

抗肠道致病具核梭杆菌硝基咪唑衍生物的设计、合成和体外抗菌活性评价

陈玉平^{1#}, 陈 凤^{1,2#}, 武善超^{1*}

(1. 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;
2. 大理大学药学院, 云南 大理 671000)

摘要: 具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, Fn) 与结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的发生和发展密切相关。因此, 开发针对 Fn 的特异性抗菌药物对于 CRC 的预防和治疗至关重要。前期课题组通过表型筛选成功鉴定出二甲硝咪唑为抗 Fn 苗头化合物。作为初步的结构优化探索, 本研究构建了 3 种结构类型并初步合成了 7 个新型硝基咪唑衍生物, 对所有目标化合物开展了抗菌测试。其中, 化合物 **CL6** 对 Fn 显示优良的抗菌活性 (MIC = 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 并且对肠道细菌和正常细胞均具有良好的选择性。化合物 **CL6** 显著抑制了 Fn 诱导的 CRC 细胞 (HCT116) 迁移。初步机制研究表明, 化合物 **CL6** 破坏了 Fn 菌体生物膜和细胞壁的完整性, 这为开发新型抗 Fn 药物提供了一个有前景的先导化合物。

关键词: 具核梭杆菌; 结直肠癌; 二甲硝咪唑; 抗菌活性; 作用机制

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1464-10

Design, synthesis, and *in vitro* antibacterial activity evaluation of nitroimidazole derivatives against intestinal pathogenic *Fusobacterium nucleatum*

CHEN Yu-ping^{1#}, CHEN Feng^{1,2#}, WU Shan-chao^{1*}

(1. 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; 2. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: *Fusobacterium nucleatum* (Fn) is closely associated with the occurrence and progression of colorectal cancer (CRC). The development of specific antibacterial agents targeting Fn is crucial for the prevention and treatment of CRC. Based on the preliminary phenotypic screening results from our research group, dimetridazole was successfully identified as a hit compound with antibacterial activity against Fn. In this preliminary structural optimization study, we designed and synthesized seven novel nitroimidazole derivatives comprising three structural types, followed by antimicrobial evaluation of all target compounds. Among them, compound **CL6** exhibited excellent antibacterial activity against Fn (MIC = 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and demonstrated good selectivity towards intestinal bacteria and normal cells. Compound **CL6** significantly inhibited the migration of CRC cells (HCT116) induced by Fn preliminary mechanistic studies suggest that compound **CL6** disrupts the integrity of the Fn bacterial biofilm and cell wall, providing a promising lead compound for the development of novel anti-Fn drugs.

收稿日期: 2025-04-01; 修回日期: 2025-04-11.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22377145); 国家重点研发计划 (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: 86-21-81871242, E-mail: wushanchao07_2@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0358

Key words: *Fusobacterium nucleatum*; colorectal cancer; dimetridazole; antibacterial activity; mechanism

具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, Fn) 是一种革兰阴性厌氧菌, 它在人类口腔、胃肠道等部位均存在宿主^[1]。定植在口腔中的Fn能够引起人体口腔上皮及牙齿等部位感染, 与牙周病、急性坏死性牙龈炎、口腔癌等口腔常见疾病可能存在关联性^[2]。相关研究表明^[1], 在牙周炎发生发展过程中, Fn可以共聚牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, Pg) 等细菌, 促进Pg的牙周致病作用。同时, Fn可借助消化道、呼吸道、血液等到达全身各个部位, 其产生的毒素和代谢副产物也可能入血参与调节口腔以外的免疫炎症反应^[2]。

研究表明, Fn与人类炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)、结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 发生和发展的各个阶段密切相关。它经常在不同感染患者的厌氧样本中被分离培养出来, 因此主流的观点认为它是一种机会性病原体^[3-5]。尽管Fn已经被微生物学家所熟知, 它作为微生物菌群特别是肠道菌群中的致癌因素的证据也在不断凸显, 越来越多的研究正逐步揭示Fn在肿瘤细胞的发生、增殖、扩散和治疗方面的作用^[1,6-8]。近年来, 本课题组及其他研究团队发现该菌与CRC发生发展的各个阶段密切相关^[9-12]。

作为肠道致病菌的Fn, 不仅在CRC组织中最为常见, 且其丰度显著升高。该菌能够诱导炎症反应和免疫细胞的浸润, 进而破坏肿瘤免疫环境, 多项研究已明确证实其可作为CRC的潜在生物标志物和药物治疗的有效干预靶点^[13-16]。这为人类CRC的治疗提供新的思路 (图1)^[17]。因此, 开发特异性抗Fn药物将有助于CRC治疗。然而, 广谱抗生素的广泛使用可能破坏肠道菌群生态平衡, 增加潜在的治疗风险^[18-20], 研发出一种基于抗肠道致病Fn的药物进而能够间接作为抗结直肠癌的药物迫在眉睫^[21]。

课题组前期通过表型筛选与结构优化策略, 发现两类抗Fn活性的苗头化合物^[22,23]。然而, 现有的抗Fn药物的结构多样性仍然不足, 亟需扩展其抗菌剂的结构类型。基于前期药物重定位筛选结果分析, 二甲硝咪唑 (dimethylimidazole, DMZ) 显示出良好的抗Fn活性 ($MIC = 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[23], 可以作为苗头化合物进一步优化 (图2)。在新药发现中, 作为初步的结构优化探索, 本研究以DMZ为核心骨架, 首先构建了3种结构类型骨架, 随后基于骨架开展简单的结构衍生, 旨在发现抗Fn先导物, 经抗菌活性评价, 最终发现化合物CL6对Fn具有优秀的抑菌活性, 且对肠道菌群表现出良好选择性。

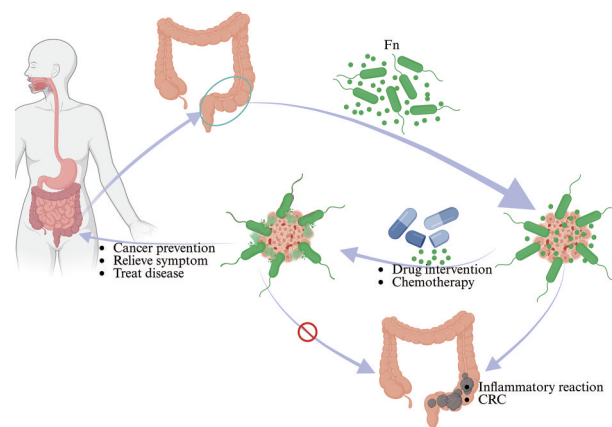


Figure 1 Intestinal pathogenic Fn is closely associated with the occurrence and development of CRC, and the development of its specific inhibitors will provide a new strategy for the treatment of CRC. Fn: *Fusobacterium nucleatum*; CRC: Colorectal cancer

结果与讨论

1 目标化合物的合成及结构表征

1.1 化学合成 目标化合物CL1~CL3的合成路线如合成路线1所示。以1-甲基-5-硝基-2-羟甲基咪唑(1)为起始原料, 经高锰酸钾氧化成1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-羧酸钾盐(2), 中间体2在DMF溶剂中, 经草酰氯[(COCl)₂]酰化形成1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-酰氯(3), 中间体3与不同取代的苄胺或苯胺(4), 在干燥DCM溶剂和碱性条件下(三乙胺, TEA), 通过亲核取代反应生成目标化合物CL1~CL3。

目标化合物CL4和CL5的合成路线如合成路线2所示。原料1经氯化亚砷(SOCl₂)亲核取代反应成2-氯甲基-1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑(5), 中间体5在甲醇(MeOH)溶剂中, 经氨水(NH₃·H₂O)发生亲核取代反应生成中间体(1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-基)甲胺(6), 中间体6与不同基团取代的羧酸(7), 在1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI)、1-羟基苯并三唑(HOBt)、碱性条件(*N,N*-二异丙基乙胺, DIPEA)和干燥DCM溶剂中, 通过亲核取代反应生成目标化合物CL4和CL5。

目标化合物CL6和CL7的合成路线如合成路线3所示。中间体5与不同长度烷基链取代的苄胺(8)在DMF溶剂和碱性条件下(TEA), 通过亲核取代反应生成目标化合物CL6和CL7。

1.2 结构表征 所合成硝基咪唑衍生物CL1~CL7的结构经¹H NMR、¹³C NMR和HRMS确认 (结果见实

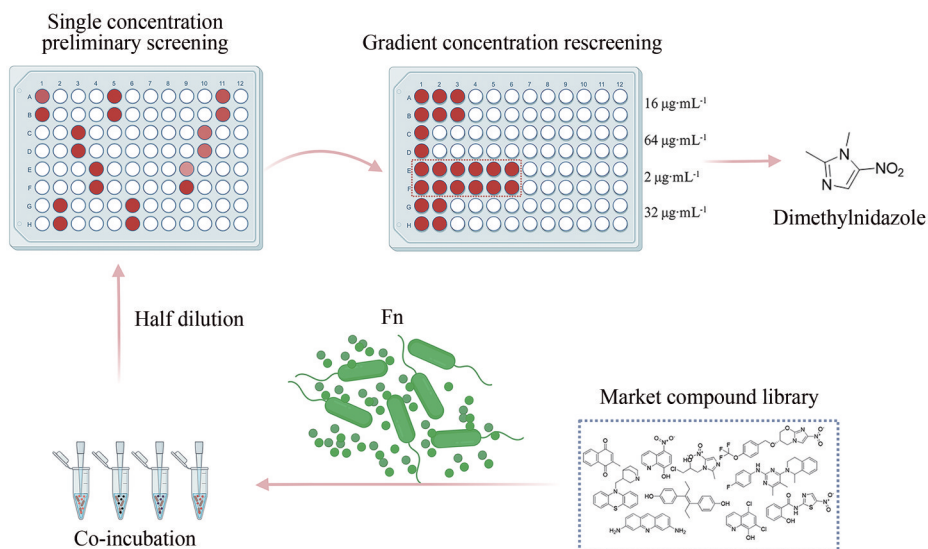
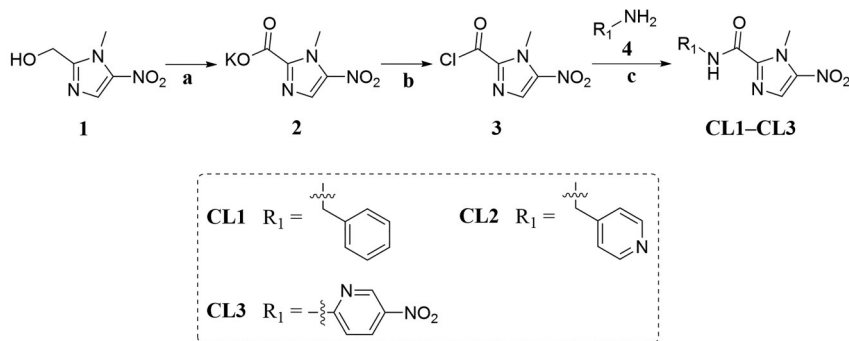
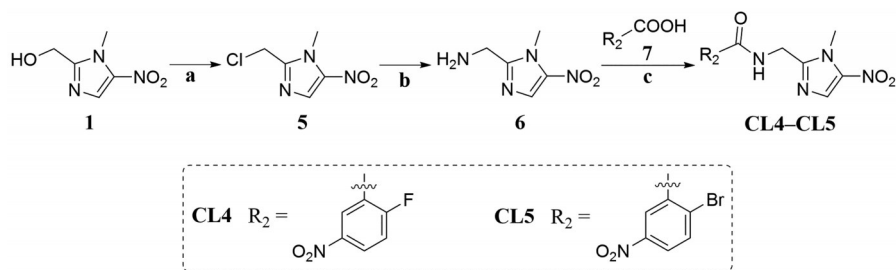


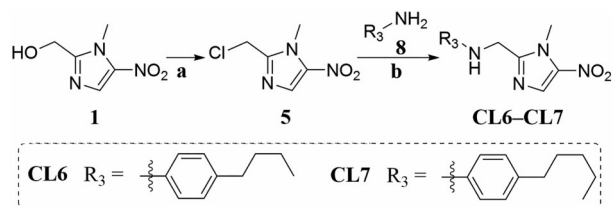
Figure 2 Discovery strategy for anti-intestinal pathogenic Fn lead compounds



Scheme 1 Synthetic route for novel nitroimidazole compounds containing amide linkers. Reagents and conditions: (a) KMnO_4 , CH_3COCH_3 , $-5\text{ }^\circ\text{C}$, overnight, yield 52.6%; (b) $(\text{COCl})_2$, DMF, rt, 1.5 h, yield 77.8%; (c) TEA, DCM, rt, 4 h, yields 83.3%–88.6%



Scheme 2 Synthetic route for novel nitroimidazole compounds containing amide linkers. Reagents and conditions: (a) SOCl_2 ; DCM, rt, 4.5 h, yield 94.0%; (b) $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CH_3OH , rt, 48 h, yield 76.8%; (c) EDCI, HOBT, DIPEA, DMF, rt, 4 h, yields 80.3%–89.3%



Scheme 3 Synthetic route for novel nitroimidazole compounds containing amine linkers. Reagents and conditions: (a) SOCl_2 ; DCM, rt, 4.5 h, yield 94.0%; (b) TEA, dry DMF, $85\text{ }^\circ\text{C}$, reflux, 4–5 h, yields 18.7%–20.2%

验方法部分)。

2 目标化合物的体外抗菌活性评价

根据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)《厌氧菌药物敏感性试验方法》(第七版)^[24], 采用标准化肉汤稀释药敏试验评价合成化合物对 Fn 的体外活性。将 7 种目标化合物溶解于 DMSO (细胞培养级) 中, 制备成质量浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。在相同条件下制备了 DMZ 和甲

硝唑 (metronidazole, MDZ) 作为对照溶液。测试结果如表 1 所示。

Table 1 *In vitro* antibacterial activity of target compounds against-Fn. MIC: Minimal inhibitory concentration; HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells; DMZ: Dimetridazole; MDZ: Metronidazole

Compd.	X	R	Fn	
			MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	HUVEC IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
CL1			16	-
CL2			64	-
CL3			16	-
CL4			8	-
CL5			4	-
CL6			0.5	> 50
CL7			1	-
DMZ	-	-	1	-
MDZ	-	-	4	> 50

在本研究中,除 CL2 外,所合成的化合物对 Fn 表现出中等到良好的抑制活性 (MIC 值范围 $0.5\sim 16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。氨基连接基团和烷基苯取代同时存在时 (CL6 和 CL7), 抗菌效力增强 (MIC = $0.5\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 优于苗头化合物二甲硝咪唑 (MIC = $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 酰胺连接基团取代中, 氨基靠近咪唑基团 (CL4 和 CL5) 时, 活性呈现轻微下降 (MIC = $4\sim 8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 酰胺连接基团取代中, 氨基远离咪唑基团 (CL1~CL3) 时, 活性均显著降低 (MIC $\geq 16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

3 化合物 CL6 对肠道细菌的选择性评价

由于肠道内的微生物菌群丰富, 常驻细菌的数量是人类体细胞和生殖细胞的 10 倍, 它们可以形成一种天然的防御屏障, 对上皮细胞起保护作用^[25,26]。因此, 如果能够特异性抑制 Fn 增殖的药物有助于维护肠道菌群平衡, 保持肠道菌群功能。考虑到化合物 CL6 具

有良好的抗 Fn 活性和较低的细胞毒性 (对 HUVEC 无抗增殖活性, IC₅₀ 值大于 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 选择化合物 CL6 评估化合物对肠道菌群的选择性抑制作用。使用 CLSI 方法^[24]进一步测定了化合物 CL6 对 7 种常见肠道细菌 (产肠毒素脆弱拟杆菌, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, ETBF; 大肠杆菌, *E. coli*; 粪肠球菌, *E. faecalis*; 福氏志贺氏菌, *S. flexneri*; 乙型副伤寒沙门氏菌, *S. paratyphi*; 植物乳杆菌, *L. plantarum*; 厌氧消化链球菌, *P. anaerobius*) 和 2 种真菌 (白念珠菌, *C. aur.* 和新生隐球菌, *C. neo.*) 的抗增殖活性。以 DMZ 和 MDZ 为阳性对照, 测试结果如表 2 所示, 化合物 CL6 对所检测的肠道细菌和真菌的抑菌活性较低, 对大多数肠道细菌的 MIC 值大于 $64\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 说明优选化合物的抗 Fn 活性和选择性较好, 有待进一步评价。

4 化合物 CL6 对 Fn 的生长曲线实验

为研究该类化合物对 Fn 的抑制效果^[27], 鉴于前期实验中化合物 CL6 具备高效抗 Fn 活性及良好的选择性, 作者进一步对优选活性化合物 CL6 采用时间生长曲线试验评估其对 Fn 的抗菌活性特点。用不同质量浓度的化合物 CL6 处理 Fn 72 h (图 3), 连续性地考察化合物 CL6 对 Fn 生长抑制作用的时间动态变化。结果表明, 化合物 CL6 对 Fn 的生长有强烈的抑制作用, 且呈剂量依赖性。结果如图 3A 所示, 在前 12 h 对 Fn 的抑制作用较弱, 即在指数生长期时几乎没有抑制作用, 在 24 h 后, 化合物 CL6 对 Fn 展现出抑菌作用, 且在化合物 CL6 为 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时抑菌作用最为明显, 抑菌作用呈浓度依赖 (图 3B)。基于上述结果, 推测化合物 CL6 对 Fn 具有抑菌作用 (bacteriostatic) 而非杀菌作用 (bactericidal)。

5 化合物 CL6 能够逆转 Fn 诱导的 HCT116 细胞迁移

已有研究报道 Fn 可增加 CRC 细胞株的增殖和侵袭活性^[28,29]。进一步采用 Transwell 法研究化合物 CL6 是否能降低 Fn 诱导的 CRC 细胞系 (人结肠癌细胞 HCT116) 的迁移能力。如图 4 所示, 当 HCT116 细胞与 Fn 共孵育时, HCT116 细胞数量显著增加, 这表明 Fn 促进了 HCT116 细胞的迁移。相反, 化合物 CL6 单独使用时无法阻止 HCT116 细胞的迁移 (图 4)。在共孵育试验中, 化合物 CL6 有效降低了 Fn 的密度, 从而以

Table 2 *In vitro* antibacterial and antifungal activities of compound CL6 (MIC, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). ETBF: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*; FLC: Fluconazole

Compd.	ETBF	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. paratyphi</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>P. anaerobius</i>	<i>C. aur.</i>	<i>C. neo.</i>
CL6	8	64	> 64	32	32	64	> 64	> 64	> 64
DMZ	16	16	16	8	32	32	32	-	-
MDZ	8	8	4	16	8	32	64	-	-
FLC	-	-	-	-	-	-	-	> 64	> 64

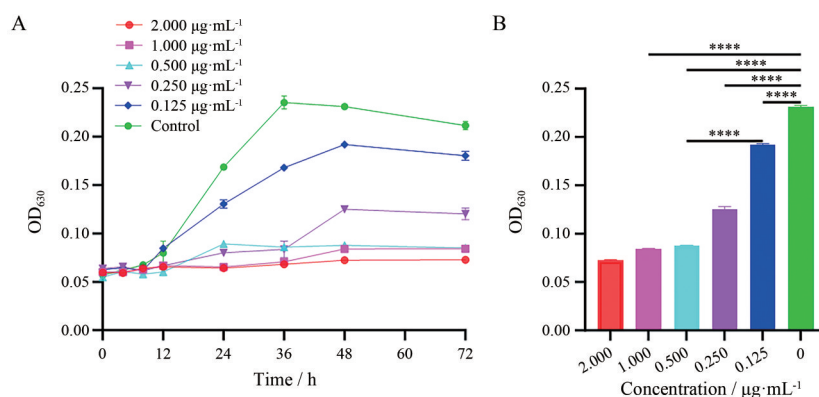


Figure 3 Time-growth curve of compound CL6. A: Time-growth curve determination of Fn (CL6); B: Fn treated with different concentrations of compound CL6 for 48 h, along with statistical comparisons between groups. $n = 3, \bar{x} \pm s$. **** $P < 0.0001$

剂量依赖性方式抑制了HCT116细胞的迁移。实验结果表明,化合物CL6能有效抑制Fn诱导的HCT116细胞迁移。

6 化合物CL6能够破坏Fn细胞结构的完整性

细菌的细胞壁具有一定程度的刚性,使细菌能够保持一定的形态,并作为骨架用于支撑其他细胞包膜成分。基于此,作者通过透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 来研究化合物CL6对Fn细胞形态变化的影响。正常的Fn细胞结构完整 (图5A), 细胞

膜和细胞壁清晰可见,可见部分内部结构,而与CL6共孵育的Fn较难观察到细胞的内部结构 (图5B), 大部分呈现断裂状态,细胞壁受到明显破坏,细胞内容物释放,经DMZ处理的Fn结构也出现明显变化 (图5B),但变化情况与CL6不同。透射电镜结果表明,化合物CL6可能通过破坏Fn细胞壁从而达到抑制Fn生长的作用,并且与DMZ的作用机制可能存在一定差异。

7 化合物CL6能够抑制Fn生物膜的形成

现有研究表明,生物膜与大部分感染疾病及部分

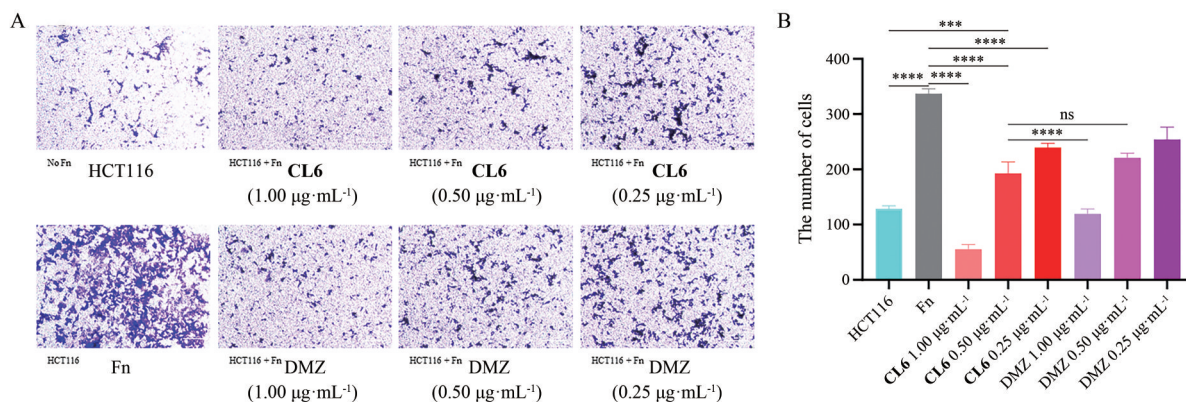


Figure 4 The preferred compound CL6 inhibits Fn and reduces Fn-induced migration in the HCT116 cell line. A: The effect of Fn on HCT116 cell migration at different concentrations of CL6 compared to the blank control; B: Comparison of cell migration rates across different experimental groups. $n = 3, \bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; ns: Not significant

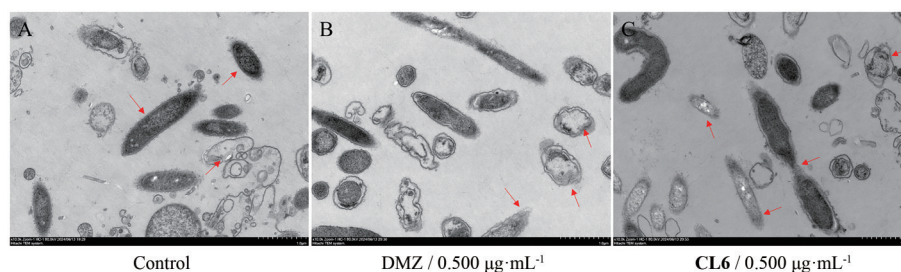


Figure 5 Transmission electron microscope (TEM) images of treated Fn, with untreated blank control (A), and experimental groups treated with $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of DMZ (B) and CL6 (C)

肿瘤微环境等相关,影响了人类生命健康和治疗措施的应用^[30]。生物膜可以附着在皮肤、伤口组织等位置,待生物膜成熟后,可以释放黏附在生物膜上的多种生物,这些生物会继续产生生物膜,进而附着并感染宿主^[31]。肿瘤细胞在体内生长离不开肿瘤微环境,肿瘤微环境由各种免疫细胞、血管内皮细胞、各种细胞因子等组成,近期研究表明,生物膜与各种类型的癌症之间存在联系^[32,33]。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^[34]。因此,采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、生物膜抑制实验(结晶紫染色)等方法研究 **CL6** 对生物膜的影响,判断其作用机制是否与生物膜相关。

以DMZ作为阳性对照,采用结晶紫染色法评价化合物 **CL6** 对Fn生物膜形成的影响^[35]。如图6所示,随着化合物 **CL6** 剂量的增加,结晶紫溶液的蓝色逐渐变淡澄清。结果表明,化合物 **CL6** 对Fn生物膜的形成具有明显的抑制作用,并呈剂量依赖性。

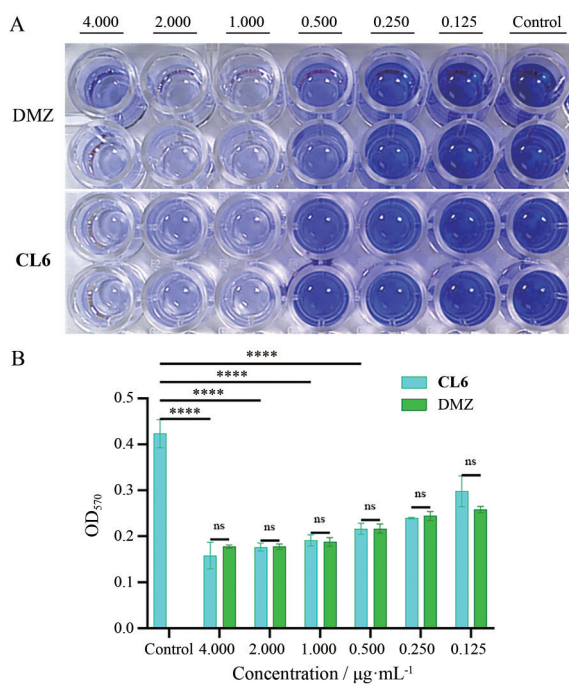


Figure 6 Crystal violet staining results of compound **CL6** treated Fn biofilm formation. A: Compound **CL6** significantly inhibits Fn biofilm formation; B: Statistical comparison of biofilm content after treatment with different concentrations of **CL6** for 48 h. $n = 2, \bar{x} \pm s$. **** $P < 0.0001$

扫描电镜结果如图7显示,从生物膜变化出发,未加任何化合物的Fn具有立体的、成熟的、完整的生物膜,当加入 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的DMZ时,生物膜影响明显,不完整、无成熟结构;而 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ **CL6**处理后的生物膜结构紊乱、成熟度低,且作用强度较DMZ明显。从

Fn结构出发,未处理的Fn结构完整、数量多,DMZ处理后,Fn大部分出现破裂、死亡等;而**CL6**处理后,结构出现皱缩、凝结、卷曲,与DMZ处理后的形态结构变化有明显差异。生物膜抑制实验表明,**CL6**对生物膜会产生一定影响,但结合扫描电镜结果提示,**CL6**除对生物膜产生影响外,还有可能有其他作用机制,这也是值得深入研究的方向。

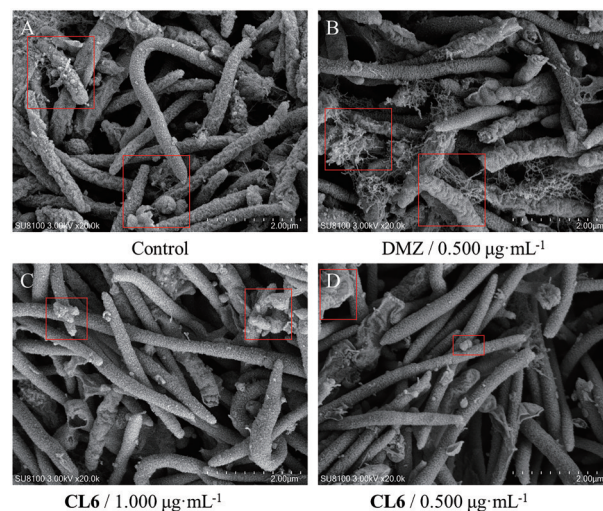


Figure 7 Scanning electron microscope (SEM) images of treated Fn, with untreated blank control (A), and experimental groups treated with $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of DMZ (B), $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (C) and $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (D) of **CL6**

8 结论

Boursi等^[18]研究发现,广谱抗生素的使用可能会破坏肠道菌群的平衡,导致有益菌减少,而使有害菌增多,且能够增加CRC的风险。与广谱抗生素作用不同的是,特异性抗Fn药物有望精确靶向Fn,避免对肠道菌群造成破坏,从而减少治疗带来的相关不良反应,如腹泻、肠道菌群失调等。鉴于Fn与CRC的发生发展密切相关,特异性抗Fn药物或将成为CRC治疗的潜在策略。此外,抗Fn药物不仅有望用于治疗CRC,在口腔感染、炎症性肠病的治疗,肠道微生态的调节等方面,也具有非常重要的临床价值。

本研究通过药物重定位策略筛选出的DMZ作为苗头化合物,设计合成了7个新型硝基咪唑衍生物。其中,优化化合物 **CL6** 表现出显著的抗Fn活性 ($\text{MIC} = 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),且细胞毒性较低,能够以剂量依赖方式有效抑制Fn的生长及生物膜形成。**CL6**可显著阻断Fn诱导的CRC细胞迁移。初步机制研究表明,**CL6**及其类似物的抗菌效应可能与破坏生物膜完整性及损伤细菌细胞膜或细胞壁结构密切相关。本研究不仅提供了有价值的结构方向,同时为抗Fn药物研发提

供了先导化合物,为CRC创新疗法的开发奠定了重要基础^[36,37]。同时,针对该系列化合物的结构优化及作用机制研究在本实验室将会深入开展。

实验部分

化学合成部分使用的原料均采购自探索平台、毕得医药、乐研试剂、超聪化工等公司平台,纯度均为分析纯和化学纯,可直接使用。BHI肉汤(Oxoid,批号:P000061049);布氏肉汤(海博生物,批号:20220312);结晶紫染色液(博科利尔,批号:2407212);电镜固定液(Servicebio,批号:HJ194907)。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,日本Nikon株式会社);LC-MS质谱仪(Agilent-1100)、核磁共振仪(600 M)(美国Agilent公司);-20 °C/-80 °C冰箱(Freezer)、低温离心机(Centrifuge 5804 R)(美国Thermo公司);比浊仪(Nephelometer,美国Thermo公司);酶标仪(SpectraMaxM2,美国Molecular Devices);霉菌培养箱(MJX-250B-Z,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司)。

¹H NMR和¹³C NMR谱由德国Bruker公司Bruker-AVANCEIII 600型核磁共振仪进行测试,氘代试剂为DMSO-*d*₆,内参为三甲基氯硅烷,化学位移(δ)和耦合常数(*J*)分别用ppm和Hz表示。HRMS高分辨质谱由美国Agilent公司Agilent-1260 UPLC-6500 Q-TOF MS型质谱仪测试,薄层色谱硅胶板购自黄海化学GF-254,硅胶柱层析为Greagent品牌800~1 000目硅胶。此外,本研究所使用的流动相比例均为体积比。

1 化学合成

1.1 *N*-苄基-1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-羧酰胺 (CL1) 的合成 以化合物**1**为原料合成中间体**2**和中间体**3**。取100 mL茄形烧瓶,将中间体**3**(200.00 mg, 1.06 mmol, 1.0 equiv)溶于无水DCM(10 mL)中,加入苄胺(135.00 mg, 1.26 mmol, 1.2 equiv),边搅拌边缓慢滴加TEA(5 mL)。常温下搅拌反应4 h,TLC点板监测(展开剂条件,DCM:MeOH = 100:2),反应完全。减压蒸馏除去有机溶剂DCM。用乙酸乙酯(20 mL)溶解烧瓶中的油状物质,加入50 mL水,萃取3~4次,合并有机相,用饱和食盐水洗涤有机相2次,向有机相中加入少量无水硫酸钠,干燥,过滤除去无水硫酸钠,收集滤液,减压蒸馏除去有机溶剂,得固体。使用干法上样,硅胶柱层析(正相),洗脱剂:DCM:MeOH = 100:0,极性逐步加大至DCM:MeOH = 100:2,洗脱液减压蒸馏,得到白色固体目标产物**CL1**(230 mg),产率为83.3%。¹H NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 9.28 (s, 1H), 8.49~8.40 (m, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.63 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.66

(d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 1.42~1.20 (m, 2H); ¹³C NMR(151 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 156.81, 141.93, 141.35, 138.30, 131.37, 129.17, 125.01, 121.14, 40.46, 35.26; HRMS(ESI, positive) Calcd. for C₁₂H₁₂N₄O₃ [M+H]⁺, 261.098 2; found, 261.097 7。

1.2 1-甲基-5-硝基-*N*-(吡啶-4-基甲基)-1*H*-咪唑-2-羧酰胺 (CL2) 的合成 目标化合物的合成方法参考化合物**CL1**,得白色固体(231 mg),产率为88.6%。¹H NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 9.63 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 8.20 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.25 (s, 3H); ¹³C NMR(151 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 158.70, 149.99, 148.28, 141.48, 141.22, 131.53, 122.64, 41.92, 35.08; HRMS(ESI, positive) Calcd. for C₁₁H₁₁N₅O₃ [M+H]⁺, 262.093 5; found, 262.090 9。

1.3 2-溴-*N*-[(1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-基)甲基]-5-硝基苯胺 (CL3) 的合成 目标化合物的合成方法参考化合物**CL1**,得淡黄色固体(271 mg),产率为87.6%。¹H NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 11.02 (s, 1H), 9.24 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.72 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 4.29 (s, 3H); ¹³C NMR(151 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{C} : 166.71, 157.95, 145.67, 143.65, 138.90, 134.94, 133.46, 131.65, 117.51, 35.27; HRMS(ESI, positive) Calcd. for C₁₀H₈N₆O₅ M⁺, 292.055 6; found, 292.058 0。

1.4 2-氟-*N*-[(1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-基)甲基]-5-硝基苯甲酰胺 (CL4) 的合成 以化合物**1**为原料合成中间体**5**。¹H NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 8.07 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.93 (s, 3H)。经中间体**5**合成中间体**6**。取100 mL茄形烧瓶,将中间体**6**(200.00 mg, 1.28 mmol, 1.0 equiv)溶于DMF(10 mL)中,加入2-氟-5-硝基苯甲酸(285.00 mg, 1.54 mmol, 1.2 equiv)、EDCI(294.00 mg, 1.28 mmol, 1.0 equiv)、HOBt(208.00 mg, 1.54 mmol, 1.2 equiv)和*N*-乙基二异丙胺(DIPEA, 662.00 mg, 5.12 mmol, 4.0 equiv),充分溶解后,于常温下搅拌4 h,TLC点板监测(展开剂条件,PE:EA = 1:1),反应完全。将反应液倒入50 mL水中,用乙酸乙酯(EA)萃取3或4次,合并有机相,用饱和食盐水洗涤有机相2次,向有机相中加入少量无水硫酸钠,干燥,过滤除去无水硫酸钠,收集滤液,减压蒸馏除去有机溶剂,得固体。使用干法上样,硅胶柱层析(正相),洗脱剂:PE:EA = 50:1,极性逐步加大至PE:EA = 50:50,洗脱液减压蒸馏,得到白色固体目标产物**CL4**(369 mg),产率为89.3%。¹H NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} : 9.28 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.47 (dd, *J* = 5.9, 3.0 Hz, 1H), 8.45~8.40 (m, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.63 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.67

(d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.94 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 162.46, 150.28, 144.27, 139.71, 132.52, 128.77 (d, $J_{\text{C-F}} = 11.0$ Hz), 126.39 (d, $J_{\text{C-F}} = 5.0$ Hz), 124.82 (d, $J_{\text{C-F}} = 16.9$ Hz), 118.68 (d, $J_{\text{C-F}} = 25.2$ Hz), 109.63, 36.92, 33.77; HRMS (ESI, positive) Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FN}_5\text{O}_5$ $[\text{M-H}]^-$, 322.059 3; found, 322.061 0.

1.5 2-溴-*N*-[(1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-基)甲基]-5-硝基苯胺 (CL5) 的合成 目标化合物的合成方法参考化合物 CL4, 得白色固体 (394 mg), 产率为 80.3%。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 9.60 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.78~7.70 (m, 1H), 7.61 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.0$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 163.28, 159.81, 150.35, 132.55, 130.41, 126.45, 126.19, 120.81, 115.20, 109.66, 37.03, 33.84; HRMS (ESI, positive) Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{O}_5$ $[\text{M+H}]^+$, 383.993 8; found, 383.994 8.

1.6 4-丁基-*N*-[(1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-基)甲基]苯胺 (CL6) 的合成 将中间体 5 (300.00 mg, 1.71 mmol, 1.0 equiv) 溶于 DMF (15 mL) 中, 加入 4-正戊基苯胺 (306.00 mg, 2.05 mmol, 1.2 equiv) 和 Cs_2CO_3 (1 672.00 mg, 5.13 mmol, 3.0 equiv), 在 85 °C 下反应过夜, TLC 点板监测, 反应结束后, 将反应液倒入 50 mL 水中, 用乙酸乙酯 (EA) 萃取 3 或 4 次, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤有机相 2 次, 向有机相中加入少量无水硫酸钠, 干燥, 过滤除去无水硫酸钠, 收集滤液, 减压蒸馏除去有机溶剂, 得固体。使用干法上样, 硅胶柱层析 (正相), 洗脱剂: PE:EA = 50:1, 极性逐步加大至 PE:EA = 70:30, 洗脱液减压蒸馏, 得到棕黄色固体目标产物 CL6 (99.4 mg), 产率为 20.2%。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 8.04 (s, 1H), 6.90 (d, $J = 14.2$ Hz, 2H), 6.62 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.02 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H), 2.40 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.48~1.42 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 151.96, 146.40, 139.64, 132.16, 130.80, 129.11, 112.95, 41.22, 34.44, 34.03, 33.64, 22.14, 14.24; HRMS (ESI, positive) Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M+H}]^+$, 289.165 9; found, 289.167 2.

1.7 *N*-[(1-甲基-5-硝基-1*H*-咪唑-2-基)甲基]-4-戊基苯胺 (CL7) 的合成 目标化合物的合成方法参考化合物 CL6, 得棕黄色固体 (96.8 mg), 产率为 18.7%。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 8.04 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.62 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 6.07~5.95 (m, 1H), 4.38 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 3H), 2.39 (t, $J =$

7.6 Hz, 2H), 1.47 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.25 (dt, $J = 22.4, 7.8$ Hz, 4H), 0.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ_{C} : 151.96, 146.40, 139.64, 132.16, 130.83, 129.11, 112.95, 41.22, 34.74, 33.64, 31.51, 31.32, 22.43, 14.39; HRMS (ESI, positive) Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M+H}]^+$, 303.181 6; found, 303.181 8.

2 体外抗 Fn 活性测试

目标化合物的体外抗 Fn 活性测试采用 CLSI 推荐的标准化肉汤稀释药敏试验法。

2.1 菌株活化 从 -80 °C 的冰箱取出装有 Fn 的冻存管, 吸出 0.5 mL 冻存液至 7 mL BHI 肉汤, 在无氧条件下培育 24 h 后, 混匀, 吸取 1 mL 再次放入至 6 mL 脑心浸液肉汤 (二次活化), 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。

2.2 MIC 测定 待菌达到指数生长期后, 将离心管放入离心机中, 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 旋转 5 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 6 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 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。将加好菌液的布氏肉汤导入装有 40 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 开始依次倍半稀释, 使其终质量浓度为 64~0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将 96 孔细胞培养板置于厌氧箱中并放入 37 °C 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 处的光密度值 (OD_{630}), 平行测定 3 次。取抑制率 $\geq 50\%$ 时所对应的浓度即为该化合物 MIC。最后两列仅含有布氏肉汤, 分别作为阴性对照和背景对照。

3 生长曲线实验

先将菌株活化, 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 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 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。将配好的菌液用 BHI 肉汤稀释至浓度为 1×10^6 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌液, 使每管离心管中 Fn 药物质量浓度分别为 2、1、0.5、0.25、0.125 和 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将离心管放入厌氧罐中, 在无氧条件下, 37 °C 孵育, 并于加药后 0、4、8、12、24、48 和 72 h 时每管离心管吸出 100 μL 混匀的菌液置于 96 孔板, 3 个复孔, 用多功能酶标仪测 OD_{630} , 记录。

4 细胞迁移 (transwell) 实验

HCT116 以 3×10^4 的密度在培养在含 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 (不加双抗), 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)。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 板的下室, 每孔 600 μ L, 同时设置每孔药物质量浓度分别为 2、1、0.5、0.25 和 0 μ g·mL⁻¹。将 HCT116 细胞混悬液培养于 24 孔 transwell 板的上室中。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, 用倒置荧光显微镜观察 (200 \times)。

5 生物膜抑制实验

先将菌株活化, 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 5 min, 弃上清, 加入 1 mL BHI 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 BHI 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) 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 μ L, 并同时加入不同质量浓度的化合物 CL6 (4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g·mL⁻¹) 于 Fn 中。在 37 $^{\circ}$ C 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 4% 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 μ L) 溶解生物膜, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后, 转移至新的 96 孔板, 最后, 用多功能酶标仪测量 570 nm 处的 OD 值, 定量生物膜的生物量。

6 扫描电镜及透射电镜实验

菌的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 离心管中加入 8 mL 浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹ 的菌液并加入 3.5 μ L CL6 (1.0、0.5 μ g·mL⁻¹) 37 $^{\circ}$ C 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 5 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。

7 统计学方法

对每组数据平行测试 3 次, 平均值 \pm 标准差表示, 使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件作图和分析, 通过单因素分析计算显著性差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

作者贡献: 陈玉平负责化合物合成及文章的撰写; 陈凤负责化合物波谱数据解析及体外活性实验; 通讯作者武善超

负责课题规划, 指导化合物的设计及论文的修改、校对。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Tefiku U, Popovska M, Cana A, et al. Determination of the role of *Fusobacterium nucleatum* in the pathogenesis in and out the mouth [J]. Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki), 2020, 41: 87-99.
- [2] Bui FQ, Almeida-Da-Silva CLC, Huynh B, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease [J]. Biomed J, 2019, 42: 27-35.
- [3] Yu T, Guo FF, Yu YN, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy [J]. Cell, 2017, 170: 548-563.
- [4] 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.
- [5] Qu RZ, Zhang Y, Ma YP, et al. Role of the gut microbiota and its metabolites in tumorigenesis or development of colorectal cancer [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10: e2205563.
- [6] Bao YJ, Tang JY, Qian Y, et al. Long noncoding RNA BFAL1 mediates enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-related carcinogenesis in colorectal cancer via the RHEB/mTOR pathway [J]. Cell Death Dis, 2019, 10: 675.
- [7] Jiang SS, Xie YL, Xiao XY, et al. *Fusobacterium nucleatum*-derived succinic acid induces tumor resistance to immunotherapy in colorectal cancer [J]. Cell Host Microbe, 2023, 31: 781-797.
- [8] Hui BQ, Zhou CC, Xu YT, et al. Exosomes secreted by *Fusobacterium nucleatum*-infected colon cancer cells transmit resistance to oxaliplatin and 5-FU by delivering hsa_circ_0004085 [J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22: 62.
- [9] Wang MJ, Li Y, Yang XF, et al. Effects of metronidazole on colorectal cancer occurrence and colorectal cancer liver metastases by regulating *Fusobacterium nucleatum* in mice [J]. Immun Inflamm Dis, 2023, 11: e1067.
- [10] Gao YH, Bi DX, Xie RT, et al. *Fusobacterium nucleatum* enhances the efficacy of PD-L1 blockade in colorectal cancer [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6: 398.
- [11] Zheng X, Gong T, Luo WY, et al. *Fusobacterium nucleatum* extracellular vesicles are enriched in colorectal cancer and facilitate bacterial adhesion [J]. Sci Adv, 2024, 10: eado0016.
- [12] Wang XL, Fang Y, Liang W, et al. *Fusobacterium nucleatum* facilitates anti-PD-1 therapy in microsatellite stable colorectal cancer [J]. Cancer Cell, 2024, 42: 1729-1746.
- [13] Tito RY, Verbandt S, Aguirre Vazquez M, et al. Microbiome confounders and quantitative profiling challenge predicted microbial targets in colorectal cancer development [J]. Nat Med, 2024, 30: 1339-1348.
- [14] Guo SH, Li LF, Xu BL, et al. A simple and novel fecal bio-

- marker for colorectal cancer: ratio of *Fusobacterium nucleatum* to probiotics populations, based on their antagonistic effect [J]. Clin Chem, 2018, 64: 1327-1337.
- [15] Chen WD, Zhang X, Zhang YP, et al. *Fusobacterium nucleatum* is a risk factor for metastatic colorectal cancer [J]. Curr Med Sci, 2022, 42: 538-547.
- [16] Rubinstein MR, Wang XW, Liu W, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin [J]. Cell Host Microbe, 2013, 14: 195-206.
- [17] Sepich-Poore GD, Zitvogel L, Straussman R, et al. The microbiome and human cancer [J]. Science, 2021, 371: eabc4552.
- [18] Boursi B, Haynes K, Mamtani R, et al. Impact of antibiotic exposure on the risk of colorectal cancer [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2015, 24: 534-542.
- [19] Dik VK, Van Oijen MG, Smeets HM, et al. Frequent use of antibiotics is associated with colorectal cancer risk: results of a nested case-control study [J]. Dig Dis Sci, 2016, 61: 255-264.
- [20] Aneke-Nash C, Yoon G, Du MM, et al. Antibiotic use and colorectal neoplasia: a systematic review and meta-analysis [J]. BMJ Open Gastroenterol, 2021, 8: e000601.
- [21] Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E, et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer [J]. Science, 2017, 358: 1443-1448.
- [22] Su SJ, Bu QW, Bai XX, et al. Discovery of potent natural product higenamine derivatives as novel anti-*Fusobacterium nucleatum* agents [J]. Bioorg Chem, 2023, 138: 106586.
- [23] Pan ZZ, Zhou CC, Bai XX, et al. Discovery of new *Fusobacterium nucleatum* inhibitors to attenuate migratory capability of colon cancer cells by the drug repositioning strategy [J]. J Med Chem, 2023, 66: 15699-15714.
- [24] Yang HX, Cui AL, Wang YJ, et al. Synthesis and antibacterial activity evaluation of octapeptin derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 152-160.
- [25] Deng ZB, Mu JY, Tseng M, et al. Corrigendum: enterobacteria-secreted particles induce production of exosome-like S1P-containing particles by intestinal epithelium to drive Th17-mediated tumorigenesis [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11348.
- [26] Narunsky-Haziza L, Sepich-Poore GD, Livyatan I, et al. Pan-cancer analyses reveal cancer-type-specific fungal ecologies and bacteriome interactions [J]. Cell, 2022, 185: 3789-3806.
- [27] Zhang JY, Yao JM, Ma CY, et al. Magnolol from *Magnolia officinalis* inhibits neoplastic growth of *Ellipsospora* by damaging the cell membrane [J]. Sci Rep, 2024, 14: 24934.
- [28] Zheng SL, Zhong Q, Jiang Q, et al. Discovery of a series of thiazole derivatives as novel inhibitors of metastatic cancer cell migration and invasion [J]. ACS Med Chem Lett, 2013, 4: 191-196.
- [29] Ou SW, Wang HF, Tao YB, et al. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: from phenomenon to mechanism [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1020583.
- [30] Vestby LK, Grønseth T, Simm R, et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease [J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9: 59.
- [31] Sønderholm M, Kragh KN, Koren K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* aggregate formation in an alginate bead model system exhibits *in vivo*-like characteristics [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83: e00113-17.
- [32] Choi E, Murray B, Choi S. Biofilm and cancer: interactions and future directions for cancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 12836.
- [33] Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression [J]. Cancer Res, 2019, 79: 4557-4566.
- [34] Aiyer KS, Vijayakumar BS. An improvised microtiter dish biofilm assay for non-invasive biofilm detection on microbial fuel cell anodes and studying biofilm growth conditions [J]. Braz J Microbiol, 2019, 50: 769-775.
- [35] Zepeda-Rivera M, Minot SS, Bouzek H, et al. A distinct *Fusobacterium nucleatum* clade dominates the colorectal cancer niche [J]. Nature, 2024, 628: 424-432.
- [36] Feng DT, Zhu LX, Yang SJ, et al. Design, synthesis and relational biological researches of novel acetyl-contained sulfanilamide tertiary amine thiolazole compounds and sulfanilamide tertiary amine aminoazole compounds [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 3315-3324.
- [37] Liu CM, Zheng YX, Yu JS, et al. A new model for screening active ingredients in traditional Chinese medicine based on the interactions between gut microorganisms and G protein-coupled receptor [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 3042-3056.