

• 医药生物技术 •

基于分子对接筛选并探究中药活性单体对大肠埃希菌生物被膜的作用

杨灿¹, 冉蕾¹, 杨灼¹, 胡惠铭¹, 魏薇^{1,4}, 杨洪早^{1,3,4}, 朱买勋^{2,3},
余远迪^{2,3}, 付利芝^{2,3*}, 陈红伟^{1,3,4*}

1 西南大学 动物医学院, 重庆 402460

2 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460

3 国家生猪技术创新中心, 重庆 402460

4 西南大学 中兽医研究所, 重庆 402460

杨灿, 冉蕾, 杨灼, 胡惠铭, 魏薇, 杨洪早, 朱买勋, 余远迪, 付利芝, 陈红伟. 基于分子对接筛选并探究中药活性单体对大肠埃希菌生物被膜的作用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4120-4137.

YANG Can, RAN Lei, YANG Zhuo, HU Huiming, WEI Wei, YANG Hongzao, ZHU Maixun, YU Yuandi, FU Lizhi, CHEN Hongwei. Screening of active components in Chinese medicine with effects on *Escherichia coli* biofilm based on molecular docking[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4120-4137.

摘要: 为了快速准确筛选出抗大肠埃希菌生物被膜的中药活性单体, 本研究以大肠埃希菌关键成膜基因 *csgD* 为靶点, 采用分子对接、分子动力学模拟等方法从中药系统药理学数据库和分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 中筛选抗大肠埃希菌生物被膜的中药活性单体, 经体外试验验证抗生物被膜作用后, 采用数据独立采集 (data-independent acquisition, DIA) 蛋白质组学分析筛选到的单体干预大肠埃希菌生物被膜的差异蛋白, 并结合表型验证探究其作用机制。通过虚拟筛选获得单宁酸、芸香柚皮苷、丹参酚酸 B、迷迭香素 4 种候选中药活性单体, 经验证单宁酸具有明显的抑制大肠埃希菌生物被膜形成的作用。差异蛋白和相关表型验证结果表明, 单宁酸主要通过干预大肠埃希菌的菌毛组装、琥珀酸代谢以及群体感应 (quorum sensing, QS) 系统等影响大肠埃希菌生物被膜形成。本研究为开发防治生物被

资助项目: 重庆市硕士研究生科研创新项目 (CYS22247); 国家生猪技术创新中心先导科技项目 (NCTIP-XD/B12); 国家自然科学基金 (32102684); 重庆市技术创新与应用发展专项面上项目 (CSTB2023TIAD-LDX0006); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目 (202310635087); 山东省科学技术厅鲁渝科技协作项目 (2022LYXZ030); 云南省科技厅科技计划 (202403AC100013)

This work was supported by the Chongqing Postgraduate Scientific Research Innovation Project (CYS22247), the Science and Technology Project of National Center of Technology Innovation for Pigs (NCTIP-XD/B12), the National Natural Science Foundation of China (32102684), the Chongqing Technical Innovation and Application Development Special General Project (CSTB2023TIAD-LDX0006), the National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (202310635087), the Project of Shandong Province on the Transformation of Scientific and Technological Achievements (2022LYXZ030), and the Science and Technology Project of Yunnan Provincial Department of Science and Technology (202403AC100013).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Hongwei, dyxchw@swu.edu.cn; FU Lizhi, fulz@cqaa.cn

Received: 2024-02-14; Accepted: 2024-06-07; Published online: 2024-06-11

膜相关感染的新型药物提供了一种候选先导化合物。

关键词：分子对接；生物被膜；单宁酸；大肠埃希菌；蛋白质组学

Screening of active components in Chinese medicine with effects on *Escherichia coli* biofilm based on molecular docking

YANG Can¹, RAN Lei¹, YANG Zhuo¹, HU Huiming¹, WEI Wei^{1,4}, YANG Hongzao^{1,3,4}, ZHU Maixun^{2,3}, YU Yuandi^{2,3}, FU Lizhi^{2,3*}, CHEN Hongwei^{1,3,4*}

1 College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

2 Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China

3 National Center of Technology Innovation for Pigs, Chongqing 402460, China

4 Institute of Chinese Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

Abstract: By targeting the key gene *csuD* involved in the biofilm formation of *Escherichia coli*, we employed molecular docking and molecular dynamics simulation to screen the active components of Chinese medicine with inhibitory effects on the biofilm formation from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). After the anti-biofilm properties of the active components were validated *in vitro*, data-independent acquisition (DIA) proteomics was employed to further identify the differential proteins involved in interfering with the biofilm formation of *Escherichia coli*. The mechanisms of inhibition were explored with consideration to the phenotype. Through virtual screening, we identified four candidate active components, including tannic acid, narirutin, salvianolic acid B, and rosmarinic acid. Among them, tannic acid demonstrated significant inhibitory effect on the biofilm formation of *E. coli*. The analysis of differential proteins, combined with relevant phenotype validation, suggested that tannic acid primarily affected *E. coli* by intervening in pilus assembly, succinic acid metabolism, and the quorum sensing system. This study provided a lead compound for the development of new drugs against biofilm-associated infections in the future.

Keywords: molecular docking; biofilm; tannin acid; *Escherichia coli*; proteomics

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)是临床微生物实验室中最常见的分离株之一，大致可分为共生菌株、肠道致病性菌株和肠外致病性菌株^[1]。其中肠外致病性大肠埃希菌(extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC)会在肠道外其他组织脏器定殖形成生物被膜(biofilm, BF)并导致感染，主要可引起尿路感染以及呼吸道感染等多种疾病^[2]。细菌生物被膜是指细菌由其自身产生的胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)包裹并黏

附在生物或非生物表面所形成的高度结构化的功能实体^[3]。生物被膜由于其屏障作用以及分解抗生素的酶的产生，导致抗生素难以渗入细菌内部发挥作用，使得其天然对一些抗生素具有抗性，有报道称生物被膜菌耐药性比浮游菌强 10–1 000 倍^[4]。目前 ExPEC 生物被膜造成的感染日益加剧，对动物健康造成威胁，给养殖业带来巨大经济损失，逐渐被公众所重视^[5-6]。因此，在研究细菌生物被膜调控机制的基础

上, 寻找绿色、高效的生物被膜抑制剂或清除剂, 对防治细菌生物被膜相关感染具有重要意义。生物被膜的形成是一个十分复杂的调控过程, 涉及许多基因的转录调控, 其中 *csgD* 是 *E. coli* 生物被膜形成的主要调控因子, 它能够激活卷曲菌毛 *csgBAC* 的转录, 调控 EPS 的生成, 并促进生物被膜的形成^[7-8]。因此, 本研究将 *csgD* 作为后续虚拟筛选的靶标基因。

中药提取物及其活性成分具有抗细菌生物被膜感染的能力, 加之其毒副作用相对较小, 不易产生耐药性^[9]。因此从中药或天然药物中筛选活性成分成为防治细菌生物被膜相关感染的有效策略^[10]。但是, 面对浩瀚的中药资源宝库, 如何准确快速筛选到有效活性单体是亟待探索和解决的关键问题。目前, 计算机虚拟筛选方法被逐渐应用于筛选防治细菌生物被膜相关感染的候选药物^[11]。Fericola 等^[12]采用 Molegro Virtual Docker、Autodock 等分子对接工具从 9 418 种化合物中筛选出具有潜在抑制二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGC) PleD 小分子活性的 7 种化合物。Sambanthamoorthy 等^[13]利用计算机虚拟筛选对约 66 000 种化合物和天然产物提取物进行筛选, 获得 7 种 DGC 抑制剂, 可抑制霍乱弧菌生物被膜的形成。通过计算机虚拟筛选技术进行筛选, 可有效提高筛选效率, 大大降低试验成本, 对于开发新型抗菌药物具有重要意义。

本研究针对临床中最常见的大肠埃希菌生物被膜相关感染, 以大肠埃希菌生物被膜关键蛋白 CsgD 为靶点, 通过计算机虚拟筛选技术获得候选中药活性单体。经体外试验验证中药活性单体抗生物被膜作用后, 采用蛋白质组学技术结合表型验证探究活性单体的抗生物被膜作用机制, 以期开发防治生物被膜相关感染的新型药物奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和试剂

所用菌株为本实验室保存的一株强成膜能力的猪源肠外大肠埃希菌 *Ec144*; 单宁酸、芸香柚皮苷、丹参酚酸 B、迷迭香素等主要试剂均购自麦克林上海科技有限公司。

1.2 虚拟筛选

首先获得受体蛋白和中药单体小分子的三维结构, 接着对三维结构进行预处理, 然后进行分子对接。根据对接结果选出对接良好的构象进行进一步的动力学模拟, 验证结合稳定性。最后根据 TCMSP 提供的信息获得候选中药活性单体进行体外试验, 验证其抗生物被膜作用。

1.2.1 受体蛋白 CsgD 三维结构的预处理

从 Uniprot (<https://www.uniprot.org>)获得大肠埃希菌 CsgD 蛋白的三维模型(UniProt 数据库登录号: P52106), 使用 AutoDock Tools 1.5.6 对该蛋白模型进行结构预处理并转换为 pdbqt 格式输出备用。

1.2.2 中药分子化学结构的预处理

从 TCMSP 获得 13 000 多个中药单体小分子的三维结构。使用 Openbabel 3.1.1 对小分子进行预处理, 包括氢化、设置可旋转键和格式转换。

1.2.3 分子对接

采用盲对接方法, 利用整个蛋白作为潜在的结合位点, 采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行半柔性对接, 对接结果按对接结合能进行排序。综合选择 4 个蛋白配体复合物, 用 PyMOL 2.3.0 和 LigPlot⁺ v.2.2 可视化构象并分析相互作用, 选择每个蛋白配体复合物的最佳构象进行进一步研究。

1.3 分子动力学模拟

使用 GROMACS 2020.3 软件包进行分子动力学模拟(molecular dynamics, MD)验证蛋白配

体复合物的结合稳定性。选择复合物最佳构象作为 MD 研究的初始构象, 采用 charmm36 力场, 模拟时间为 50 ns。均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)表示复合物体系在模拟过程中的变化程度, 可以反映复合物的运动过程, 是判断并预测模拟体系是否能够稳定存在的重要指标。

1.4 MMPBSA 结合自由能计算

采用分子力学/泊松-玻尔兹曼表面积法(molecular mechanics/poisson boltzmann surface area, MM/PBSA)计算蛋白配体复合物之间分子相互作用的结合自由能, 该方法将结合自由能拆分成分子力学项和溶剂化能^[14]。采用 GROMACS 软件的 G_MMPBSA 模块进行 MM/PBSA 分析, 评估动力学模拟过程中最后 10 ns 的数据。分别计算受体、配体以及它们的复合物各自在溶液中的能量, 然后计算差值。

结合自由能(ΔG_{bind})是通过计算复合物能量与受体和配体能量之差来确定的。式(2)中的每一项都可以通过式(1)来计算。在式(2)中, E_{MM} 是系统的内能, T 是温度, S 是系统的熵, G_{sol} 是溶剂化能, 通常分为极性溶剂化能和非极性溶剂化能, 如式(4)中所示。极性溶剂化能由泊松-玻尔兹曼(poisson-boltzmann, PB)模型计算; 非极性溶剂化能通过计算溶剂的可达表面积获得。系统的内能(ΔE_{MM})由式(3)获得, 其中包括键能(ΔE_{int})、静电相互作用(ΔE_{ele})和体系中的范德华相互作用(ΔE_{vdw})^[15]。

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - G_{protein} - G_{ligand} \quad (1)$$

$$G = E_{MM} - G_{sol} - TS \quad (2)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{int} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw} \quad (3)$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SASA} \quad (4)$$

1.5 体外验证候选中药活性单体对 *Ec144* 生物被膜形成的影响

1.5.1 最小抑菌浓度的测定

筛选出的候选单体(单宁酸、芸香柚皮

苷、丹参酚酸 B 和迷迭香素), 参照肉汤微量二倍稀释法^[16]测定其最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。挑取 *Ec144* 单菌落用水解酪蛋白胨肉汤(mueller hinton broth, MH)肉汤培养至对数期, 1:1 000 稀释后备用。首先在 96 孔板中最后一列加入 80 μL MH 肉汤作为阴性对照, 其余 11 列均加入 40 μL 肉汤。接着在第 1 列中再加入 40 μL 工作菌液作为阳性对照。然后在第 2 列中依次加入等量的候选药物, 吹打混匀后取 40 μL 加入第 3 列中, 依次倍比稀释至第 11 列, 第 11 列含有药物和肉汤共 80 μL 作为药物阴性对照。最后在第 2 列到第 10 列铺上 40 μL 稀释后的工作菌液。候选单体最终浓度依次为 2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置培养 18 h, 阳性对照孔内细菌明显生长, 阴性对照孔澄清透明无明显菌落, 在第 2-10 列中明显无菌落生长呈清亮状态的单体浓度为该组 MIC 值。

1.5.2 生物被膜量测定

构建体外生物被膜, 利用结晶紫染色法定量分析 4 种候选中药活性单体对 *Ec144* 生物被膜形成的影响。首先在 96 孔板中构建候选中药活性单体与 *Ec144* 共培养的生物被膜, 将 96 孔板周围设置为边缘对照孔, 加入 100 μL MH 肉汤, 其余孔加入 50 μL MH 肉汤。然后在第 2 列加入 50 μL 工作菌液为菌液阳性对照孔, 第 3 列开始加入等量的药液, 混匀后取 50 μL 至下一孔, 依次稀释至倒数第 2 列混匀后弃去 50 μL 混合液。最后在除边缘孔和阳性对照孔外的其余孔中加入 50 μL 工作菌液。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置培养 24 h 后取出, 丢弃上清液, 用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)清洗 3 次, 再用 0.04% 结晶紫溶液染色 20 min, 然后用无菌 PBS 洗涤 3 次, 最后用 33% 乙酸溶解结

晶紫, 在 OD_{600} 处测吸光度。选定效果最好的活性单体进行进一步研究。

1.5.3 生物被膜活菌数测定

本研究构建单宁酸(tannic acid, TA)干预 *Ec144* 生物被膜的方法参照 1.5.2 中的建膜方法。取出培养 24 h 的 96 孔板, 弃去上清, 用无菌 PBS 轻柔洗涤 3 次, 之后加入 100 μL Triton-100X 溶液, 溶解后吹打混匀吸取 20 μL 至一个新的铺满 180 μL 无菌 PBS 溶液的 96 孔板的第 1 列中, 充分混匀之后再取 20 μL 至下一列, 依次稀释。最后取 5 个梯度浓度的混合液各 20 μL 滴到之前准备的琼脂平板上, 各浓度梯度的菌液均匀散开。平板正置数分钟, 待平板晾干后移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱倒置培养 12 h, 计数菌落。

1.6 共聚焦激光扫描显微镜分析(confocal laser scanning microscope, CLSM)

参考本课题组已报道的方法^[17], 使用 Lab-TekTMII 培养体外生物被膜, 阳性对照组每孔加入 250 μL 的 MH 肉汤和 250 μL 的工作菌液; TA 组每孔加入 250 μL MH 肉汤稀释的 TA 和 250 μL 工作菌液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h。然后用 0.9% (质量体积比) NaCl 清洗生物被膜 3 次, 在黑暗环境中每孔加入 100 μL FlimTracerTM LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit 荧光染料, 室温避光静置 20 min。之后弃去上层多余染料, 再用无菌水轻柔洗去多余染料, 在 Nikon Eclipse Ti2 共聚焦激光显微镜 20 倍镜下观察生物被膜, 并进行 Z-stack, 每组至少选取 3 次独立重复试验的 9 个随机视野, 图像导出处理采用 NIS Viewer v5.21.00 软件处理。生物被膜相关试验参数均采用开源软件 Biofilm Q 进行分析处理^[18]。

1.7 蛋白质组学分析

按照 1.5.2 中的方法构建 TA 与 *Ec144* 共培养的生物被膜, 用等量 PBS 溶液清洗 2 次后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 刮取收集生物被膜样品。然后用液氮将样

品迅速冷冻随后保存在 -80°C 冰箱。收集 3 个完全独立的生物样品, 委托北京奥维森基因科技有限公司进行蛋白质提取和液相色谱-质谱分析, 采用数据独立采集蛋白质组学分析技术。

1.7.1 差异表达蛋白分析

为了分析对照组和 TA 组之间的差异表达蛋白, 将蛋白质以表达差异倍数(fold change, FC)和 P -value (t -test)两个因素为标准绘制火山图, 其中显著下调的蛋白质($\text{FC}<0.67$ 且 $P<0.05$)用三角形斑点表示, 显著上调的蛋白质($\text{FC}>1.5$ 且 $P<0.05$)用圆形斑点表示, 无差异的蛋白质用正方形斑点表示。

1.7.2 单宁酸对 *Ec144 rdar* 形态的影响

蛋白质组学结果提示 TA 可能影响 *Ec144* 的细菌形态, 故开展相关表型验证。配制新鲜的含有刚果红(50 mg/mL)和考马斯亮蓝(30 mg/mL)的培养基, 高温灭菌。待冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右时, 试验组加入 TA, 终浓度为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对照组加入等量无菌水, 混匀后制备平板。冷却凝固后, 取 5 μL *Ec144* 工作菌液滴于平板中央, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后拍照观察^[19]。

1.7.3 单宁酸对 *Ec144* 运动性的影响

蛋白质组学结果提示 TA 可能影响 *Ec144* 的运动性, 故开展相关表型验证。配置新鲜的运动性平板。Swimming 运动琼脂 100 mL: 1 g 胰蛋白胨, 0.5 g 酵母提取物, 0.5 g NaCl, 0.3 g 细菌琼脂粉; Twitching 运动琼脂 100 mL: 1 g 胰蛋白胨, 0.5 g 酵母提取物, 0.5 g NaCl, 1 g 细菌琼脂粉。高压灭菌后冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 试验组加入 TA, 终浓度为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对照组加入等量无菌水, 充分混匀后制备平板。待冷却凝固后, 取 2 μL *Ec144* 工作菌液滴于平板中间, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中正置培养 48 h, 观察并记录菌落生长情况^[20]。

1.7.4 琥珀酸对 *Ec144* 生物被膜形成的影响

蛋白质组学结果提示 TA 可能影响 *Ec144*

的琥珀酸代谢通路, 故开展相关表型验证。按 1.5.2 中的方法构建琥珀酸与 *Ec144* 共培养的生物被膜, 并用结晶紫染色法测定生物被膜量。琥珀酸浓度依次为 40、20、10、5、2.5、1.25 mmol/L。

1.8 统计学分析

试验数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件包处理, 并使用 *t* 检验分析对照组和试验组之间的差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

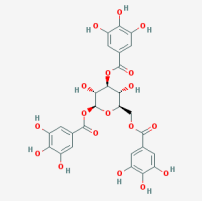
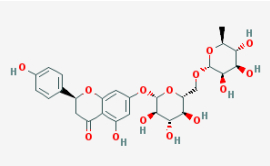
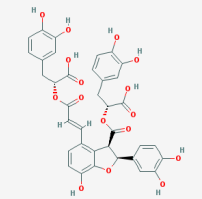
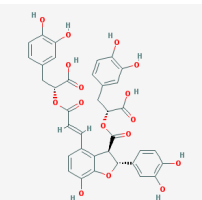
2.1 分子对接结果

使用 AutoDock Vina 将约 13 000 个配体与 CsgD 进行对接, 结果显示 MOL009133、

MOL013336、MOL007074 和 MOL008885 与 CsgD 对接结合能分别是 -10.5、-10.2、-9.7、-9.6 kcal/mol (表 1)。使用 PyMOL 和 LigPlot 对 4 种复合物进行可视化作图分析其相互作用力 (图 1)。共有 4 组图, 从左至右分别是小分子与靶标蛋白对接的三维全局展示图、三维局部展示图以及二维相互作用展示图。三维展示图中绿色和红色棍状物为候选单体小分子, 外部的白色包裹物为靶标蛋白 CsgD, 黄色虚线为小分子与靶标蛋白氨基酸残基形成的氢键。在二维展示图中, 蓝紫色实线所连接的短链代表候选单体小分子, 棕色实线连接的短链代表与小分子形成氢键的蛋白氨基酸残基, 绿色虚线是小分子与蛋白氨基酸残基形成的氢键, 睫毛状

表 1 四种配体小分子与 CsgD 进行对接后的结果

Table 1 The results of four ligands docking with CsgD

Molecule ID	Molecule structures	Names	CAS number	Binding affinity (kcal/mol)
MOL009133		Tannic acid	5424-20-4	-10.5
MOL013336		Narirutin	14259-46-2	-10.2
MOL007074		Salvianolic acid B	115939-25-8	-9.7
MOL008885		Rosemarinic acid	537-15-5	-9.6

CAS: Chemical Abstracts Service.

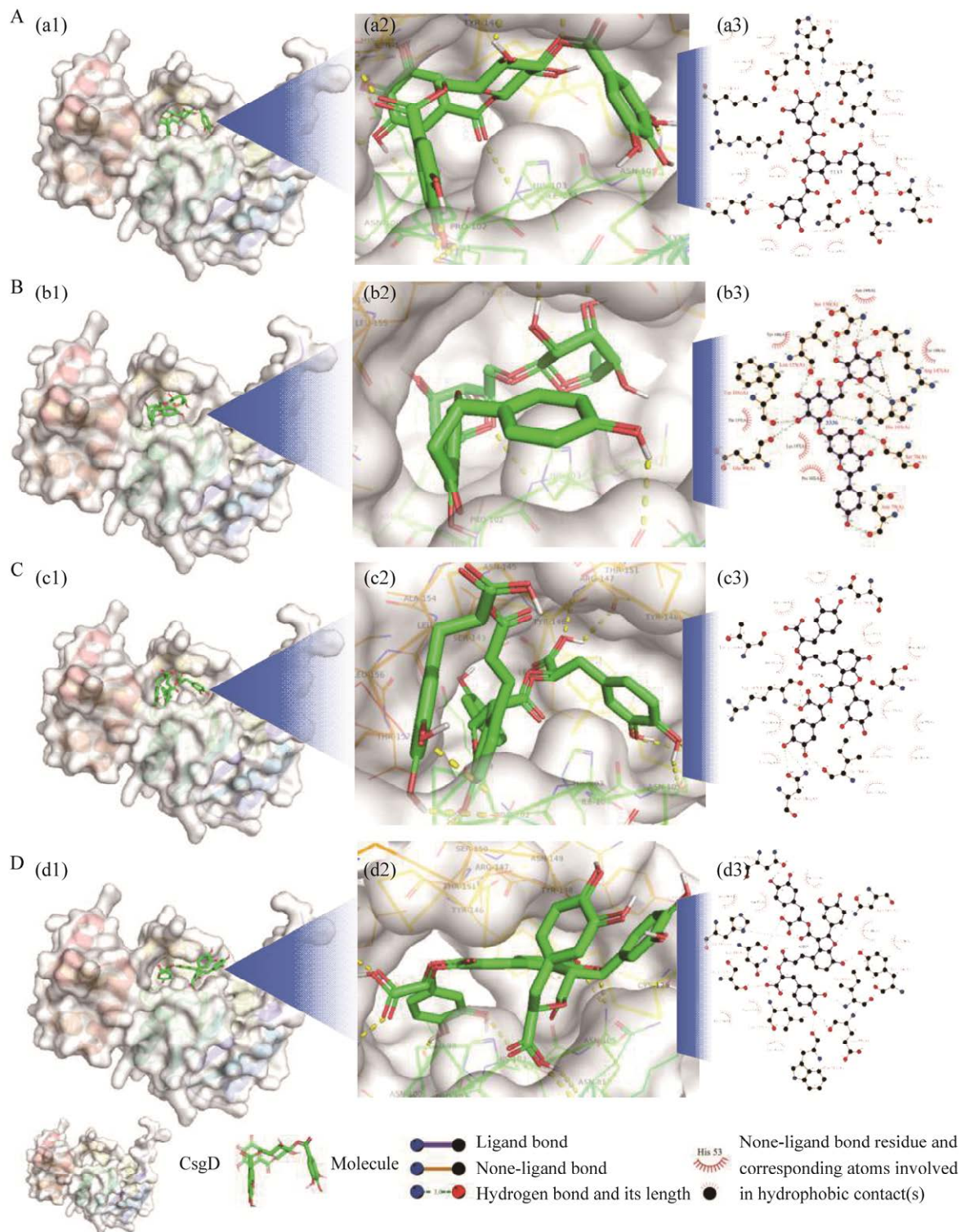


图1 四种配体分子和CsgD对接的最佳构象的三维和二维分子相互作用图 A: MOL009133和CsgD.

B: MOL01336和CsgD. C: MOL007074和CsgD. D: MOL008885和CsgD

Figure 1 The 3D and 2D molecular interaction diagrams of the best conformation of four ligand molecules and CsgD. A: MOL009133-CsgD. B: MOL01336-CsgD. C: MOL007074-CsgD. D: MOL008885-CsgD.

的残基代表的与小分子形成疏水作用的氨基酸残基。图中可见这些单体都结合在靶标蛋白的同一个活性口袋中(图 1), 不同单体和蛋白之间存在氢键、疏水相互作用等。MOL009133 与 CsgD 的 Lys161、Arg147、Asn105、Ser150、Ser76、Asn79、Leu155、His158 和 Glu99 形成了氢键; MOL013336 与 CsgD 的 Ser76、Asn79、Glu99、Trp101、His103、Arg147、Ser150 和 Leu155 形成了氢键; MOL007074 与 CsgD 的 Ser76、Asn79、Ile104、Asn105、Arg147 和 Thr151 形成了氢键; MOL008885 与 CsgD 的 Asn80、Glu99、Trp101、His103、Ile104、Asn105、Try146、Asn149、Ser153 和 Leu155 形成了氢键。进一步分析发现, 4 种配体分子与蛋白活性部位的部分氨基酸具有强疏水作用(图 1)。

2.2 分子动力学模拟结果

对 4 种蛋白配体复合物进行 50 ns 的分子动力学模拟, 分析模拟轨迹可得 4 种复合物的 RMSD (图 2)。图中红色实线表示靶标蛋白 CsgD 的 RMSD, 蓝色实线表示对应配体小分子。RMSD 结果显示 CsgD 和 MOL009133 整个系统存在轻微波动, RMSD 保持在 0.25 nm 左右(图 2A), 表明系统已经稳定。其他 3 个系统整体波动较大, 在模拟后期才逐渐平稳。4 种复合物体系中 MOL009133 和 CsgD 的结合是最稳定的。

2.3 MM/PBSA

四种复合物体系 MM/PBSA 计算结果中的 Δ TOTAL 值越小, 则认为该蛋白配体复合物更稳定。小分子 MOL009133 和 CsgD 形成的复合物体系中配体与蛋白的结合自由能为 -51.5 kcal/mol, 低于其他 3 种体系的结合自由能(表 2), 表明该

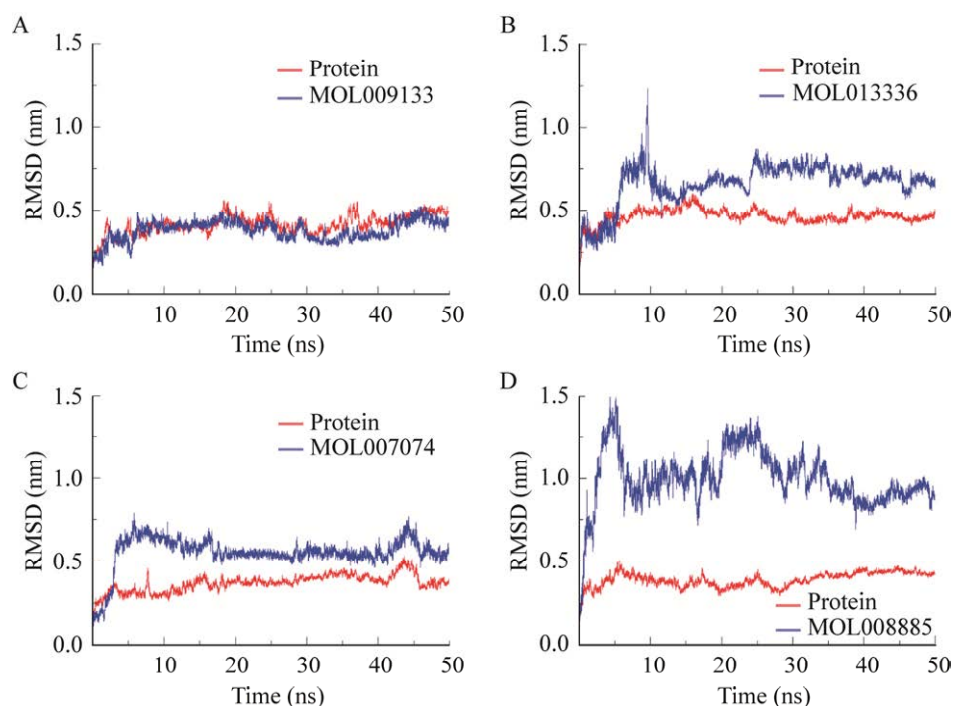


图 2 四种配体分子与 CsgD 形成的复合物在 50 ns MD 模拟时的 RMSD (nm) A: MOL009133 和 CsgD. B: MOL013336 和 CsgD. C: MOL007074 和 CsgD. D: MOL008885 和 CsgD

Figure 2 RMSD (nm) of complexes formed by four ligands and CsgD in 50 ns MD simulation. A: MOL009133-CsgD. B: MOL013336-CsgD. C: MOL007074-CsgD. D: MOL008885-CsgD.

表 2 结合自由能及其能量组成(kal/mol)

Table 2 Binding free energy and its energy composition (kal/mol)

Energy Component (kal/mol)	MOL009133	MOL013336	MOL007074	MOL008885
Δ EVDW	-50.72	-52.38	-56.61	-52.87
Δ EEL	-70.11	-42.45	-64.36	-73.74
Δ EGB	77.70	69.39	89.80	90.96
Δ ESURF	-8.40	-7.70	-8.28	-8.91
Δ GGAS	-120.83	-94.83	-120.97	-126.61
Δ GSOLV	69.30	61.69	81.52	82.05
Δ TOTAL	-51.53	-33.14	-39.45	-44.56

Δ EVDW: Van Der Waals energy; Δ EEL: Electrostatic energy; Δ EGB: Electrostatic contribution free energy calculated by Generalized Born; Δ ESURF: Nonpolar contribution to the solvation free energy; Δ GGAS: Estimated binding free energy phase gas; Δ GSOLV: Estimates binding free energy solvent; Δ TOTAL: Estimated binding free energy.

体系结合更稳定。

2.4 候选中药活性单体对 *Ec144* 的 MIC 值

四种候选中药活性单体完全抑制 *Ec144* 生长的浓度为 MIC (表 3)。后续的试验中, 单体浓度均选择小于其 MIC 的值。根据 MIC 结果确定后续试验中单宁酸、柚皮苷、丹参酚酸 B 和迷迭香素的浓度分别为 512、2 048、2 048、2 048 μ g/mL。

2.5 候选中药活性单体对 *Ec144* 生物被膜形成的影响

通过结晶紫染色法测定 4 种候选中药活性单体对 *Ec144* 生物被膜量的影响(图 3)。其中 TA 的抑制效果最佳, 在其亚抑菌浓度 512、256、128、64 μ g/mL 时均表现出对 *Ec144* 生物被膜的抑制作用。在其浓度为 128 μ g/mL 时抑制率可达 80% (图 3A)。其余 3 种单体对 *Ec144* 生物被膜的抑制效果较弱(图 3)。综上, 选择 TA 做进一步的验证, 并将 TA 的浓度范围扩大。

表 3 四种候选中药活性单体的 MIC 值

Table 3 Mic of four candidate active monomers

Candidate TCM monomers	MIC (μ g/mL)
Tanin acid	1 024
Narirutin	>2 048
Salvianolic acid B	>2 048
Rosemarinic acid	>2 048

2.6 单宁酸对 *Ec144* 生物被膜形成的影响

TA 在亚抑菌浓度 512、256、128、64、32、16 μ g/mL 时生物被膜抑制率可达 85%、88%、90%、84%、64%、32% (图 4A)。同时, 生物被膜活菌计数结果显示, TA 显著减少 *Ec144* 生物被膜活菌数(图 4B), 在其浓度为 128 μ g/mL 时, 生物被膜内活菌数减少 1.05 个 lg (CFU/mL)。综上, TA 对 *Ec144* 生物被膜具有明显的抑制作用, 并呈现非典型的剂量依赖性, 选择 128 μ g/mL 这一浓度开展后续研究。

2.7 激光共聚焦扫描显微镜结果

通过激光共聚焦扫描显微镜观察对照组和 TA (128 μ g/mL) 组生物被膜的变化。采用 BiofilmQ 分析生物被膜数量、体积以及荧光强度等。结果表明, TA 组的生物被膜数量明显减少且稀疏(图 5)。与对照组相比, TA 组生物被膜数量和体积分别减少了 53.3% (图 5E) 和 87.0% (图 5G)。TA 组生物被膜基底面积无明显差异(图 5F)。TA 组生物被膜单位体积荧光强度变化如下: SYTO9 (染色为绿色, 代表活菌) 单位体积荧光强度增加了 55.3%, 可能是由于体积显著减少造成的; PI (染色为红色, 代表死菌) 单位体积荧光强度减少了 11.8% (图 5H)。TA 组生物被膜单位面积荧光强度变化如下: SYTO9

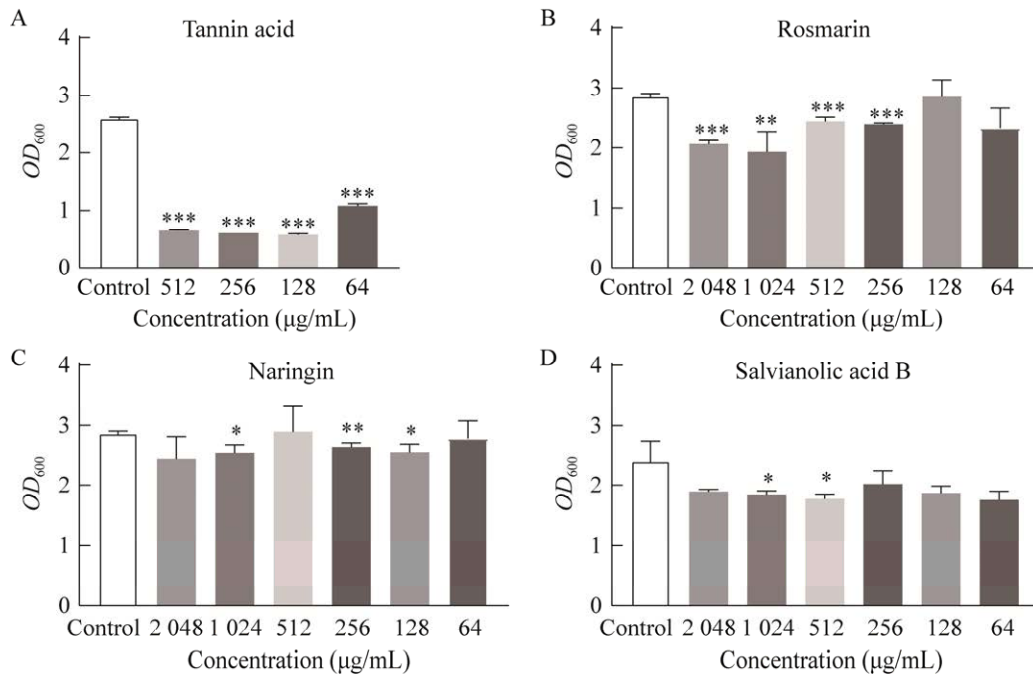


图3 四种候选中药活性单体对 *Ec144* 生物被膜形成的影响

Figure 3 Effects of four candidate active monomers on biofilm formation of *Ec144*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

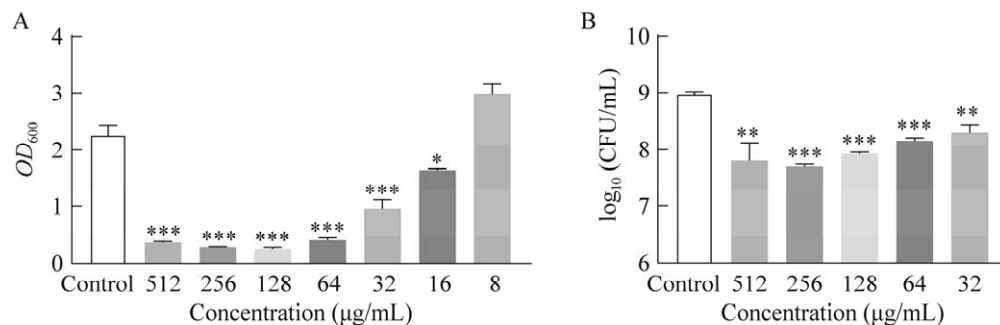


图4 TA对 *Ec144* 生物被膜形成的影响 A: 生物被膜量测定. B: 生物被膜活菌数测定

Figure 4 Effect of TA on the formation of *Ec144* biofilm. A: Biofilm measurement. B: Biofilm viable bacteria count measurement. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

单位面积荧光强度减少了 78.7%，PI 单位面积荧光强度减少了 85.8% (图 5I)。

2.8 蛋白质组学结果分析

DIA 质谱分析共鉴定出差异蛋白 3 251 种，共发现 1 005 个差异显著的蛋白，以差异表达倍数和 P -value 为坐标绘制了火山图。图中上调蛋白质用圆形斑点表示，共 418 个；下调蛋白质用三角形斑点表示，共 587 个；正方形斑

点为无显著差异蛋白(图 6)。从 1 005 个差异显著的蛋白质中梳理出了与生物被膜形成相关的蛋白质，并将其分成 curli 菌毛组装、群体感应系统、琥珀酸代谢等类别(表 4 和图 7)。

2.9 细菌 rdar 形态的变化

蛋白质组学结果显示，与菌毛组装相关的蛋白 CsgA、CsgE、CsgF、CsgG 发生了显著变化，而细菌 rdar (red、dry and rough)形态与菌

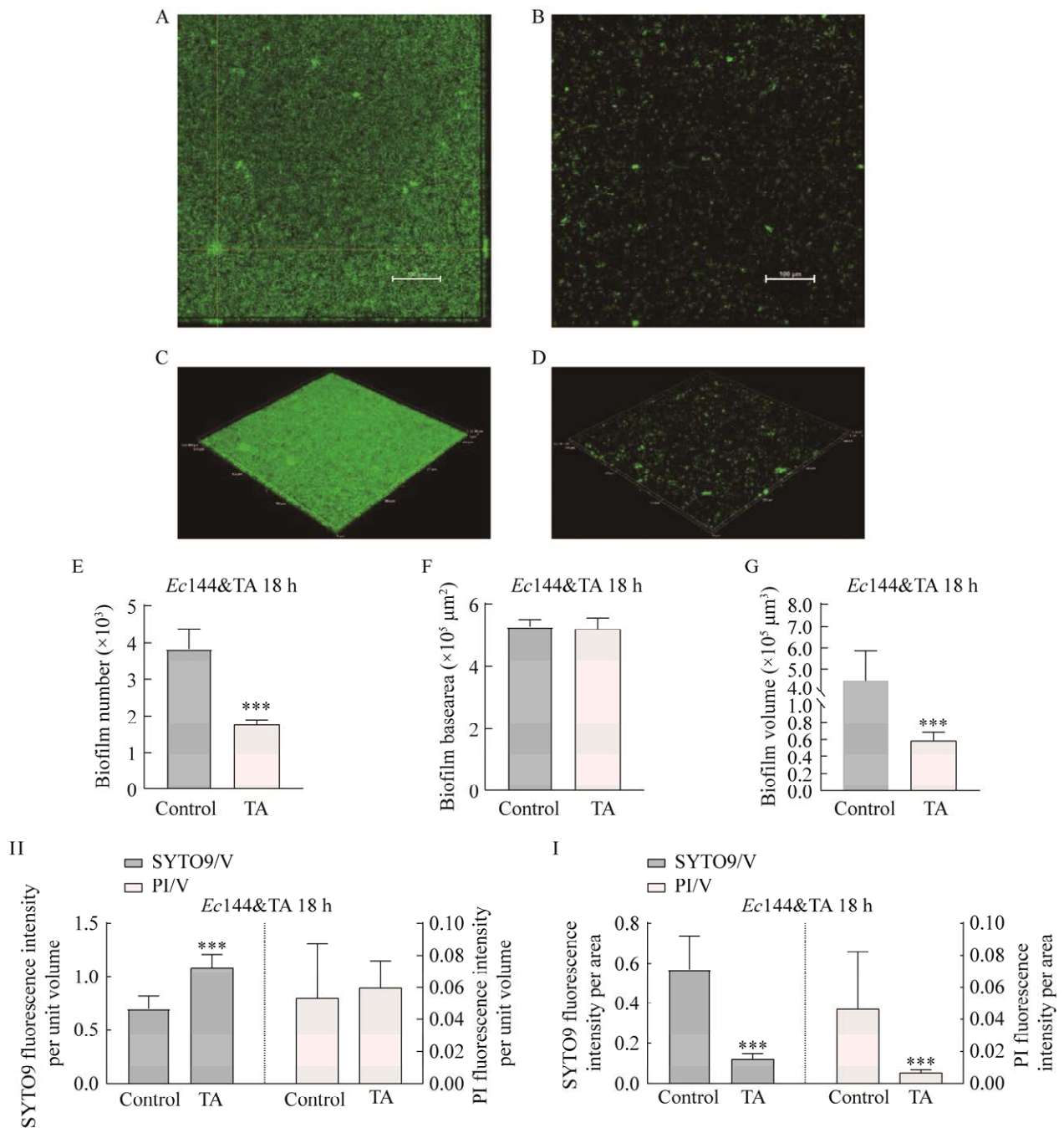


图5 激光共聚焦扫描显微镜观察 TA 对 *Ec144* 生物被膜形成的影响 A、C: 对照组 CLSM 代表性的 3D 图和正交图. B、D: TA 组代表性的 CLSM 3D 图和正交图. E: 生物被膜数量. F: 生物被膜基底面积. G: 生物被膜体积. H: 生物被膜荧光强度体积比. I: 生物被膜荧光强度面积比. Bar=100 μm

Figure 5 CLSM observed the effect of TA on the formation of *Ec144* biofilm. A, C: Representative CLSM 3D and orthogonal maps of the control group. B, D: CLSM 3D diagram and orthogonal diagram of representative intervention group. E: Number of biofilms. F: Biofilm base area. G: Biofilm volume. H: Biofilm fluorescence intensity volume ratio. I: Biofilm fluorescence intensity area ratio. Bar=100 μm . *** $P < 0.001$.

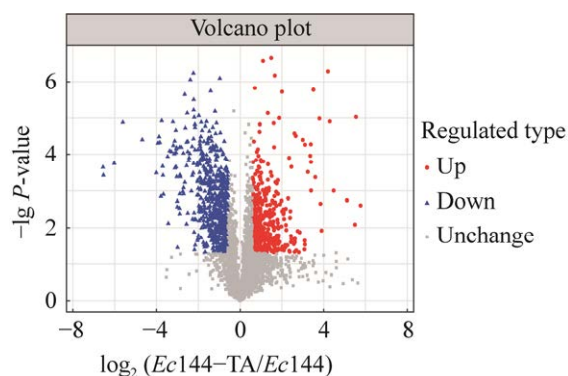


图 6 差异蛋白的火山图

Figure 6 Volcano plot of differential proteins.

毛产生有关, 因此验证 *Ec144* 在含有刚果红和考马斯亮蓝的平板上的形态变化^[19]。结果表明, *Ec144* 在平板上产生一种扩散的同心圆环形状的图案, 表面干燥粗糙呈紫红色的菌毛阳性表型; 在同时添加 TA 的平板上生长的菌落呈白色, 表面平滑无褶皱(图 8)。

2.10 运动性测定

蛋白质组学结果显示, 与 QS 相关的蛋白 SdiA 发生显著变化, 调控 c-di-GMP 的 BoliA 蛋白也发生显著变化, QS 和 c-di-GMP 都会影响

表 4 与生物被膜相关差异蛋白质

Table 4 Differential proteins associated with biofilms

Names	ID	Function	log ₂ FC
Curli fimbriae assembly			
CsgA	A0A061LPH5	Cryptic curlin major subunit	1.547 863 36
CsgG	A0A377CGK2	Curli production assembly/transport component CsgG	-1.097 637 41
CsgE	A0A080J0X6	Curli production assembly/transport component CsgE	-1.664 995 60
CCsgF	A0A6D0D8W7	Curli production assembly/transport component CsgF	-1.887 424 83
Quorum sensing			
SdiA	A0A066RJ77	DNA-binding transcriptional activator SdiA	1.467 116 41
LsrK	A0A830SLC9	Autoinducer-2 kinase	-1.003 195 04
LsrG	A0A080IZK3	Autoinducer-2 degrading enzyme	-1.678 497 55
Succinic acid metabolism			
SdhA	A0A080J5Y0	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-1.726 230 33
SdhB	A0A0A0FBN6	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-1.100 785 86
SdhC	A0A0A0F9I9	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 subunit	-2.051 525 68
SucD	A0A080JC41	Succinate-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	-1.031 111 62
GabD	A0A377DPH8	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	-1.458 544 00
c-di-GMP			
<i>bolA</i>	A0A080JEI4	A transcriptional regulator BoliA	-1.619 086 81
Iron uptake system			
FepA	A0A037YHW8	Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins	3.391 468 23
FepB	A0A0A0FC38	Ferrienterobactin-binding periplasmic protein	1.870 033 36
FepD	A0A037Y5M9	Fe(3+)-siderophore ABC transporter permease	1.644 495 15
CirA	A0A024L128	Catechol siderophore receptor CirA	4.474 126 81
FhuA	A0A0D8WK32	Ferrichrome outer membrane transporter	1.295 270 15
FhuD	A0A023L004	Fe(3+)-hydroxamate ABC transporter substrate-binding protein FhuD	1.628 498 93
FhuE	A0A037YA36	Ferric-rhodotorulic acid outer membrane transporter	3.103 744 857
Cold shock protein			
CspD	A0A080JA61	Cold shock-like protein CspD	-1.480 699 835
CspE	A0A080JB06	RNA chaperone, negative regulator of <i>cspA</i> transcription	1.328 286 943

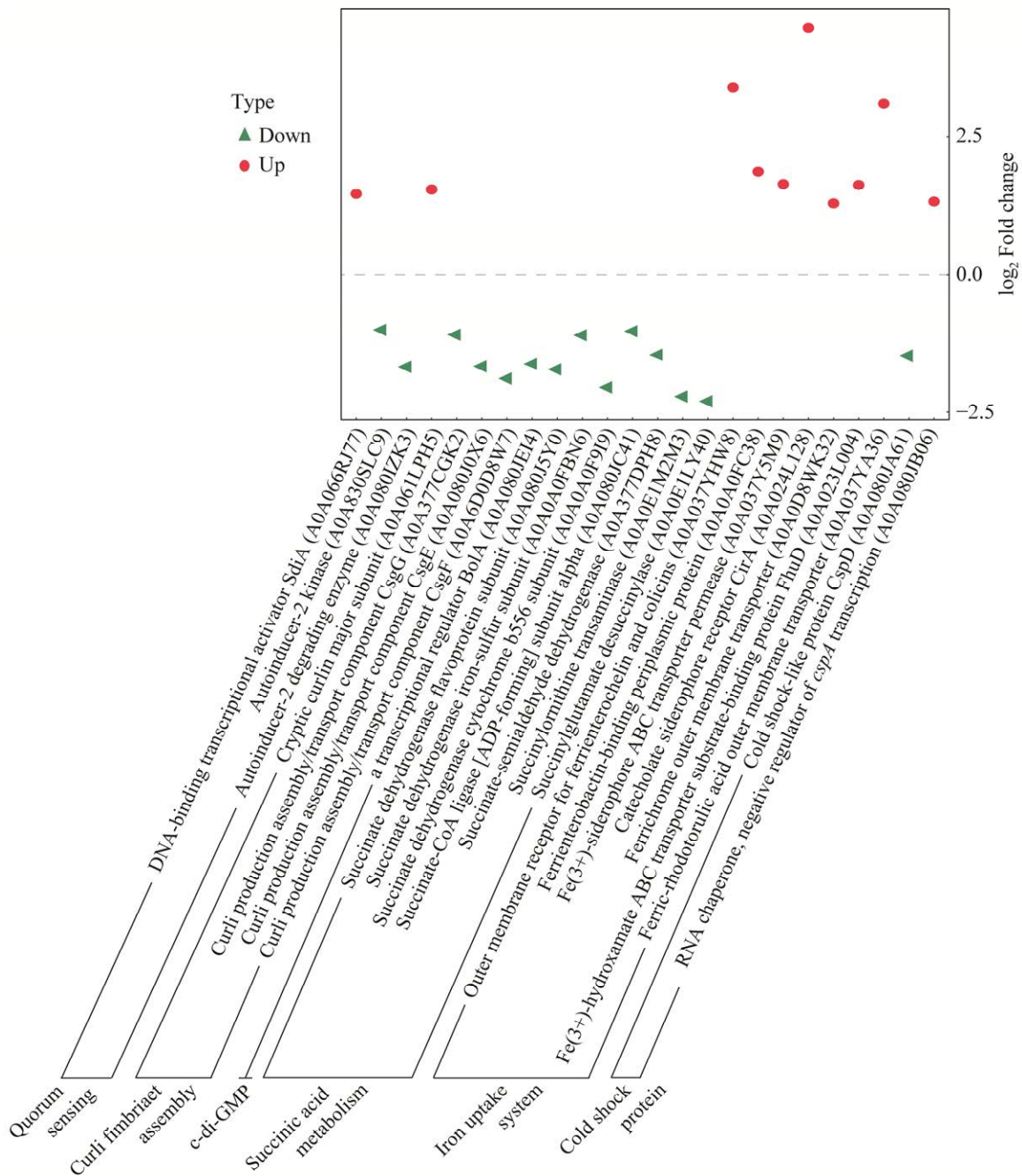


图7 与生物被膜相关差异蛋白质气泡图 图中横坐标为蛋白质差异倍数的对数值 \log_2 Fold change, 圆形斑点代表蛋白质表达上调, 三角形斑点代表蛋白质表达下调; 纵坐标是每一个蛋白质的功能和该蛋白在 Uniprot 蛋白质数据库中的登录号, 纵坐标左侧是该蛋白质所述的调控通路或代谢通路

Figure 7 Bubble map of differential proteins associated with biofilms. The horizontal coordinate is the logarithmic value \log_2 Fold change, where the round spot represents up-regulated protein expression and the triangle shaped spot represents down-regulated protein expression. The ordinate is the function of each protein and the entry number of that protein in the Uniprot protein database. On the left side of the ordinate is the regulatory or metabolic pathway described by that protein.

细菌的运动性^[21-22]。因此本研究利用此原理验证 TA 对 *Ec144* 运动性的影响。结果显示, TA 终浓度为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 *Ec144* 的游泳运动具有显著的抑制作用, 抑制率达到 43.8% (图 9A); 其对 *Ec144* 的蹭行运动也具有显著抑制作用, 抑制率达到 51.3% (图 9B)。

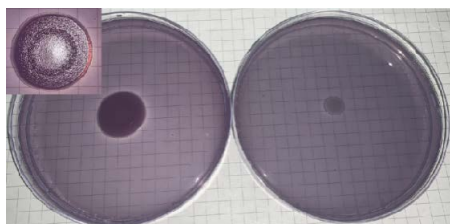


图 8 TA 对 *Ec144* 菌毛组装的影响 *Ec144* 在加 TA (左) 和未加 TA (右) 刚果红考马斯亮蓝平板上生长的表型

Figure 8 Effect of TA on *Ec144* pili assembly. Phenotype of *Ec144* grown on a doped (left) and undoped (right) Congo red Coomas bright blue plate.

2.11 琥珀酸对 *Ec144* 生物被膜形成的影响

蛋白质组学结果显示, 参与调控琥珀酸代谢的酶 SdhCAB、SucD 的表达量显著下调。琥珀酸参加三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA), 调控细菌代谢, 影响细菌生物被膜的形成^[23]。因此本试验外源添加琥珀酸验证其对生物被膜的作用。结果显示, 外源添加琥珀酸对 *Ec144* 生物被膜的形成具有抑制作用(图 10)。

3 讨论与结论

ExPEC 可引起多种传染性疾病, 其中猪源 ExPEC 可引起猪的肺炎等病症, 对动物健康造成威胁, 给养殖业带来巨大经济损失^[2]。生物被膜是微生物常见的生存方式, 其中猪源 ExPEC 也是生物被膜感染的常见病原体, 细菌生物被膜易引起多种感染, 且大部分表现出多重耐药性, 导致抗生素治疗有效性大大降低^[6]。

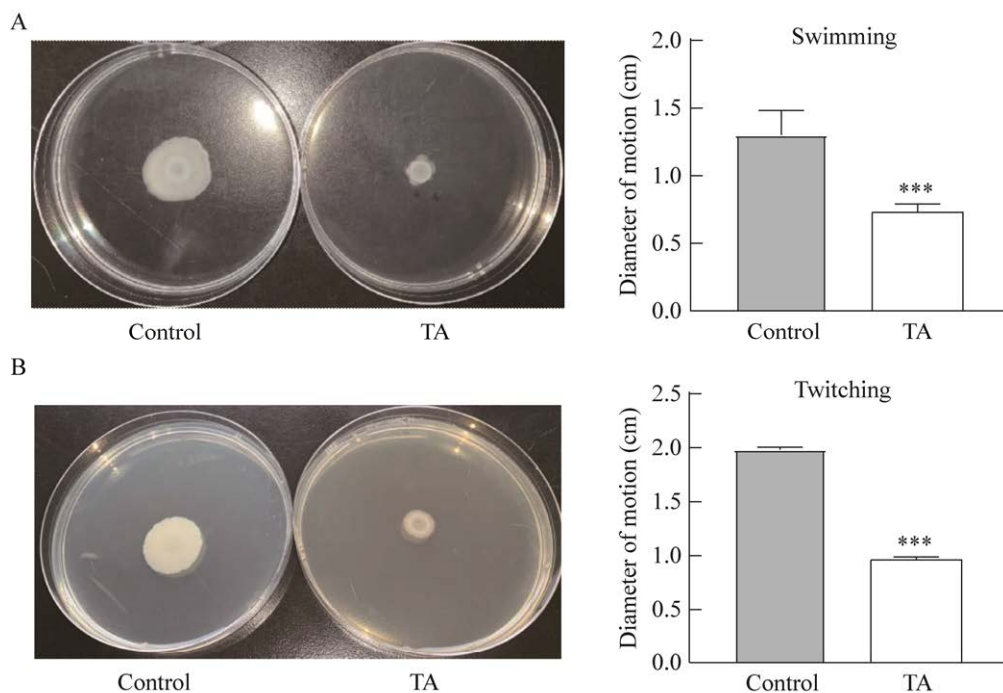


图 9 TA 对 *Ec144* 运动性的影响 A: TA 对 *Ec144* 游泳运动的影响. B: TA 对 *Ec144* 蹭行运动的影响. Figure 9 Effect of TA on *Ec144* pili assembly. A: The influence of TA on swimming operation of *Ec144*. B: Effect of TA on *Ec144* rubbing motion. *** $P < 0.001$.

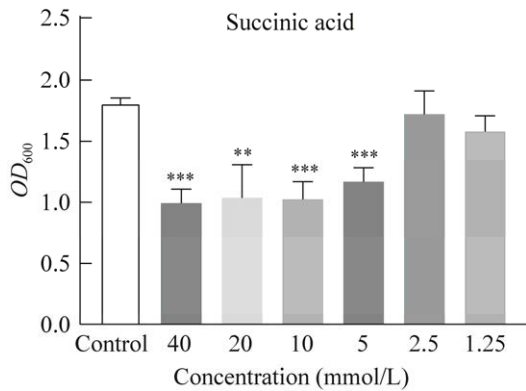


图 10 琥珀酸对 *Ec144* 生物被膜形成的影响

Figure 10 Effect of succinic acid on the formation of *Ec144* biofilm. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

因此,本研究针对生物被膜关键成膜基因进行筛选,以期找到具有潜在治疗生物被膜感染的首选化合物。大肠埃希菌生物被膜的形成是一个极为复杂的调控网络,涉及许多基因,其中报道较多的是 *csgD*。生物被膜主调控因子 *CsgD* 调节大肠埃希菌菌毛和纤维素的合成,增加细菌黏附和聚集,促进生物被膜的形成^[24-25]。有研究表明, *csgD* 突变体 *curli* 菌毛生成减少,黏附能力受到抑制,生物被膜量减少 70.07%,表明 *CsgD* 可作为治疗和控制生物被膜的潜在靶点^[8]。因此本研究选择 *CsgD* 作为虚拟筛选的靶标蛋白。本研究从大肠埃希菌生物被膜关键成膜基因 *csgD* 出发,采用分子对接技术对 TCMSP 数据库中的 13 000 多个中药单体进行虚拟筛选,并结合分子动力学模拟获得与 *CsgD* 结合较为稳定的配体分子。根据 TCMSP 数据库提供的信息获得 4 种中药活性单体作为抑制大肠埃希菌生物被膜形成的候选单体。通过结晶紫染色试验筛选出候选单体中的 TA 具有最好的抑制大肠埃希菌生物被膜形成的效果。蛋白质组学结果显示,该单体主要通过影响菌毛组装^[26]、QS 系统、琥珀酸代谢^[23]等相关蛋白的表达影响生物被膜的形成。

curli 菌毛的产生需要特定的组装机制,依

赖多种蛋白共同作用。*CsgD* 是这个调控通路中的枢纽点,通过激活编码 *curli* 菌毛的 *csgBAC* 和 *csgDEF* 操纵子的转录,调节 *curli* 菌毛的生成,促进细菌生物被膜的形成^[27-29]。其中 *csgBAC* 操纵子编码 *curli* 菌毛的主亚基 *CsgA* 和成核蛋白 *CsgB*^[30]。*CsgB* 是位于细胞表面的成核蛋白,诱导分泌到胞外的纤维亚基 *CsgA* 聚合在细胞表面^[31-32]。*csgDEFG* 操纵子参与编码 *curli* 菌毛发生的非结构蛋白 *CsgE*、*CsgF* 和 *CsgG*,指导 *curli* 菌毛亚基在细胞外的定位和组装^[33-34]。位于细胞表面的 *CsgF* 调节 *CsgA* 向细胞表面的分泌^[35]。*CsgG* 是一种位于外膜的脂蛋白,具有很强的抗蛋白酶消化作用,用来维持 *CsgA* 和 *CsgB* 的稳定性。有研究表明,在缺乏 *CsgG* 的情况下, *CsgA* 和 *CsgB* 被蛋白水解降解。此外,过表达 *CsgG* 时, *curli* 菌毛的产生和 *CsgA* 以及 *CsgB* 的稳态水平高于野生型水平,这表明组装的 *curli* 菌毛的数量可以由该脂蛋白控制^[36]。蛋白质组学结果中,参与 *curli* 菌毛组装的主调控因子 *CsgD* 表达下调(虽然差异倍数不够大, $\text{Log FC} = -0.899\ 703\ 587$, $P\text{-value} = 0.004\ 789\ 679$),非结构蛋白 *CsgG*、*CsgE* 和 *CsgF* 均下调,但 *curli* 菌毛主亚基 *CsgA* 表达上调,可能表明 *CsgA* 的表达还受到其他通路的调控。其中 *CsgF* 是正确组装 *curli* 菌毛所必需的,它控制着 *CsgA* 的分泌,决定 *CsgB* 在胞外的定位^[35]。因此即使蛋白质组学结果中菌毛主亚基 *CsgA* 表达上调,但其分泌及组装相关蛋白表达下调,预示 *curli* 菌毛的产生受阻,表明其可能不能正常组装 *curli* 菌毛。经后期刚果红平板试验验证, *Ec144* 在加有 TA 的刚果红平板上形成的菌落失去了产生物被膜型肠杆菌会在刚果红培养基(congo red, CR)上形成的红色、干燥和粗糙的形态(图 8)^[19],初步推测该菌株生成 *curli* 菌毛的能力减弱,进而可能影响细菌的初始黏

附, 导致生物被膜的形成受到抑制。这与结晶紫结果显示 TA 与 *Ec144* 共培养生物被膜量减少的表型一致。

群体感应(quorum sensing, QS)是一种信号系统, 它赋予细菌对被称为自诱导剂的化学分子做出反应的能力。*SdiA* 是一种 QS 受体可检测酰基高丝氨酸内酯(N-acyl homoserine lactones, AHL)型自诱导剂。有研究表明, *sdiA* 突变体中 *csgA*、*csgD* 和 *fliC* 的转录增加, *sdiA* 可能作为鞭毛和 *curli* 菌毛编码基因的抑制因子参与细菌黏附性、运动性以及生物被膜形成的调控, *sdiA* 突变体相比野生型菌株运动能力和黏附性增强, 形成更致密的生物被膜结构^[21]。蛋白组学结果显示, *SdiA* 蛋白显著上调, 推测其可能受到 *CsgD* 下调的影响, 具体是否受到 *CsgD* 的负调控仍需要进一步的验证。上调的 *SdiA* 可能抑制鞭毛运动, 进而抑制生物被膜形成。本研究发现在 TA 作用下 *Ec144* 运动性减弱, 生物被膜量减少与蛋白质组学推测结果一致。

TCA 循环在细菌新陈代谢中起着核心作用。有研究表明 TCA 循环中的琥珀酸脱氢酶(*sdhCAB*)以及琥珀酰辅酶 a 合成酶(*sucC*)等基因在细菌生物被膜中下调, 这表明该途径在生物被膜的形成中很重要^[37]。外源添加铁与琥珀酸一同作用显著抑制生物被膜的形成, 推测其是由于琥珀酸参与氨基酸和丙酮酸的代谢, 进而导致生物被膜胞外基质中的蛋白质和多糖减少^[38]。在金黄色葡萄球菌中, *sdhA*、*sdhB* 突变体通过减少胞外基质中蛋白质成分减少生物被膜量^[39]。TCA 循环的酶, 如 *Sdh* 是 TCA 循环中唯一能直接向呼吸链提供电子的酶, 在生物被膜中上调有利于细菌在复杂的生存环境下, 有效地利用有限的营养物质, 进行能量供应, 但 *Sdh* 表达被抑制, 则会导致循环受阻, 能量转化受阻, 其中间产物琥珀酸堆积, 不利于生

物被膜的形成^[23]。蛋白质组学结果显示, 参与琥珀酸代谢的酶(表 3) *SdhA*、*SdhB*、*SdhC*、*SucD*、*GabD* 等表达均下调, 其中 *SdhABC* 促进琥珀酸代谢, 其下调可能导致琥珀酸累积, TCA 循环中断。本研究显示外源添加琥珀酸时生物被膜形成量降低, 但其究竟是通过减少胞外基质的生成还是阻断 TCA 循环中的能量供应进而导致生物被膜形成减少还需要进一步验证。

综上所述, 本研究利用分子对接以及分子动力学模拟等方法筛选得到具有潜在抑制生物被膜形成的候选中药活性单体, 结合体外试验验证筛选到的 TA 对 *Ec144* 生物被膜形成的抑制作用最佳, 并通过蛋白组学技术结合生物被膜相关表型验证初步探究了 TA 影响生物被膜形成的作用机制, 为进一步阐明其作用机制奠定基础。同时, 本研究也为防治生物被膜相关感染的新型药物开发提供了一种有潜力的先导化合物。

REFERENCES

- [1] RUSSO TA, JOHNSON JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2000, 181(5): 1753-1754.
- [2] 王欣宇, 胡剑刚, 张贝贝, 郭伟奇, 王少辉. 肠外致病性大肠杆菌致病机制及公共卫生学意义[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3073-3087.
WANG XY, HU JG, ZHANG BB, GUO WQ, WANG SH. Pathogenic mechanism and public health significance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC)[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3073-3087 (in Chinese).
- [3] RATHER MA, GUPTA K, MANDAL M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(4): 1701-1718.
- [4] ABDULLAHI UF, IGWENAGU E, MU'AZU A, ALIYU S, UMAR MI. Intrigues of biofilm: a perspective in veterinary medicine[J]. Veterinary

- World, 2016, 9(1): 12-18.
- [5] DALE AP, WOODFORD N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones[J]. *The Journal of Infection*, 2015, 71(6): 615-626.
- [6] KASZA K, GURNANI P, HARDIE KR, CÂMARA M, ALEXANDER C. Challenges and solutions in polymer drug delivery for bacterial biofilm treatment: a tissue-by-tissue account[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 178: 113973.
- [7] HUFNAGEL DA, EVANS ML, GREENE SE, PINKNER JS, HULTGREN SJ, CHAPMAN MR. The catabolite repressor protein-cyclic AMP complex regulates *csgD* and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(24): 3329-3334.
- [8] YAN CH, CHEN FH, YANG YL, ZHAN YF, HERMAN RA, GONG LC, SHENG S, WANG J. The transcription factor CsgD contributes to engineered *Escherichia coli* resistance by regulating biofilm formation and stress responses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(18): 13681.
- [9] ZHAO YL, LI HT, WEI SZ, ZHOU XL, XIAO XH. Antimicrobial effects of chemical compounds isolated from traditional Chinese herbal medicine (TCHM) against drug-resistant bacteria: a review paper[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2019, 19(2): 125-137.
- [10] 程鹏, 熊静, 李会, 王士源, 张阳, 梅翠, 伍雪晴, 何玉张, 陈红伟. 植物提取物及其活性成分抑制细菌生物被膜的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(5): 1753-1767.
- CHENG P, XIONG J, LI H, WANG SY, ZHANG Y, MEI C, WU XQ, HE YZ, CHEN HW. Using plant extracts and their active ingredients to inhibit bacterial biofilms[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(5): 1753-1767 (in Chinese).
- [11] PINZI LC, RASTELLI G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4331.
- [12] FERNICOLA S, PAIARDINI A, GIARDINA G, RAMPIONI G, LEONI L, CUTRUZZOLA F, RINALDO S. *In Silico* Discovery and *In Vitro* Validation of Catechol-Containing Sulfonylhydrazide Compounds as Potent Inhibitors of the Diguanilate Cyclase PleD[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(1): 147-156.
- [13] SAMBANTHAMOORTHY K, LUO CY, PATTABIRAMAN N, FENG XR, KOESTLER B, WATERS CM, PALYS TJ. Identification of small molecules inhibiting diguanilate cyclases to control bacterial biofilm development[J]. *Biofouling*, 2014, 30(1): 17-28.
- [14] ZHAO JH, LIU M, ZANG JY, YANG SS, CHEN RY, ZHAO X, DING LN. Molecular docking, 3D-QASR and molecular dynamics simulations of thiazoles Pin1 inhibitors[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2022, 40(23): 12699-12713.
- [15] WU XD, XU LY, LI EM, DONG G. Application of molecular dynamics simulation in biomedicine[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2022, 99(5): 789-800.
- [16] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3: 163-175.
- [17] 熊静, 王士源, 李会, 张阳, 程鹏, 梅翠, 彭练慈, 徐登峰, 高继业, 何玉张, 陈红伟. 抗微生物肽 CRAMP 联合抗生素分散铜绿假单胞菌生物被膜的增效作用研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 3251-3262.
- XIONG J, WANG SY, LI H, ZHANG Y, CHENG P, MEI C, PENG LC, XU DF, GAO JY, HE YZ, CHEN HW. Synergistic effect of CRAMP and antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3251-3262 (in Chinese).
- [18] HARTMANN R, JECKEL H, JELLI E, SINGH PK, VAIDYA S, BAYER M, RODE DKH, VIDAKOVIC L, DÍAZ-PASCUAL F, FONG JCN, DRAGOŠ A, LAMPRECHT O, THÖMING JG, NETTER N, HÄUSSLER S, NADELL CD, SOURJIK V, KOVÁCS ÁT, YILDIZ FH, DRESCHER K. Quantitative image analysis of microbial communities with BiofilmQ[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6: 151-156.
- [19] RÖMLING U. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005, 62(11): 1234-1246.
- [20] BALA AJ, KUMAR R, HARJAI K. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60(Pt 3): 300-306.
- [21] CULLER HF, COUTO SCF, HIGA JS, RUIZ RM, YANG MJ, BUERIS V, FRANZOLIN MR, SIRCILI MP. Role of SdiA on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Genes*, 2018, 9(5): 253.
- [22] MOREIRA RN, DRESSAIRE C, BARAHONA S, GALEGO L, KAEVER V, JENAL U, ARRAIANO CM.

- BolA is required for the accurate regulation of c-di-GMP, a central player in biofilm formation[J]. *mBio*, 2017, 8(5): e00443-17.
- [23] GAUPP R, SCHLAG S, LIEBEKE M, LALK M, GÖTZ F. Advantage of upregulation of succinate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* biofilms[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(9): 2385-2394.
- [24] SANO K, KOBAYASHI H, CHUTA H, MATSUYOSHI N, KATO Y, OGASAWARA H. CsgI (YccT) is a novel inhibitor of curli fimbriae formation in *Escherichia coli* preventing CsgA polymerization and curli gene expression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(5): 4357.
- [25] OGASAWARA H, ISHIZUKA T, HOTTA S, AOKI M, SHIMADA T, ISHIHAMA A. Novel regulators of the *csgD* gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli* K-12[J]. *Microbiology*, 2020, 166(9): 880-890.
- [26] SERRA DO, MIKA F, RICHTER AM, HENGGE R. The green tea polyphenol EGCG inhibits *E. coli* biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the biofilm regulator CsgD via the $\sigma(E)$ -dependent sRNA RybB[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 101(1): 136-151.
- [27] HU L. Prevalence of curli genes among *Cronobacter* species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 265: 65-73.
- [28] PRIGENT-COMBARET C, BROMBACHER E, VIDAL O, AMBERT A, LEJEUNE P, LANDINI P, DOREL C. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(24): 7213-7223.
- [29] BROMBACHER E, BARATTO A, DOREL C, LANDINI P. Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(6): 2027-2037.
- [30] HAMMAR M, ARNQVIST A, BIAN Z, OLSÉN A, NORMARK S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 18(4): 661-670.
- [31] BIAN Z, NORMARK S. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*[J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(19): 5827-5836.
- [32] CHAPMAN MR, ROBINSON LS, PINKNER JS, ROTH R, HEUSER J, HAMMAR M, NORMARK S, HULTGREN SJ. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation[J]. *Science*, 2002, 295(5556): 851-855.
- [33] ROBINSON LS, ASHMAN EM, HULTGREN SJ, CHAPMAN MR. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(3): 870-881.
- [34] NENNINGER AA, ROBINSON LS, HAMMER ND, EPSTEIN EA, BADTKE MP, HULTGREN SJ, CHAPMAN MR. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 81(2): 486-499.
- [35] SWASTHI HM, BASALLA JL, DUDLEY CE, VECCHIARELLI AG, CHAPMAN MR. Cell surface-localized CsgF condensate is a gatekeeper in bacterial curli subunit secretion[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 2392.
- [36] LOFERER H, HAMMAR M, NORMARK S. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 26(1): 11-23.
- [37] RESCH A, ROSENSTEIN R, NERZ C, GÖTZ F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2663-2676.
- [38] LIU KX, TAN S, YE WY, HOU LM, FANG BH. Low-concentration iron promotes *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by suppressing succinic acid[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 95.
- [39] BACKER S, SABIROVA J, PAUW I, GREVE H., HERNALSTEENS J, GOOSSENS H, MALHOTRA-KUMAR S. Enzymes Catalyzing the TCA- and Urea Cycle Influence the Matrix Composition of Biofilms Formed by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300[J]. *Microorganisms*, 2018, 6(4): 113.

(本文责编 陈宏宇)