壁的机制可能有所不同^[33]。然而, D-氨基酸在调控细菌生物被膜解离中的作用机制

尚不清楚。

Kolodkin-Gal 等^[29]认为,D-氨基酸可诱导生物被膜内连接枯草芽胞杆菌细胞基质相关的淀粉样蛋白纤维解离,这些纤维可能有助于维持生物被膜。*yqxA*操纵子突变体可以在 D-氨基酸存在的情况下形成生物被膜,*yqxA*基因产物淀粉样蛋白纤维附着于细胞是必需的^[34]。然而,D-氨基酸破坏淀粉样蛋白网络连接,从而促进生物被膜解离可能不是唯一的作用机制,因为 D-氨基酸也可以导致其他种类细菌,如铜绿假单胞菌的生物被膜解离^[29],这些细菌是否产生生物被膜基质相关的淀粉样蛋白纤维有待进一步的研究。

此外,Leiman 等^[35]则认为,D-氨基酸可能很大程度上是通过干扰蛋白合成,从而抑制枯草芽胞杆菌生物被膜形成。常规用于生物被膜研究的枯草芽胞杆菌存在着 *dta* 基因突变。该基因主要编码 D-酪氨酰-tRNA 脱酰酶,而该酶可以阻止 D-氨基酸参加蛋白质的合成。人工修复 *dta* 基因后,枯草芽胞杆菌可以有效地抵消 D-氨基酸对生物被膜的抑制作用。

另一项研究^[36]从热力学的角度阐述 D-氨基酸抑制细菌生物被膜形成的可能机制。胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)作为细胞和集电极之间的桥梁,通过氢键的形成,克服能量位垒从而导致细菌不可逆地黏附于物体表面。然而,外源性的 D-酪氨酸可以通过减少 EPS 的生成,从而减少氢键的数量及降低黏附力,抑制大肠埃希菌的黏附^[36]。

无论 D-氨基酸促进生物被膜解离及抑制生物被膜形成的机制如何,由于 D-氨基酸可能具有良好的药代动力学性质和缺乏显著毒性等优点,D-氨基酸用于防治细菌生物被膜相关感染有非常重要的潜在价值^[32]。

3 展望

总之,D-氨基酸在细菌生物学中所扮演的角色需要进一步剖析,阐明 D-氨基酸调控细胞壁重塑和生物被膜解离的作用机制至关重要。基于上述研究,D-氨基酸用于解决环境和临床细菌生物被膜感染问题有非常好的前景。

[参考文献]

[1] Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacol-

ogy of D-amino acids [J]. Chem Biodivers, 2010, 7(6): 1491 - 1530.

- [2] Spormann AM. Physiology of microbes in biofilms. In: Romeo T, ed. Bacterial biofilms [M]. Springer, Verlag Berlin Heidelberg; Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 322: 17 - 36.
- [3] Tanner ME. Understanding nature's strategies for enzyme-catalyzed racemization and epimerization [J]. Acc Chem Res, 2002, 35(4): 237 - 246.
- [4] Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations [J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73(1): 383 - 415.
- [5] Watanabe A, Yoshimura T, Mikami B, et al. Reaction mechanism of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: x-ray crystallographic studies of the enzyme bound with N-(5'-phosphopyridoxyl)-alanine [J]. J Biol Chem, 2002, 277(21): 19166 - 19172.
- [6] Walsh CT. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly [J]. J Biol Chem, 1989, 264(5): 2393 - 2396.
- [7] Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin resistance in *Enterococci* due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 21 - 25.
- [8] De Jonge BL, Gage D, Xu N. The carboxyl terminus of peptidoglycan stem peptides is a determinant for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(10): 3151 - 3155.
- [9] Arias CA, Martin-Martinez M, Blundell TL, et al. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174 [J]. Mol Microbiol, 1999, 31(6): 1653 - 1664.
- [10] Choi SY, Esaki N, Yoshimura T, et al. Reaction mechanism of glutamate racemase, a pyridoxal phosphate-independent amino acid racemase [J]. J Biochem, 1992, 112(1): 139 - 142.
- [11] Tanner ME, Gallo KA, Knowles JR. Isotope effects and the identification of catalytic residues in the reaction catalyzed by glutamate racemase [J]. Biochemistry, 1993, 32(15): 3998 - 4006.
- [12] Hwang KY, Cho CS, Kim SS, et al. Structure and mechanism of glutamate racemase from *Aquifex pyrophilus* [J]. Nat Struct Biol, 1999, 6(5): 422 - 426.
- [13] Kada S, Nanamiya H, Kawamura F, et al. Glr, a glutamate racemase, supplies D-glutamate to both peptidoglycan synthesis and poly-gamma-glutamate production in gamma-PGA-producing *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 236(1): 13 - 20.
- [14] Ashiuchi M, Soda K, Misono H. Characterization of yrpC gene product of *Bacillus subtilis* IFO 3336 as glutamate racemase isozyme [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(5): 792 - 798.

- [15] Veiga P, Piquet S, Maisons A, et al. Identification of an essential gene responsible for D-Asp incorporation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan crossbridge [J]. Mol Microbiol, 2006, 62(6): 1713 - 1724.
- [16] Bellais S, Arthur M, Dubost L, et al. Aslfm, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium* [J]. J Biol Chem, 2006, 281(17): 11586 - 11594.
- [17] Wallinder IB, Neujahr HY. Cell wall and peptidoglycan from *Lactobacillus fermenti* [J]. J Bacteriol, 1971, 105(3): 918 - 926.
- [18] Staudenbauer W, Willoughby E, Strominger JL. Further studies of the D-aspartic acid-activating enzyme of *Streptococcus faecalis* and its attachment to the membrane [J]. J Biol Chem, 1972, 247(17): 5289 - 5296.
- [19] Matsumoto M, Homma H, Long Z, et al. Occurrence of free D-amino acids and aspartate racemases in *Hyperthermophilic archaea* [J]. J Bacteriol, 1999, 181(20): 6560 - 6563.
- [20] Yamauchi T, Choi SY, Okada H, et al. Properties of aspartate racemase, a pyridoxal 5'-phosphate-independent amino acid racemase [J]. J Biol Chem, 1992, 267(26): 18361 - 18364.
- [21] Goytia M, Chamond N, Cosson A, et al. Molecular and structural discrimination of proline racemase and hydroxyproline-2-epimerase from nosocomial and bacterial pathogens [J]. PLoS One, 2007, 2(9): e885.
- [22] Liu YC, Post JC. Biofilms in pediatric respiratory and related infections [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2009, 9(6): 449 - 455.
- [23] Kassir R, Hachem R, Jiang Y, et al. Management of *Bacillus* bacteremia: the need for catheter removal [J]. Medicine (Baltimore), 2009, 88(5): 279 - 283.
- [24] Homoe P, Bjarnsholt T, Wessman M, et al. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2009, 266(10): 1533 - 1538.
- [25] Reslinski A, Mikucka A, Szymkowski J, et al. In vivo biofilm on the surface of a surgical mesh implant [J]. Pol J Microbiol, 2009, 58(4): 367 - 369.
- [26] Yankah AC, Pasic M, Kloese H, et al. Homograft reconstruction of the aortic root for endocarditis with peri-annular abscess: a 17-year study [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2005, 28(1): 69 - 75.
- [27] Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(1): 26 - 59.
- [28] Kobayashi H. Airway biofilms: implications for pathogenesis and therapy of respiratory tract infections [J]. Treat Respir Med, 2005, 4(4): 241 - 253.
- [29] Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, et al. D-amino acids trigger biofilm disassembly [J]. Science, 2010, 328(5978): 627 - 629.
- [30] Hochbaum AI, Kolodkin-Gal I, Foulston L, et al. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development [J]. J Bacteriol, 2011, 193(20): 5616 - 5622.
- [31] Ramón-Peréz ML, Diaz-Cedillo F, Ibarra JA, et al. D-amino acids inhibit biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* strains from ocular infections [J]. J Med Microbiol, 2014, 63(Pt 10): 1369 - 1376.
- [32] Tong Z, Zhang L, Ling J, et al. An in vitro study on the effect of free amino acids alone or in combination with nisin on biofilms as well as on planktonic bacteria of *Streptococcus mutants* [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99513.
- [33] Cava F, Lam H, de Pedro MA, et al. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(5): 817 - 831.
- [34] Branda SS, Chu F, Kearns DB, et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix [J]. Mol Microbiol, 2006, 59(4): 1229 - 1238.
- [35] Leiman SA, May JM, Lebar MD, et al. D-amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis [J]. J Bacteriol, 2013, 195(23): 5391 - 5395.
- [36] Xing SF, Sun XF, Taylor AA, et al. D-Amino acids inhibit initial bacterial adhesion: thermodynamic evidence [J]. Biotechnol Bioeng, 2015, 112(4): 696 - 704.

(本文编辑:熊辛睿)