抗肠道致病菌化合物的筛选及抗菌作用机制研究

陈 凤[1,2#], 陈玉平[2#], 白学鑫[2], 盛春泉[1,2*], 武善超[2*]

(1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 中国人民解放军海军军医大学药学院, 教育部医药基础研究创新中心, 上海 200433)

摘要: 结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 严重威胁人类生命健康, 肠道致病菌具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, Fn) 和产肠毒素脆弱拟杆菌 (enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF) 与CRC的发生和发展紧密相关, 开发针对Fn和ETBF的新型化合物对于治疗CRC具有重要临床意义。本研究采用微量肉汤稀释法对市售化合物库中的3 400个化合物对两种菌进行体外抑菌活性筛选, 以MIC_{50} ≤ 64 μg·mL^{-1}为标准, 发现了52个抗Fn活性化合物, 44个抗ETBF活性化合物, 尤其是化合物**G7**对两种菌具有最好的抑制活性 (Fn, MIC_{50} = 1 μg·mL^{-1}; ETBF, MIC_{50} = 4 μg·mL^{-1}), 并能通过抑菌进而有效抑制结肠癌细胞迁移; 初步作用机制研究发现, **G7**通过抑制生物膜的形成, 同时其抑菌作用与多个与黏附和菌丝形成的基因密切相关。

关键词: 肠道致病菌; 具核梭杆菌; 产肠毒素脆弱拟杆菌; 表型筛选; 作用机制

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1807-09

Screening of compounds against intestinal pathogenic bacteria and exploration of their mechanisms of action

CHEN Feng[1,2#], CHEN Yu-ping[2#], BAI Xue-xin[2], SHENG Chun-quan[1,2*], WU Shan-chao[2*]

(*1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China; 2. The Center for Basic Research and Innovation of Medicine and Pharmacy MOE, School of Pharmacy, Second Military Medical University Naval Medical University, Shanghai 200433, China*)

Abstract: Colorectal cancer (CRC) poses a serious threat to human life and health. The intestinal pathogenic bacteria *Fusobacterium nucleatum* (Fn) and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF) are closely associated with the occurrence and progression of CRC. The development of novel compounds targeting Fn and ETBF holds significant clinical importance for the treatment of CRC. In this study, broth microdilution method was employed to screen 3 400 compounds in a compound library for *in vitro* antibacterial activity against the two bacteria. Using a criterion of MIC_{50} ≤ 64 μg·mL^{-1}, 52 compounds with anti-Fn activity and 44 compounds with anti-ETBF activity were identified. Among them, compound **G7** exhibited the best inhibitory activity against both two bacteria (Fn, MIC_{50} = 1 μg·mL^{-1}; ETBF, MIC_{50} = 4 μg·mL^{-1}) and could effectively inhibit the migration of colorectal cancer cells by inhibiting bacteria. Preliminary mechanistic studies revealed that **G7** exerts its antibacterial effects by inhibiting biofilm formation and the expression of multiple genes related to adhesion and hyphal formation.

Key words: intestinal pathogenic bacteria; *Fusobacterium nucleatum*; enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*; phenotypic screening; mechanism of action

收稿日期: 2025-03-10; 修回日期: 2025-04-11.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22377145); 国家重点研发 (2020YFA0509200); 上海市青年科技启明星计划 (22QA1411300).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-21-81871201, E-mail: shengcq@smmu.edu.cn;

Tel: 86-21-81871242, E-mail: wushanchao07_2@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0258

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 严重威胁人类生命健康, 新发病例数不断攀升, 且逐渐呈现年轻化趋势, 是当前第四大致命癌症。据统计, 全球每年约有90万患者死于结直肠癌。2020年, 我国结直肠癌新发病例数约为56万, 约占全球新发病例数的1/3, 死亡病例数约为29万, 发病率和死亡率在全部恶性肿瘤中分别位居第二位和第五位, 其中, 进展期结直肠癌患者的5年生存率不足50%[1], 严重威胁我国人民生命健康, 给国民经济和社会发展带来了沉重负担。

诱发结直肠癌的因素有很多, 主要包括遗传因素和环境因素等。作为环境因素中的重要组成部分, 肠道菌群在塑造炎症环境和促进肿瘤生长及扩散方面发挥着重要作用[2,3]。与健康人群的肠道菌群丰度相比, 结直肠癌患者的肠道致病菌群丰度显著升高[4-6], 它们不仅在结直肠癌的发生、发展、转移、复发和耐药中发挥着重要作用, 而且还严重影响患者预后, 缩短生存期等[7-9]。因此, 越来越多的证据提示, 肠道致病菌可以作为生物标志物和干预对象, 用于结直肠癌治疗[10]。

具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, Fn) 作为一种厌氧机会致病性的革兰阴性杆菌, 常见于口腔与肠道等部位[11]。产肠毒素脆弱拟杆菌 (enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF) 作为脆弱拟杆菌的一种, 具有合成和分泌脆弱拟杆菌毒素 (*B. fragilis* toxin, BFT) 的能力, 这种细菌在人体内的存在位置主要集中在肠道, 尤其是结肠中[12,13]。研究表明, Fn或ETBF与CRC的发生和发展紧密相关[14]。因此, 开发针对Fn和ETBF的新型化合物, 以阻断其在CRC中的致病作用, 具有重要的临床意义和应用前景。目前, 虽然已有一些针对Fn和ETBF的治疗方法, 如抗生素治疗等, 但这些方法往往存在不良反应大、易产生耐药性等问题[15,16]。首选治疗肠道致病菌药物甲硝唑 (metronidazole, MDZ), 不仅存在神经毒性和妊娠禁忌, 而且也出现耐药性对肠道致病[16]。因此, 研发新型高效低毒的抗Fn化合物, 成为CRC治疗领域待解决的关键问题之一[15,16]。

表型筛选在药物研发领域内扮演着举足轻重的角色, 相较于传统基于靶点的药物设计, 表型筛选通过直接衡量化合物在细胞层面的活性表现, 能够高效地识别出活性化合物, 进而发掘出具有潜力的苗头化合物与先导化合物。这一技术路径已经成为探寻新型抗感染及抗肿瘤小分子药物不可或缺的有效手段[17,18]。鉴于Fn和ETBF与小分子晶体复合物尚未报道, 基于结构的合理药物设计尚不可行。尽管已有报道证实了黏附素/侵袭素 (*Fusobacterium* adhesin A, FadA)、宿主内皮细胞的钙黏蛋白VE-cadherin、上皮细胞及结直肠癌细胞的钙黏蛋白E-cadherin等与具核梭杆菌致病性密切相关[19], 但是, 通过晶体结构分析发现, FadA是通过两个方向平行螺旋的8个氨基酸“发卡环”连接成的二聚体, 缺乏小分子药物结合位点[20]; 而VE-cadherin是一个含785个氨基酸的大型蛋白聚集体, E-cadherin是含543个氨基酸的蛋白聚集体, 也没有蛋白与小分子药物复合物晶体结构和活性测试方法[21], 并且这两个蛋白都还是宿主正常功能蛋白, 应尽量避免基于这些宿主蛋白开展药物设计, 避免未知风险。BFT是一种锌依赖性金属蛋白酶, 与各种肠道疾病密切相关, 其分子结构复杂, 可能包含多个活性位点和结构域[22]。这种复杂的分子结构可能使得BFT与小分子蛋白的结合变得困难, 因为小分子蛋白可能无法与BFT的所有活性位点和结构域都形成稳定的相互作用。BFT分子的表面电荷和疏水性可能不利于与小分子蛋白的结合。因此, 本研究设想通过表型筛选商业化合物库发现抗两种肠道致病菌的化合物以期为研发抗肠道致病菌药物提供先导结构, 为结直肠癌的治疗提供新策略。

基于此, 本研究采用了《厌氧菌药物敏感性试验方法》(第七版) 中规定的微量肉汤稀释法, 对市售化合物库中的3 400个化合物进行了体外抗肠道致病菌抑制活性筛选, 以MIC_{50}值小于64 μg·mL^{-1}作为有抗菌活性的入选标准, 共发现了52个抗Fn活性化合物、44个抗ETBF活性化合物, 其中, 有一个化合物**G7** (图1) 对Fn和ETBF具有活性最好的生长抑制活性, MIC_{50}分别为1和4 μg·mL^{-1}, 其对两种菌具有抑制作用尚未见报道, 同时, 在肠菌与CRC细胞共孵育情况下, 该化合物能够有效抑制结肠癌细胞迁移。本研究又进一步通过对生物膜形成抑制实验、实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)、扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 和透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 细胞形态学和相关基因表达情况, 初步探讨了**G7**抗两种肠道致病菌的作用机制。

材料与方法

实验菌株、细胞 具核梭杆菌 (ATCC 23726)、产肠毒素脆弱拟杆菌 (ATCC 43860) (上海市肿瘤研究所); 培养人CRC细胞系HCT116 (上海中国科学院细胞中心)。

试剂材料 化合物 (LF9000-Cysteine Focused Covalent Inhibitor Library, 上海陶素生物科技有限公司); 蛋白胨、酵母浸膏、营养肉汤等培养液 (美国BD公司); 糖类、抗菌药物、缓冲液、培养基等其他基础试剂 (上海生工生物科技有限公司); 脱纤维马血和结晶紫 (上海碧云天生物技术有限公司); 引物 [生工生物工程

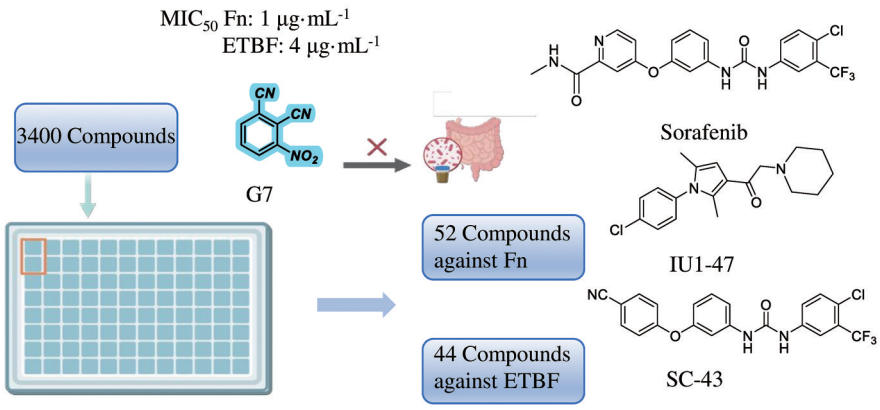


Figure 1　Workflow and filter of the drug screening. Fn: *Fusobacterium nucleatum*; ETBF: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*

(上海) 股份有限公司]; 真菌/细菌微量RNA提取试剂盒 (TR214, 简石生物技术有限公司); 乙酸 (011010788, 上海泰坦科技股份有限公司)。

实验仪器　生物安全柜 (BSC-1004IIA2, 苏州安泰空气技术有限公司); 倒置荧光显微镜 (TS2 FL, 尼康株式会社); 多功能微孔板读板机 (SpectraMax® iD3; 美谷分子仪器公司); 实时定量热循环仪 (FTC-3000, 加拿大Funglyn Biotech Inc公司)。

菌株活化　从−80 ℃的冰箱取出装有Fn和ETBF的冻存管, 吸出1 mL冻存液至6 mL脑心浸液肉汤 (brain heart infusion broth, BHI), 在无氧条件下培育24 h后, 混匀, 吸取1 mL再次放入7 mL BHI中, 继续在无氧条件下培育24 h, 使菌达到指数生长期便可用于后续实验。

MIC_{50}测定　菌株活化, 待菌达到指数生长期后, 将离心管放入离心机中, 8 000 r·min^{-1}旋转7 min, 弃上清, 加入1 mL布氏肉汤混匀。标准比浊管定标后, 将玻璃试管放入比浊仪, 加入4 mL布氏肉汤, 用棉签刮取生长良好的菌, 在玻璃试管内摩擦至0.5麦氏浊度 (菌的浓度为1×10^8 CFU·mL^{-1})。加入4 mL浓度为0.5麦氏浊度的菌液到装有36 mL布氏肉汤的试管内, 最后加入4.4 mL脱纤维马血, 涡旋振荡器混匀 (菌液∶肉汤∶马血 = 1∶9∶1.1) 即为实验用菌悬液。配制好的菌悬液加入96孔细胞培养板中, 每孔加入100 μL, 化合物从64 μg·mL^{-1}开始依次倍半稀释, 使其终质量浓度为64～0.125 μg·mL^{-1}。将96孔细胞培养板置于厌氧箱中并放入37 ℃恒温培养箱中静置培养48 h, 培养完成后使用酶标仪测定每孔细菌在630 nm处的吸光度 (OD_{630}) 值, 平行测定3次。取抑制率 ≥ 50%时所对应的浓度即为该化合物MIC_{50}。最后一列仅含有布氏肉汤, 倒数第二列仅含有实验用菌悬液, 分别作为阴性对照和背景对照。

生长曲线实验　菌株活化, 待菌达到指数生长期后, 然后振荡标准比浊管, 定标后, 将玻璃试管放入比浊仪, 加入4 mL BHI, 用棉签刮取生长良好的菌, 在玻璃试管内摩擦至0.5麦氏浊度。将配好的菌液用BHI稀释至浓度为1×10^6 CFU·mL^{-1}的菌液, 涡旋振荡器混匀。加药: 取6个15 mL离心管, 分别加入7 mL浓度为1×10^6 CFU·mL^{-1}的菌液, 使每个离心管中Fn和ETBF药物质量浓度分别为1、0.5、0.25、0.125、0.062 5 μg·mL^{-1}和4、2、1、0.5、0.25 μg·mL^{-1}。将离心管放入厌氧罐中, 在无氧条件下, 37 ℃孵育, 并于加药后0、4、8、12、24、48 h时每个离心管吸出100 μL混匀的菌液置于96孔板, 3个复孔, 用多功能微孔板读板机测OD_{630}值并记录。

细胞迁移 (Transwell) 实验　使用24孔板将HCT116以每孔3×10^{4}个的密度培养在含5% FBS的DMEM培养基中。Fn菌悬液的配置: 振荡标准比浊管, 定标后, 将玻璃试管放入比浊仪, 加入4 mL含5% FBS的DMEM培养基, 用棉签刮取生长良好的菌, 在玻璃试管内摩擦至0.5麦氏浊度。将配好的初始菌液用含5% FBS的DMEM培养基稀释10倍, 使菌的浓度为1×10^7 CFU·mL^{-1}。将配置好的菌悬液放于24孔Transwell系统的下室, 每孔600 μL, 同时设置每孔药物质量浓度分别为4、2、1、0.5和0 μg·mL^{-1}。将每孔100 μL HCT116细胞混悬液培养于24孔Transwell系统的上室中。48 h后吸出培养基, PBS清洗, 4%多聚甲醛固定15 min, 0.1%结晶紫染色5 min, 用棉签擦干后, 用光学显微镜观察 (200×)。

生物膜抑制实验　菌株活化, 待菌达到指数生长期后, 将离心管放入离心机中, 8 000 r·min^{-1}旋转7 min, 弃上清, 加入1 mL BHI混匀。标准比浊管定标后, 将玻璃试管放入比浊仪, 加入4 mL BHI, 用棉签刮取生长良好的菌, 在玻璃试管内摩擦至0.5麦氏浊度 (菌的浓度为1×10^8 CFU·mL^{-1}) 即为实验用菌悬液。将配置好的菌

悬液放入96孔板中, 每孔100 μL, 针对Fn和ETBF处理组, 分别加入不同质量浓度 (4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg·mL^{-1}) 和 (16、8、4、2、1、0.5 μg·mL^{-1}) 的化合物G7。在37 ℃厌氧条件下孵育48 h, 每孔用无菌PBS洗涤3次去除未贴壁的Fn, 然后用多聚甲醛固定15 min。PBS每孔冲洗2次, 用0.1%结晶紫溶液染色5 min后, 加入33%乙酸 (100 μL) 溶解生物膜, 37 ℃孵育15 min后, 转移至新的96孔板, 最后, 用酶标仪测量570 nm处的OD值, 定量生物膜的生物量。

SEM及TEM实验 菌株活化及菌液的配置同生长曲线实验。将离心管放入厌氧罐中, 在无氧条件下, 将15 mL离心管加入7 mL浓度为1×10^6 CFU·mL^{-1}的菌液并加入3.5 μL **G7** (2 mg·mL^{-1}) 于37 ℃孵育48 h。孵育结束后, 将离心管置于离心机中, 8 000 r·min^{-1}离心8 min, 弃上清, 用无菌的PBS轻轻清洗2次后, 弃PBS, 用电镜固定液将菌吹均匀, 悬浮于固定液中, 室温下固定2 h, 再离心取沉淀交由上海圆创生物科技有限公司拍摄。

RT-qPCR 参照TR214真菌/细菌RNA提取试剂盒使用说明进行总RNA的提取。逆转录方案为37 ℃反转录反应15 min, 85 ℃酶失活反应5 s, 4 ℃保持; qPCR方案为95 ℃下启动10 min, 95 ℃、30 s变性, 60 ℃、30 s退火, 72 ℃下延伸30 s, 进行40个循环。逆转录体系为加入4 μL逆转录预混液, 总体积为20 μL, RNA根据计算使其终浓度为1 μg·μL^{-1}, 再加入DEPC。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 体系如表1。内参基因为16S rRNA, 目的基因如表2所示。基因表达量差异计算方法为$2^{-\Delta\Delta Ct}$法, $2^{-\Delta\Delta Ct}$即为待测基因在**G7**加药处理组菌株的表达量相较于无药对照组菌株的比值, 引物序列见表2。

统计学分析 每组数据均进行3次独立重复实验, 实验数据以均值±标准差表示, 采用GraphPad Prism进行绘图和统计分析。采用单因素方差分析one-way ANOVA评价组间差异。$P < 0.05$表示差异有统计学意义。

Table 1 PCR system

Reagent	Volume/L	Concentration
TB Green Premix Ex Tag II	4×10^{-6}	1×
PCR Forward Primer (10 μmol·L^{-1})	0.8×10^{-6}	0.4 μmol·L^{-1}
PCR Reverse Primer (10 μmol·L^{-1})	0.8×10^{-6}	0.4 μmol·L^{-1}
ROX Relerence Dye	0.4×10^{-6}	1×
DNA	2×10^{-6}	/
DEPC	6×10^{-6}	/
Total system	20×10^{-6}	/

结果

1 抗Fn和ETBF体外活性筛选及分析

本研究对市售商业化合物库中3 400个化合物进行抑菌活性筛选 (测试的两个菌株分别为Fn和ETBF)。以化合物的MIC$_{50}$ ≤ 64 μg·mL^{-1}来评价其是否具有体外抗肠道致病菌活性。结果显示, 有52个化合物展现出抗Fn活性, 44个化合物展现出抗ETBF活性。活性较好的化合物 (Fn: MIC$_{50}$ ≤ 4 μg·mL^{-1}, ETBF: MIC$_{50}$ ≤ 16 μg·mL^{-1}) 如表3所示。

通过查阅Schifinder发现, 本研究中具有抗菌活性的化合物多为重要的药物合成中间体, 例如, 化合物**6** (表3) 是合成去泛素化酶 (ubiquitin specific peptidase 14, USP14) 小分子抑制剂的关键中间体, IU1-47作为一种USP14抑制剂增强细胞中蛋白质降解的能力可加快野生型tau、病理性tau突变体P301L和P301S及A152T tau变体的降解速率[23]; 化合物**3**是许多抗菌剂的合成中间体, 同时对多种细菌具有较好抗菌活性[24]。化合物**7** (SC-43) 是一种非受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 (src homology region 2 domain containing phosphatase 1, SHP-1) 激动剂, 可与上市药物索拉非尼联用治疗晚期肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)[25]。在所有测试化合物中, 化合物**G7** (表3中化合物**2**) 具有最优的抗菌活性, 其对Fn和ETBF的MIC$_{50}$值分别为1和4 μg·mL^{-1}。化合物**G7**为一种具有共价作用机制的小分子化合物, 其可能通过特异性靶向蛋白质半胱氨酸残基形成共价键以发挥生物学效应。截至目前, 尚未见诸文献报道该化合物在疾病治疗领域的系统性研究或临床前应用数据, 为后续基于**G7**的药物研发提供了良好的开端。

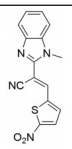
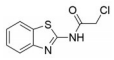
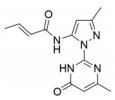
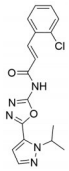
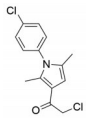
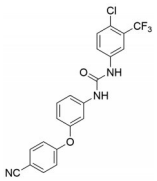
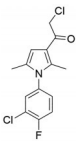
2 化合物G7能够有效抑制Fn和ETBF的生长

通过筛选获得了多个活性优秀的抗Fn和ETBF的活性化合物, 本研究优选活性最优化合物**G7**开展了后续研究。首先, 通过生长曲线法考察化合物**G7**对Fn

Table 2 Primers used for real-time PCR. 16S: 16S ribosomal-RNA; *OMPA*: Outer membrane protein; *BMEB3*: RND-type efux pump; *MP*: Metallopeptidase

Gene	Forward primer	Reverse primer
16S	AGTAGAGGTGGGGGGAATTC	GTGTCAGTTGCAGTCCAGTG
OMPA	GGATATGACGGTGTTGCCAG	TAGCAGCAGCCATGTCATTC
BMEB3	GTACCGGAAGTTCAAGGTGT	GAGCAGCCTCGATATTCTGT
MP	TGCGGCGAACTCGGTTTATGC	CAGTAAAGCCATCCAGCCCTTCATC

Table 3　Representative anti-Fn and anti-ETBF hits by phenotype screening (Fn: $MIC_{50} \leqslant 4$ μg·mL^{-1}, ETBF: $MIC_{50} \leqslant 16$ μg·mL^{-1}). MIC_{50}: Minimum inhibitory concentration

Compd.	Structure	Therapeutic use	Previously described as antibacterial drug	MIC_{50}/μg·mL^{-1}	
				Fn	ETBF
1		/	No	2	8
2		/	No	1	4
3		/	No	4	16
4		/	No	2	16
5		/	No	4	16
6		/	No	4	8
7		SHP-1 agonist	No	4	16
8		/	No	4	16

和ETBF的抑菌效果。以不同浓度的化合物分别与两种菌加入到96孔板中共孵育48 h, 在化合物质量浓度为0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μg·mL^{-1}时处理48 h测定其对Fn生长抑制作用, 在化合物质量浓度为0.25、0.5、1、2和4 μg·mL^{-1}时测定其对ETBF生长抑制作用。结果如图2所示, 化合物在48 h内呈剂量依赖关系抑制Fn和ETBF的生长, 即随着浓度的增加, 化合物对两种菌的生长抑制增强。与对照组相比, Fn组的化合物在1 μg·mL^{-1}时的抑菌率为78.80%, 即使在低于MIC_{50} 16×的情况下 (0.062 5 μg·mL^{-1}) 其抑制率仍为34.67%, 而ETBF组化合物在4 μg·mL^{-1}时的抑菌率为91.55%, 低于MIC_{50} 16×的情况下 (0.25 μg·mL^{-1}) 抑制率为20.59%, 尤其化合物**G7**是在4 μg·mL^{-1}质量浓度下对ETBF的生长有明显的抑制作用 (抑制率为91.55%)。抑菌曲线实验结果表明**G7**通过抑制细菌生长而非杀菌发挥抗菌作用的。

3　化合物G7抑制Fn诱导的CRC细胞迁移

研究发现Fn能促进结直肠癌细胞的增殖和侵袭[7]。本研究通过Transwell实验来研究化合物**G7**是否能够降低Fn诱导的人源结直肠癌细胞株HCT116的迁移能力。结果如图3A所示, HCT116细胞与Fn共孵育时, HCT116细胞数量显著增加, 表明Fn促进了HCT116细胞的迁移。相反, 化合物单独使用时无法阻止HCT116细胞的迁移。在共孵育试验中, 化合物有效降低了Fn的密度, 并且以剂量依赖性方式抑制了HCT116的迁移。当化合物**G7**的质量浓度增加到2 μg·mL^{-1}时, 能够完全抑制HCT116细胞的迁移 (图3A), 表明化合物**G7**抑制了Fn诱导的CRC细胞迁移。

4　化合物G7显著抑制Fn生物膜的形成

细菌群落形成的细菌生物膜对细菌病原菌的耐药

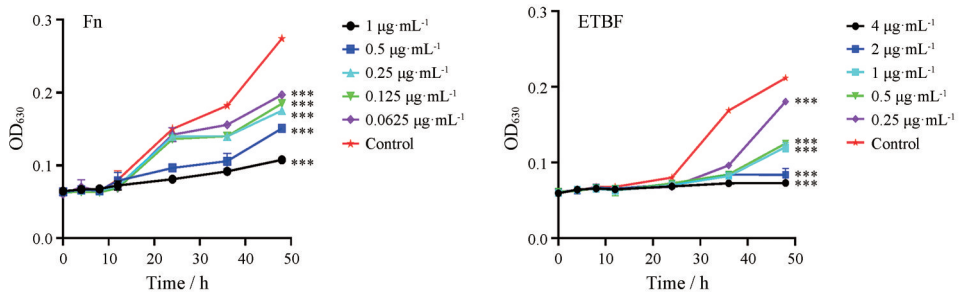


Figure 2 Inhibition curve of the compound **G7**. $n = 3, \bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$ *vs* control

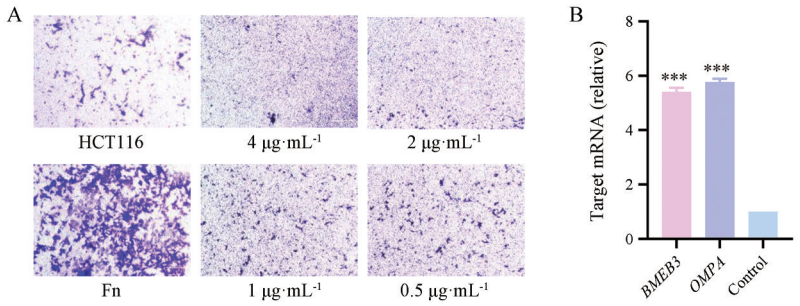


Figure 3 Using different concentrations of compound **G7**, Fn was allowed to co-incubate with HCT116 cells for 48 hours. Fluorescence microscopy was used to capture images and observe the effect of **G7** on inhibiting Fn-induced migration of CRC cells. Additionally, compound **G7** was used at its MIC_{50} to treat ETBF for 48 hours, and its effects on the *OMPA* gene, *BMEB3* gene, and *MP* gene were assessed. A: Effects of different concentrations of compound **G7** on the migration ability of HCT116 induced by Fn, with magnifications of 200×. B: Effects of compound **G7** on the expression of *OMPA* and *BMEB3* gene in ETBF. $n = 3, \bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$ *vs* control

性和耐受性至关重要[26]。具体而言, 生物膜能够使细菌耐受恶劣条件, 并对抗菌治疗产生耐药性。此外, 生物膜还与一系列慢性疾病的发生有关, 如牙周炎、心内膜炎、骨髓炎和尿路感染等, 但由于细菌耐药性的存在, 并不能有效治疗这些疾病[26,27]。结晶紫是一种碱性染料, 具有与生物膜中特定成分结合的能力[28]。据此, 作为初步的作用机制研究, 以MDZ为阳性对照, 采用结晶紫染色法评价化合物**G7**对具核梭菌生物膜形成的影响。结果如图4所示, 随着**G7**浓度的增加, 结晶紫溶液的蓝色逐渐变淡直至变得澄清, 以上现象直接反映了生物膜结构的破坏和细菌细胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)的减少, 表明化合物**G7**对Fn和ETBF的生物膜形成具有明显抑制作用, 并呈现出明显的剂量依赖性。

5 化合物G7能够显著抑制Fn细胞膜稳定性

SEM能够产生样品表面的高分辨率图像, 从而揭示其微观结构和形态。TEM能够穿透薄样品, 观察其内部结构。因此, 作为初步的作用机制研究, 本研究进一步通过SEM和TEM实验初步研究该化合物对Fn的作用机制, 以MDZ为阳性对照, 结果如图5所示, 加入化合物**G7**后, Fn脂多糖或者代谢产物减少, 而TEM实验中经**G7**化合物处理过的Fn, 颜色更淡更容易穿透细胞膜, 且内溶物增多, 说明经过化合物处理的Fn细胞膜更加不完整, 表明该化合物影响了Fn的细胞膜。同时, 研究还发现MDZ和化合物**G7**对Fn作用后的TEM明显不同, MDZ可能是破坏细胞壁外层结构, 而化合物**G7**可能是影响Fn内部某些结构抑制其生长, 说明化合物**G7**与甲硝唑对Fn的抗菌作用机制可能不同。

6 G7影响ETBF相关基因的表达

外膜蛋白(outer membrane protein, *OMPA*)基因编码的外膜蛋白是ETBF等革兰阴性菌外膜的重要组成成分, 对维持外膜结构的稳定性和完整性具有重要作用[29]。RND型外排泵(RND-type efux pump, *BMEB3*)基因是RND型外排泵家族中的一员, 编码的蛋白能够将有害物质(如抗生素)从细菌细胞内主动排出, 从而赋予细菌对多种抗生素的耐药性[30]。RND型外排泵是细菌产生多重耐药性的重要机制之一。金属肽酶(metallopeptidase, *MP*)基因编码的金属肽酶是一类能够降解细胞外基质和其他蛋白质的酶类, BFT是一种锌依赖性的金属蛋白酶。这类酶在细菌的生长、繁殖和致病过程中发挥重要作用, 如促进细菌对宿主的侵袭和扩散等[31]。*OMPA*基因、BMEB3基因和锌依赖性*MP*基因[32,33]均是已报道的ETBF可能的作用靶点。据此, 进一步通过RT-qPCR实验验证化合物是否会影响

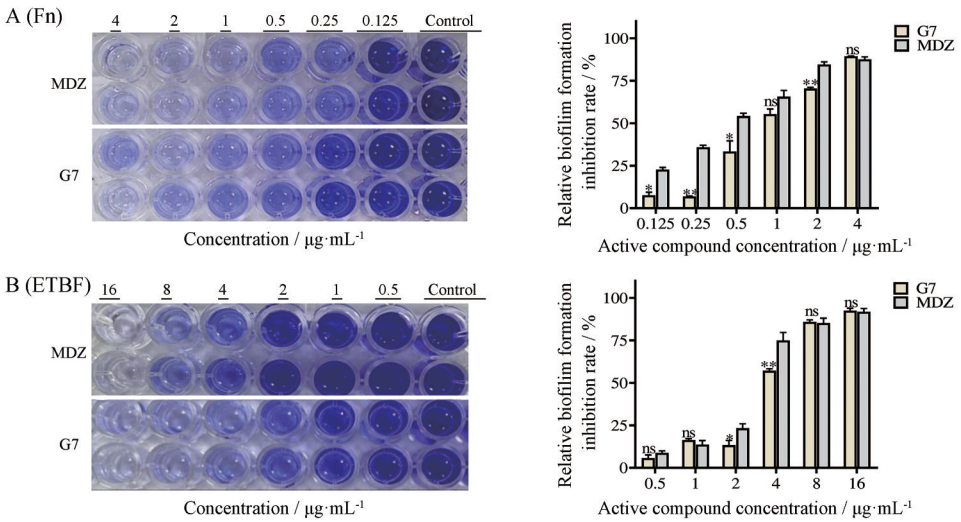


Figure 4　The effects of different concentrations of compound **G7** on biofilms when applied to Fn and ETBF for 48 hours were investigated. A: The relative inhibitory effects of the active compound and metronidazole (MDZ) on Fn biofilm; B: The relative inhibitory effects of the active compound and MDZ on ETBF biofilm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* MDZ. ns: No significance

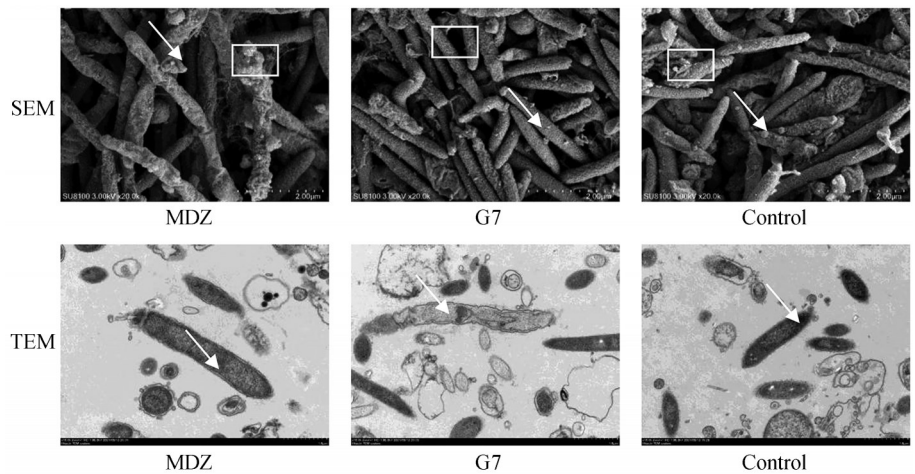


Figure 5　SEM and TEM were employed to observe the effects of MDZ, **G7** at a concentration of MIC_{50}, and 0.6% dimethyl sulfoxide (DMSO) on Fn, with magnifications of 20 000× and 80 000×, respectively. SEM: Scanning electron microscopy; TEM: Transmission electron microscopy

以上3个基因。循环阈值 (cycle threshold, CT)是RT-qPCR实验中的重要参数, CT值大于35, 通常意味着目标核酸的初始浓度非常低, 小于35, 表示目标核酸的初始浓度较高。结果如图3所示, 对于*MP*基因, 化合物**G7**作用后, 其CT值均大于35, 这可能是因为样本中目标核酸浓度极低, *OMPA*和*BMEB3*基因CT值均小于35, 结果显示明显增加了两者基因的表达量 (图3B)。说明**G7**化合物能够通过影响*OMPA*、*BMEB3*基因从而产生抑制ETBF的作用。

讨论

鉴于Fn和ETBF在结直肠癌的发生发展中具有较为明确的促进作用, 发现抗两种肠道致病菌药物对于结直肠的治疗具有重要意义。本研究通过表型筛选含有3 400个化合物的商业化合物库, 发现了多个具有活性苗头化合物。优选活性最好化合物**G7**评价了其对两种菌的抑菌活性, 均表现出优秀的抗菌活性, 即使在低于MIC_{50}值, 作用48 h, 也能有效抑制Fn和ETBF的生长。通过细胞迁移实验进一步验证了Fn促进HCT116细胞的迁移, 而加入化合物**G7**可以通过抑制Fn的生长从而有效抑制HCT116细胞迁移。

细菌生物膜不仅可以帮助细菌逃避机体的先天性免疫和适应性免疫系统, 还可以阻止外界抗菌物质进入, 为细菌提供一个有利的环境。通过生物膜生长抑

制实验进一步深入了解细菌生物膜的形成机制, 结果表明该化合物能够显著抑制生物膜的形成。

进一步通过SEM和TEM直观地展示了生物膜在化合物作用下的形态变化。在未添加化合物的对照组中, Fn的生物膜呈现出立体、成熟且完整的结构, 细胞排列紧密, 形态规则。然而, 当向体系中加入化合物**G7**后, Fn的生物膜完整性受损, 缺乏成熟结构, 细胞间连接变得松散, 甚至出现了细胞溶解的现象, 从微观层面证实了化合物对生物膜的破坏作用。结合TEM的细胞形态学改变, 可以发现**G7**还可能直接作用于细胞质, 表现为细胞质变得稀薄、不均匀, 出现明显的物质流失现象。表明其可能通过多种作用机制发挥抗菌作用。

OMPA、*BMEB3*和*MP*基因是ETBF可能的作用靶点。通过RT-qPCR实验测试化合物**G7**对以上ETBF潜在靶点基因表达的影响。结果显示, **G7**对*MP*基因的表达影响甚微, 但却显著增加了*OMPA*和*BMEB3*基因的表达量, 推测可能的作用机制通过增加该基因的表达量从而负反馈影响生物膜。

综上所述, 本研究通过表型筛选3 400个共价化合物, 发现了多个苗头化合物, 优选高活性化合物**G7**通过生物膜、SEM、TEM、RT-qPCR和Transwell等实验, 初步探讨了其可能的作用机制。同时, **G7**作为一种共价高活性化合物, 含有硝基和氰基等共价官能团, 其可能是活性重要官能团。通过文中所述实验及**G7**的结构特性将为未来开发新型抗肠道致病菌药物奠定一定基础。

作者贡献: 陈凤参与了文献调研、手稿设计与撰写; 陈凤、陈玉平、白学鑫进行了实验研究及数据收集; 武善超进行技术指导并修改论文; 武善超、盛春泉获取经费资助并指导整个研究。所有作者都阅读并认可手稿的最终版本。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.

[2] Sun J, Kato I. Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer [J]. Genes Dis, 2016, 3: 130-143.

[3] Wong SH, Zhao LY, Zhang X, et al. Gavage of fecal samples from patients with colorectal cancer promotes intestinal carcinogenesis in germ-free and conventional mice [J]. Gastroenterology, 2017, 153: 1621-1633.e 6.

[4] Wirbel J, Pyl PT, Kartal E, et al. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer [J]. Nat Med, 2019, 25: 679-689.

[5] Abed J, Emgård JEM, Zamir G, et al. Fap2 mediates *Fusobacterium nucleatum* colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed Gal-GalNAc [J]. Cell Host Microbe, 2016, 20: 215-225.

[6] Dai ZW, Coker OO, Nakatsu G, et al. Multi-cohort analysis of colorectal cancer metagenome identified altered bacteria across populations and universal bacterial markers [J]. Microbiome, 2018, 6: 70.

[7] Dejea CM, Fathi P, Craig JM, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria [J]. Science, 2018, 359: 592-597.

[8] Chung L, Thiele Orberg E, Geis AL, et al. *Bacteroides fragilis* toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade *via* targeting of colonic epithelial cells [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23: 203-214.e 5.

[9] Cao YY, Wang ZH, Yan YQ, et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* promotes intestinal inflammation and malignancy by inhibiting exosome-packaged miR-149-3p [J]. Gastroenterology, 2021, 161: 1552-1566.e12.

[10] Cullin N, Azevedo Antunes C, Straussman R, et al. Microbiome and cancer [J]. Cancer Cell, 2021, 39: 1317-1341.

[11] Zhang S, Cai SJ, Ma YL. Association between *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: progress and future directions [J]. J Cancer, 2018, 9: 1652-1659.

[12] Parida S, Wu SG, Siddharth S, et al. A procarcinogenic colon microbe promotes breast tumorigenesis and metastatic progression and concomitantly activates notch and β-catenin axes [J]. Cancer Discov, 2021, 11: 1138-1157.

[13] Quaglio AEV, Grillo TG, De Oliveira ECS, et al. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28: 4053-4060.

[14] Kong XH, Zhang Y, Xiang LW, et al. *Fusobacterium nucleatum*-triggered neutrophil extracellular traps facilitate colorectal carcinoma progression [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42: 236.

[15] Lee WS, Jean SS, Chen FL, et al. Lemierre's syndrome: a forgotten and re-emerging infection [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2020, 53: 513-517.

[16] Dong JL, Li Y, Xiao HW, et al. Oral microbiota affects the efficacy and prognosis of radiotherapy for colorectal cancer in mouse models [J]. Cell Rep, 2021, 37: 109886.

[17] Köhn-Luque A, Myklebust EM, Tadele DS, et al. Phenotypic deconvolution in heterogeneous cancer cell populations using drug-screening data [J]. Cell Rep Methods, 2023, 3: 100417.

[18] Selvin T, Berglund M, Lenhammar L, et al. Phenotypic screening platform identifies statins as enhancers of immune cell-induced cancer cell death [J]. BMC Cancer, 2023, 23: 164.

[19] Yu T, Guo FF, Yu YN, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy [J]. Cell, 2017, 170: 548-563.e16.

[20] Nithianantham S, Xu MH, Yamada M, et al. Crystal structure of FadA adhesin from *Fusobacterium nucleatum* reveals a novel oligomerization motif, the leucine chain [J]. J Biol Chem, 2009, 284: 3865-3872.

[21] Fardini Y, Wang XW, Témoin S, et al. *Fusobacterium nucleatum* adhesin FadA binds vascular endothelial cadherin and alters endothelial integrity [J]. Mol Microbiol, 2011, 82: 1468-1480.

[22] Ma W, Zhang L, Chen WL, et al. Microbiota enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-secreted BFT-1 promotes breast cancer cell stemness and chemoresistance through its functional receptor NOD1 [J]. Protein Cell, 2024, 15: 419-440.

[23] Boselli M, Lee BH, Robert J, et al. An inhibitor of the proteasomal deubiquitinating enzyme USP14 induces tau elimination in cultured neurons [J]. J Biol Chem, 2017, 292: 19209-19225.

[24] Patel RV, Patel PK, Kumari P, et al. Synthesis of benzimidazolyl-1, 3, 4-oxadiazol-2ylthio-*N*-phenyl acetamides as antibacterial, antifungal and antituberculosis agents [J]. Eur J Med Chem, 2012, 53: 41-51.

[25] Chao TI, Tai WT, Hung MH, et al. A combination of sorafenib and SC-43 is a synergistic SHP-1 agonist duo to advance hepatocellular carcinoma therapy [J]. Cancer Lett, 2016, 371: 205-213.

[26] Roy R, Tiwari M, Donelli G, et al. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action [J]. Virulence, 2018, 9: 522-554.

[27] Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria [J]. Future Microbiol, 2015, 10: 1743-1750.

[28] O′Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay [J]. J Vis Exp, 2011, 47: e2437.

[29] Guan QF, Bhowmick B, Upadhyay A, et al. Structure and functions of bacterial outer membrane protein A, a potential therapeutic target for bacterial infection [J]. Curr Top Med Chem, 2021, 21: 1129-1138.

[30] Pumbwe L, Ueda O, Yoshimura F, et al. *Bacteroides fragilis* BmeABC efflux systems additively confer intrinsic antimicrobial resistance [J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58: 37-46.

[31] Potok P, Potocki S. Bacterial M10 metallopeptidase as a medicinal target-coordination chemistry of possible metal-based inhibition [J]. Dalton Trans, 2022, 51: 14882-14893.

[32] Jimenez-Alesanco A, Eckhard U, Asencio Del Rio M, et al. Repositioning small molecule drugs as allosteric inhibitors of the BFT-3 toxin from enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* [J]. Protein Sci, 2022, 31: e4427.

[33] Jang HI, Eom YB. Antibiofilm and antibacterial activities of repurposing auranofin against *Bacteroides fragilis* [J]. Arch Microbiol, 2020, 202: 473-482.