

## 研究报告

## 鼠伤寒沙门氏菌 III 型分泌系统抗感染类抑制剂的筛选

徐京华<sup>#1</sup>, 焦绪瑶<sup>#1</sup>, 侯旭奔<sup>2</sup>, 高翔<sup>\*1</sup>

1 山东大学微生物技术研究院, 山东 青岛 266000

2 山东大学药学院, 山东 济南 250000

徐京华, 焦绪瑶, 侯旭奔, 高翔. 鼠伤寒沙门氏菌 III 型分泌系统抗感染类抑制剂的筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2099-2112.

XU Jinghua, JIAO Xuyao, HOU Xuben, GAO Xiang. Screening of anti-virulence compounds inhibiting type III secretion system of *Salmonella Typhimurium*[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2099-2112.

**摘要:** 【背景】肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)是一种常见的食源性肠道致病菌, 可以感染人畜并引发食物中毒、伤寒等疾病。近年来因抗生素滥用导致肠道沙门氏菌耐药性问题日益严峻, 迫切需要开发新型抗感染药物。肠道沙门氏菌致病的关键在于与宿主细胞接触后可以通过III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)向宿主细胞内注射效应蛋白, 进而调控宿主细胞囊泡运输和免疫应答等生理活动, 以方便其高效侵染宿主细胞。T3SS 是一类由超过 20 种蛋白质组成、高度复杂的跨膜分子机器, 是革兰氏阴性病原菌中普遍存在的一类蛋白质运输系统和毒力系统。在不同病原菌中, 其结构与功能非常保守。位于 T3SS 核心跨膜区的 SctV 家族蛋白是 T3SS 中最保守的组分之一, 参与 T3SS 能量供应和效应蛋白的分泌过程, SctV 蛋白的关键氨基酸突变失活后会致鼠伤寒沙门氏菌丧失对宿主的入侵能力。【目的】以沙门氏菌 SctV 家族蛋白为靶点, 尝试通过虚拟筛选技术筛选与 SctV 胞内区相互作用的抗感染类 T3SS 抑制剂。【方法】结合体外相互作用分析、细菌生长曲线实验、细菌分泌实验和细胞侵染实验等对候选分子进行抑制效果的分析验证。【结果】最终筛选出小分子抑制剂 C4 (纽莫康定 B0) 和 C5 (茜草素), 二者均可以显著抑制 T3SS 分泌效应蛋白, 并进一步抑制鼠伤寒沙门氏菌对 NCM460 细胞的侵染。进一步的研究发现, 化合物 C4 和 C5 并不是通过结合到 SctV 胞内区而是通过其他不同机制来抑制细菌的毒性。【结论】化合物 C4 通过未知通路调控 T3SS 效应蛋白的分泌过程, 而 C5 可能通过下调调控基因 *hilD* 的表达来抑制 T3SS 分泌效应蛋白, 并进一步抑制沙门氏菌对 NCM460 细胞的侵染。本研究

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFE0113000); 山东省自然科学基金(ZR2021JQ09)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFE0113000) and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021JQ09).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: xgao@sdu.edu.cn

Received: 2022-12-05; Accepted: 2022-12-26; Published online: 2023-02-23

为针对 T3SS 开发新型抗感染药物提供了新的靶点和思路, 并为后续 T3SS 抗感染类抑制剂的优化和改造提供了分子理论基础。

**关键词:** 鼠伤寒沙门氏菌; III型分泌系统; SctV 蛋白; 抗感染类抑制剂

## Screening of anti-virulence compounds inhibiting type III secretion system of *Salmonella* Typhimurium

XU Jinghua<sup>#1</sup>, JIAO Xuyao<sup>#1</sup>, HOU Xuben<sup>2</sup>, GAO Xiang<sup>\*1</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266000, Shandong, China

2 School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250000, Shandong, China

**Abstract:** [Background] *Salmonella enterica* is a common foodborne enteric pathogen that infects humans and animals and causes food poisoning, typhoid fever and other diseases. In recent years, antibiotic abuse has aggravated the antibiotic resistance of *S. enterica*, and it is urgent to develop new anti-infectives. After the contact with the intestinal epithelium, *S. enterica* can deliver several effector proteins into the host cells through the type III secretion system (T3SS). The effector proteins can manipulate many common cellular processes, including host immune responses, cytoskeletal dynamics, vesicle transport, and signaling pathways, which facilitate the infection in the host cells. T3SS, composed of more than 20 proteins, is a protein transport nanomachine ubiquitous in most Gram-negative bacterial pathogens and symbionts. Its structure and function are highly conserved in diverse pathogens. The SctV family protein, one of the most conserved components of T3SS, is located at the core part of T3SS and involved in energy supply and effector secretion of T3SS. The mutation of key residues in SctV results in the failure of *S. enterica* invasion. [Objective] To obtain the anti-virulence T3SS inhibitors with the SctV family proteins of *Salmonella* as the targets by virtual screening. [Methods] The *in vitro* interaction assay, secretion assay, bacterial growth curve assay, and bacterial invasion assay were combined to analyze and validate the inhibitory effect of candidate molecules. [Results] The compounds C4 (pneumocandin B0) and C5 (purpurin) significantly inhibited the secretion of T3SS effectors and further prevented *S. Typhimurium* from invading NCM460 cells. Instead of binding to the intracellular part of SctV, C4 and C5 employed other mechanisms to inhibit the virulence of *S. Typhimurium*. [Conclusion] How C4 inhibits the secretion of T3SS effectors remains unclear. C5 may down-regulate the expression of the regulator gene *hilD* to inhibit the secretion of T3SS effectors and further hinder the invasion of *S. Typhimurium* into NCM460 cells. This work provides new targets and ideas for the development of novel anti-infectives targeting T3SS. Moreover, it provides a theoretical basis for the optimization and modification of subsequent T3SS anti-virulence inhibitors.

**Keywords:** *Salmonella* Typhimurium; type III secretion system; SctV protein; anti-virulence inhibitor

肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)是一类常见的食源性致病菌,属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),为兼性厌氧的革兰氏阴性菌<sup>[1]</sup>。大多数能感染家禽、家畜等动物,一些还可感染人类,导致肠胃炎,甚至特异性针对人类引发伤寒,因而被认为是公共卫生学上具有重要意义、能够非特异性引起人畜共患病的病原菌之一<sup>[1-2]</sup>。

根据世界卫生组织报道的数据,肠炎沙门氏菌(*Salmonella Enteritidis*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)因其广泛的宿主特异性而成为临床上检出率最高的两种血清型<sup>[3]</sup>。2015年世界卫生组织公布了急需新型抗生素的重点病原体清单,这份清单将12种细菌分为3个类别:危险、高和中等,其中沙门氏菌被列为高度耐药性类别<sup>[2]</sup>。因此,针对该类耐药性细菌开发新型抗感染药物迫在眉睫。

鼠伤寒沙门氏菌经粪-口传播,通过受污染的食物或水进入宿主肠道,通过位于沙门氏菌毒力岛1(*Salmonella pathogen island 1*, SPI-1)的III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)分泌的效应蛋白(SipA、SipB、SipC和SipD等)诱导宿主细胞骨架重排,调控信号通路,方便其入侵宿主细胞并引发相关病症<sup>[4-7]</sup>。针对沙门氏菌引起的感染,目前主要的治疗手段是抗生素,通过干扰细菌的代谢过程,从而起到杀菌的作用。但是长期使用这些抗生素容易产生细菌耐药性,因此,开发针对沙门氏菌的新药和挖掘新的药物靶点是减缓沙门氏菌耐药性发展的关键<sup>[8]</sup>。

III型分泌系统是在革兰氏阴性菌中普遍存在的一类蛋白运输系统。最早在耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)等病原菌中发现,随后在一系列革兰氏阴性病原菌和共生菌中被相继鉴定出来<sup>[9-13]</sup>。这些具有III型

分泌系统的病原菌大多属于变形菌门,他们与人类健康息息相关,如可引起食物中毒和伤寒的肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、引发痢疾的志贺氏菌(*Shigella* spp.)、引发霍乱的霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)以及与肺囊性纤维化患者感染相关的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等<sup>[9-12]</sup>。进一步研究表明III型分泌系统在这些病原菌致病过程中发挥着重要作用,病原菌通过T3SS向宿主细胞内分泌不同的效应蛋白以控制宿主细胞,从而使自身更好地生存和繁殖,并引起相关病症<sup>[9-12]</sup>。尽管在不同细菌中T3SS分泌的效应蛋白种类不同,但T3SS的结构组成和分泌机制都高度保守<sup>[13]</sup>。作为病原菌最关键的毒力系统之一,当III型分泌系统失活后,多数病原菌会丧失对宿主的侵染能力和致病性<sup>[13-15]</sup>。因此,以T3SS为靶点设计抗感染药物是人类对抗病原菌感染的一个新思路,而且有望对一系列致病菌实现广谱性抑制。

位于T3SS核心跨膜区的SctV家族蛋白是最早被鉴定的T3SS关键组分之一,也是T3SS中最保守的组分之一,在参与T3SS能量供应和底物分选及分泌的过程中发挥重要作用<sup>[10,16-17]</sup>。SctV家族蛋白的二级结构非常保守,主要由N端8次跨膜螺旋(SctV<sub>TM</sub>)和1个约40 kDa的C端胞内区(SctV<sub>C</sub>)组成,二者通过一段20-50个氨基酸长度的柔性区域(linker region, SctV<sub>L</sub>)连接<sup>[18]</sup>。SctV蛋白在胞内区的驱动下以九聚体形式嵌在细菌内膜上,可能通过与T3SS的其他蛋白相互作用作为质子泵为T3SS提供能量<sup>[16,19-26]</sup>。研究表明,对SctV蛋白跨膜区的保守氨基酸突变后,鼠伤寒沙门氏菌丧失了对宿主细胞的入侵能力,而SctV蛋白胞内区由SD1-SD4这4个结构域组成,其中SD3最保守,SD2和SD4序列相似度最低,SD2和SD4间相对距离的变化被定

义为 SctV<sub>C</sub> 的“开放”和“闭合”构象,参与 T3SS 效应蛋白的选择和转运<sup>[26-29]</sup>。因此, SctV 家族蛋白在细菌入侵宿主细胞的过程中发挥重要作用。

本文以沙门氏菌的 SctV 家族蛋白为主要研究对象, SctV 蛋白会以九聚体的形式在细菌细胞膜上发挥作用,其胞内区单体和九聚体结构均已得到解析<sup>[20-26]</sup>。经过对 SctV 蛋白胞内区结构分析,我们发现 SctV 在参与 T3SS 底物分选和分泌的过程中发挥重要作用<sup>[30-31]</sup>。在 T3SS 效应蛋白分泌过程中, SctV<sub>C</sub> 单体分子内 SD2-SD4 之间“开放”到“闭合”构象的变化直接影响其对效应蛋白的选择与结合<sup>[32]</sup> (图 1A); 由 SctV 家族蛋白胞内区 SD3 围成的分泌通道直径会随环境 pH 的变化而变化<sup>[21]</sup> (图 1B); SctV<sub>C</sub> 单体分子间的 SD4-SD4 与“stalk” SctO 的相互作用实现了 SctV 跨膜质子动势与胞内 ATPase SctN 的能量偶联,这为 T3SS 的组装和效应蛋白的分泌提供了稳定且持续的能量供应<sup>[19]</sup> (图 1C)。这些特征表明 SctV<sub>C</sub> 可作为一个潜在的药物靶点。

因此,本研究以 SctV<sub>C</sub> 为靶点,通过虚拟筛选获得具有抑菌活性的小分子抑制剂,这些

小分子抑制剂有望作为潜在的先导化合物,为新型抗感染药物的开发提供新的选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*) UK-1 由山东大学李瑶瑶老师惠赠,用 LB 培养基培养。蛋白表达质粒 pET15b 和表达菌株 *Escherichia coli* BL21 为本实验室保存。NCM460 细胞(人结肠上皮细胞)由本实验室保存。

SctV 抗体由北大医学院抗体平台制备;抗 flag 标签抗体(mouse anti-flag)、鼠二抗(anti-mouse)和兔二抗(anti-rabbit), MBL 公司;预混 LB 培养基, BD 公司; FBS, BI 公司; RPMI 1640 培养基、PBS 中科迈晨(北京)科技有限公司; CCK-8 试剂盒购自 MedChemExpress 公司; RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量试剂盒 TB Green Premix *Ex Taq* II 购自 TaKaRa 公司;小分子化合物购自上海毕得医药公司。

本文所用引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,见表 1。

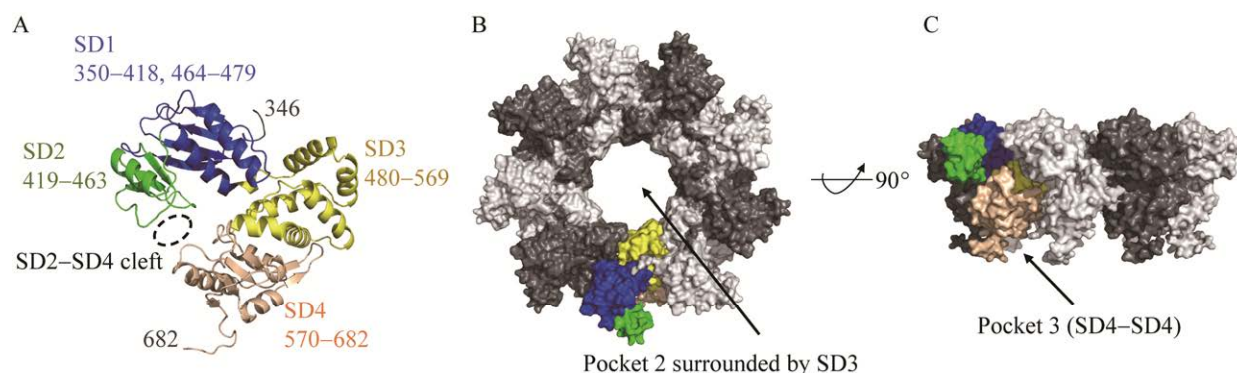


图 1 SctV<sub>C</sub> 单体和九聚体结构<sup>[31]</sup>

Figure 1 Structures of SctV<sub>C</sub> monomer and nonamer<sup>[31]</sup>. A-C: SctV<sub>C</sub> forms a stable homo-nonameric ring consisting of four domains SD1-SD4.

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primes name	Function	Sequences (5'→3')
hilA-F	Activates the expression of invasion genes and SPI-1 apparatus genes	CTCCGGGCAGATGATACCC
hilA-R		GCAAGAGAGAAGCGGGTTGG
SctV-F	Inner membrane protein in export apparatus	GAGAAACTCCGGGAGCTTGG
SctV-R		CGCTTCCAGTTGGTCCAGC
invF-F	Transcriptional regulator required for the expression effector proteins (SipABCD)	CAACCAGCGGCAACACGAT
invF-R		CGCCATACGCCAGTTTCGTA
invG-F	Out membrane protein in basal body	GCAACGATAAGACGCCGCA
invG-R		GTGTATAACCCCCGACCAGC
hilD-F	Regulator, derepress <i>hilA</i> expression	CGAACCTGGGATGTTGGTGC
hilD-R		GCATAGAGAGCGCCAAGTCG
hilC-F	Regulator, derepress <i>hilA</i> expression	GTGGCATGTCCACGGGTTTG
hilC-R		GGAAATCAAACCCACCGGGC
rstA-F	Regulator, derepress <i>hilA</i> expression	CGATTGTCCTGCTCACCTCG
rstA-R		GCTTTGCCGCAGGTGTAAGC
sicA-F	T3SS secretion associated chaperone required for SipB and SipC stabilization	GGCAGCAAAAGCCAGACAGT
sicA-R		CGCCTCCAGATAGACCAACG
prgH-F	Inner membrane protein in needle complex	GTTGTGGGCTCGTCAGGTTT
prgH-R		GTTGTGGGCTCGTCAGGTTT
rrsh-F	16S ribosomal RNA	CCGCATAACGTCGCAAGAC
rrsh-R		CCTCTCAGACCAGCTAGGG

## 1.2 方法

### 1.2.1 虚拟筛选

基于 SctVc 结构(PDB 2X49), 首先使用 Schrodinger 的 Protein Preparation Wizard 和 LigPrep 模块分别对蛋白结构和化合物库中的小分子进行预处理, 然后依次使用 Glide 中的 HTVs、SP 和 XP 模块进行 3 轮虚拟筛选, 每轮虚拟筛选中打分前 10% 的化合物进入下一轮筛选。接着对打分最高的 100 个化合物进行物类分析, 选出 25 个候选分子([https://targetmol.com/library-collection-2/Natural\\_Product\\_Library\\_for\\_CADD](https://targetmol.com/library-collection-2/Natural_Product_Library_for_CADD))。

最后, 使用 AMBER14 对 25 个候选分子和 SctVc 蛋白复合物结构进行分子动力学模拟, 蛋白和小分子分别使用 Amber14SB 和 GAFF 力场, 水分子使用 TIP3P 模型。经过多体系的系统优化和平衡, 每个蛋白-小分子复合物使用

PMEMD 进行了 10 ns 的分子动力学模拟。最终使用 AmberTools14 的 *cptraj* 模块计算候选分子在分子动力学模拟过程中的构象变化(root mean square deviations, RMSD), 进而评估候选分子与靶点蛋白结合的稳定性, 最终确定 18 个候选分子进行活性测定。

### 1.2.2 沙门氏菌 T3SS 效应蛋白分泌实验

菌株 *S. Typhimurium* UK-1 x8956 的 T3SS 调控基因前被插入了阿拉伯糖启动子, 通过阿拉伯糖诱导实现 T3SS 相关基因的高表达。将鼠伤寒沙门氏菌与终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$  的小分子化合物混合均匀, 体外添加阿拉伯糖诱导 T3SS 效应蛋白(SipA、SipB、SipC 和 SipD)的表达, 通过 SDS-PAGE 电泳来检测这些效应蛋白的表达量。等量的 myricetin 作为阳性对照, DMSO 作为阴性对照<sup>[33]</sup>。鞭毛蛋白 FilC 作为定量蛋白, 以此为内参检测各泳道上样量是否一致。

### 1.2.3 鼠伤寒沙门氏菌生长曲线测定

将 *S. Typhimurium* UK-1 单克隆接种于 3 mL 的 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 次日按照 1% (体积分数) 转接至 1.3 mL LB 液体培养基, 加入终浓度 0.02% 的阿拉伯糖诱导 T3SS 表达。实验组加入小分子抑制剂, 对照组加入等量 DMSO。混匀后按照 400  $\mu$ L/孔分装于 48 孔板中, 37 °C、450 r/min 振荡培养, 每间隔 15 min 测定 1 次  $OD_{600}$  值, 共测定 6 h。

### 1.2.4 小分子化合物对鼠伤寒沙门氏菌侵袭能力的影响测试

#### 1) CCK-8 试剂盒检测小分子对细胞的毒性

检测小分子抑制剂 C4 和 C5 对细胞生长的影响。在 96 孔板上, 每孔加入 100  $\mu$ L 细胞悬液, 约 5 000 个细胞, 37 °C、5%  $CO_2$  培养过夜。然后向 96 孔板中加入 20  $\mu$ L 用 RPMI 1640 培养基(10% FBS)稀释好的不同浓度小分子抑制剂和 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 37 °C、5%  $CO_2$  培养 4 h 后用酶标仪测定  $OD_{450}$ 。细胞的生存率计算公式: 生存率(%)=(实验组  $OD_{450}$ -空白组  $OD_{450}$ )÷(阴性组  $OD_{450}$ -空白组  $OD_{450}$ ) $\times$ 100。

#### 2) 庆大霉素保护实验

测定小分子抑制剂对鼠伤寒沙门氏菌侵袭能力的影响。在 12 孔板的每个孔加入 1 mL 细胞悬液, 细胞密度约  $2.5\times 10^4$ /mL, 同时挑取 *S. Typhimurium* UK-1 单克隆接种于 3 mL LB 液体培养基, 25 °C、220 r/min 培养过夜。将培养过夜的沙门氏菌按照 1% (体积分数) 接种于含有 0.02% 阿拉伯糖的 LB 培养基中, 同时加入相应的小分子抑制剂, 37 °C 培养约 4 h 直至  $OD_{600}$  达到 0.9。按照 MOI=50 向预洗过的 12 孔板细胞中加入 0.5 mL 细菌悬液, 37 °C、5%  $CO_2$  放置 1 h, 模拟细菌侵染细胞的过程。随后用含有 100  $\mu$ g/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 培养基(10% FBS)去除未结合的细菌, 清洗细胞后, 每孔加

入 0.5 mL 1% Triton X-100 裂解细胞, 再向裂解液中补入 0.5 mL 的 LB 培养基。取 20  $\mu$ L 细胞裂解液, 加入 180  $\mu$ L PBS, 定位浓度 1, 再从浓度 1 中取 20  $\mu$ L, 加入 180  $\mu$ L PBS, 定位浓度 2。分别取 100  $\mu$ L 浓度 1 和浓度 2 菌液涂布于 LB 平板, 37 °C 倒置培养过夜, 对平板单克隆进行计数。浓度 1 的单克隆数 $\times$ 100, 浓度 2 的单克隆数 $\times$ 1 000, 即为每孔中入侵细胞的细菌数。

### 1.2.5 等温滴定量热实验

#### 1) SctV<sub>C</sub> 蛋白的纯化

SctV<sub>C</sub> 蛋白的表达纯化在 *E. coli* BL21 中进行, 利用表达质粒 pET15b, 在 SctV<sub>C</sub> 蛋白的 N 端插入 6 $\times$ his 标签, 并通过亲和层析富集 SctV<sub>C</sub> 蛋白, 经过亲和层析洗脱的 SctV<sub>C</sub> 蛋白经过离子交换层析和凝胶过滤层析柱进一步纯化, 最终 SctV<sub>C</sub> 蛋白被浓缩至 5 mg/mL, 保存于-80 °C。

#### 2) 等温滴定量热实验

用 20 mmol/L Hepes (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl 作为缓冲液纯化 SctV<sub>C</sub> 蛋白, 稀释到 50  $\mu$ mol/L, 将小分子抑制剂 C4 和 C5 溶于 DMSO, 并用相同的缓冲液稀释至 500  $\mu$ mol/L。设置缓冲液为空白对照。用 500  $\mu$ mol/L 的 C4/C5 滴定 SctV<sub>C</sub> 蛋白, 利用 MicroCal PEAQ-ITC 分析软件拟合曲线, 计算蛋白与小分子之间的  $K_d$  值。

### 1.2.6 荧光定量 PCR

将 *S. Typhimurium* UK-1 在 LB 培养基中 37 °C、220 r/min 培养过夜, 然后以 1% (体积分数) 转接至 3 mL LB 液体培养基, 加入终浓度 0.02% 的阿拉伯糖诱导 T3SS 表达。实验组加入终浓度 200  $\mu$ mol/L 的小分子, 对照组加入等量 DMSO, 37 °C、220 r/min 培养 4 h 后提取 RNA。去除 gDNA 后进行反转录, 得到的 cDNA 作为模板, 选用 TB green 染料定量 PCR 产物。结果

分析以鼠伤寒沙门氏菌 16S rRNA 基因为内参, 计算小分子抑制剂处理后的调控基因 mRNA 相对转录水平。计算公式:

$$\text{Relative mRNA level (sample/control)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{sample}) - \Delta C_T (\text{control})$$

$$\Delta C_T = C_T (\text{target gene}) - C_T (16S \text{ rRNA gene})$$

## 2 结果与分析

### 2.1 小分子抑制剂的筛选策略

首先以蛋白质数据库 PDB 中 SctVc 单体结构(PDB 2X49)作为筛选靶点, 寻找作用于 SctVc 蛋白 SD2-SD4 口袋的 T3SS 小分子抑制剂, 从而直接抑制效应蛋白与 SctVc 的结合。基于分子对接的打分值和聚类分析结果, 优选出 25 个候选小分子抑制剂, 进一步使用分子动力学模拟评估候选分子与靶点蛋白结合的稳定性, 最终筛选到 18 个候选分子(图 2)。

### 2.2 C4 和 C5 显著抑制 T3SS 效应蛋白的分泌

利用体外诱导沙门氏菌 T3SS 效应蛋白分泌实验对初筛得到的 18 个候选小分子进行初步评估, 结果如图 3 所示, 相较于 DMSO, 化合物 C3、C4、C5、C12 和 C13 处理沙门氏菌后效应蛋白(SipA、SipB、SipC 和 SipD)的分泌量有不同程度的下降, 说明这些小分子化合物对于效应蛋白的分泌有不同程度的抑制作用; 其中以 C3、C4 和 C5 的效果最为明显, 且 C3 对应泳道中内参蛋白 FilC 的表达量明显降低, 可能是由于 C3 对鼠伤寒沙门氏菌的生长有抑制作用。细菌生长曲线的结果也证实了这个猜测, 而 C4 和 C5 对于沙门氏菌的生长几乎无影响(图 4)。因此, C4 (纽莫康定 B0, CAS-ID: 135575-42-7)和 C5 (茜草素, CAS-ID: 81-54-9)能够显著抑制鼠伤寒沙门氏菌 T3SS 效应蛋白的分泌。基于以上结果, 拟对 C4 和 C5 开展后

续研究。

为进一步测定 C4 和 C5 对效应蛋白分泌的抑制是否作用于 T3SS, 对小分子化合物 C4 和 C5 的浓度依赖性进行了测定, 并对 SctV 蛋白和 SipC 蛋白的表达进行了 Western blotting 检测。通过 SDS-PAGE 结果可以看出, 小分子化合物 C4 和 C5 对 T3SS 效应蛋白分泌的抑制作用随浓度的增加而增强, 具有浓度依赖性, 而且在较低浓度(50  $\mu\text{mol/L}$ )下对 T3SS 仍表现出较强的抑制作用(图 5)。这表明 C4 和 C5 是典型的 T3SS 抑制剂。而 Western blotting 结果显示 C4 和 C5 处理后, SctV 蛋白和 SipC 蛋白的表达量有明显差异, 推测 C4 和 C5 的作用机制不同(图 5)。

### 2.3 C4 和 C5 抑制鼠伤寒沙门氏菌对 NCM460 细胞的侵染

为排除实验过程中 C4 和 C5 影响细胞的生长而导致鼠伤寒沙门氏菌侵染细胞的结果有偏差, 利用 CCK-8 试剂盒测定 C4 和 C5 对 NCM460 细胞生长的影响。通过实验结果可以看出, 与空白对照相比, C4 和 C5 对 NCM460 细胞生长无显著影响(图 6)。

利用庆大霉素保护实验来测定小分子抑制剂 C4 和 C5 对于沙门氏菌侵袭细胞的影响。设置 myricetin 为阳性对照, 空白对照 DMSO 的入侵率为 100%。从图 7 可以看出, 小分子抑制剂 C4 和 C5 均可显著抑制鼠伤寒沙门氏菌对 NCM460 细胞的侵袭( $P < 0.0001$ )。因此, C4 和 C5 通过抑制 T3SS 效应蛋白的分泌进一步影响鼠伤寒沙门氏菌对 NCM460 细胞的侵袭。

### 2.4 C4 和 C5 的作用机制

药物靶点的验证是药物筛选过程的关键环节, 因此利用等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)在体外检测 SctVc 与 C4、C5 之间的亲和力, 图 8 结果显示, C4 和 SctVc 蛋白未结合, C5 和 SctVc 蛋白有结合, 结合常数



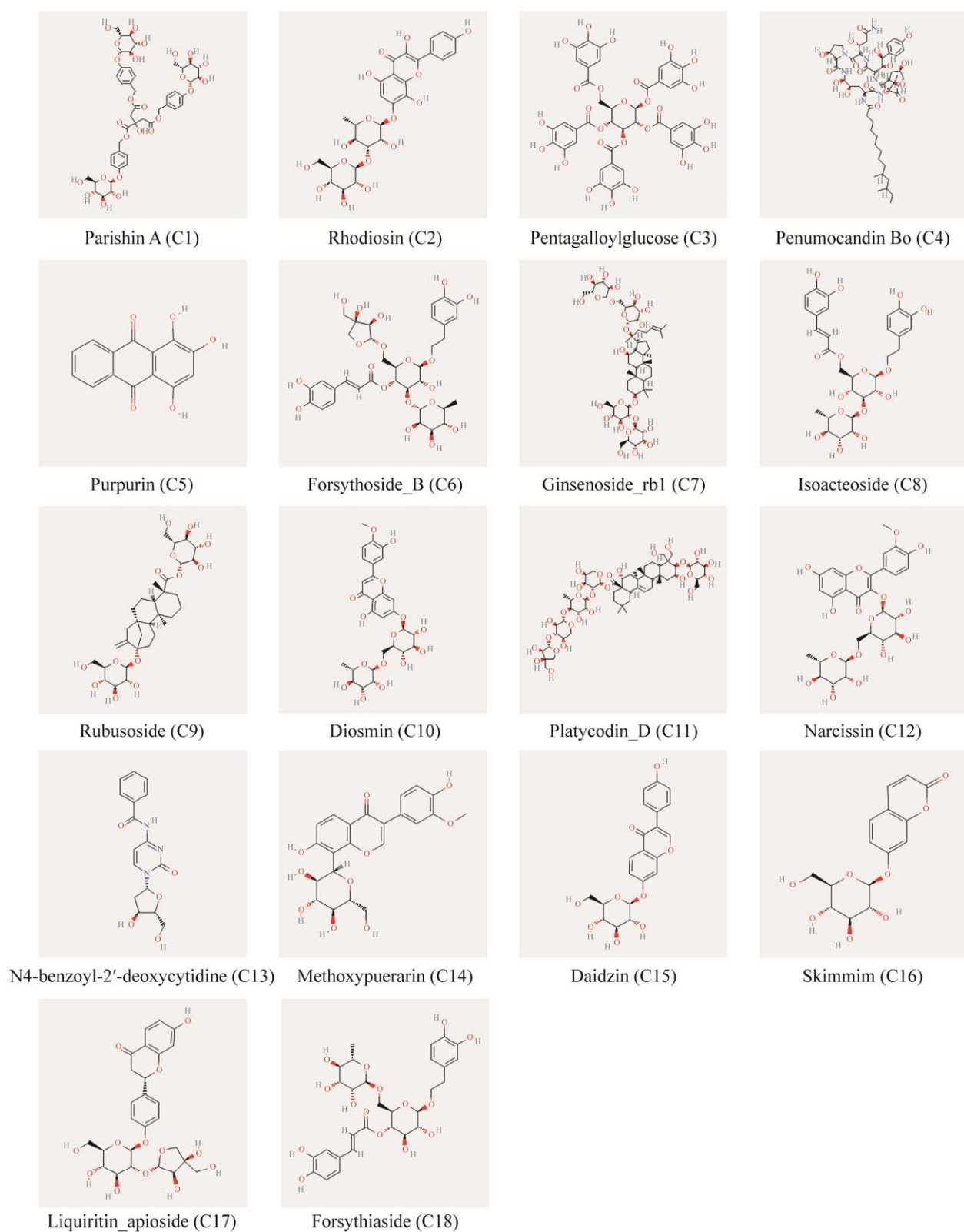


图 2 T3SS 抑制剂筛选结果

Figure 2 The screening results of T3SS inhibitors.



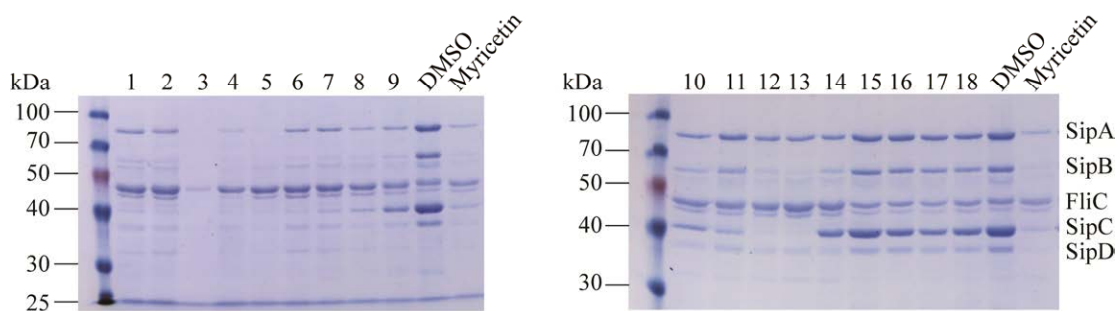


图3 候选化合物对 T3SS 分泌能力的影响 C1-C18: 化合物; DMSO: 阴性对照; Myricetin: 阳性对照  
Figure 3 Effects of different compounds on T3SS secretion. C1-C18: Compounds; DMSO: Negative control; Myricetin: Positive control.

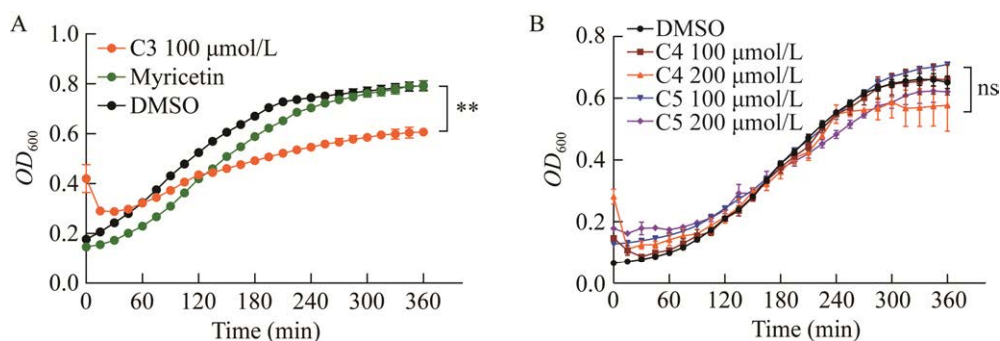


图4 化合物 C3 (A)和 C4、C5 (B)对鼠伤寒沙门氏菌生长的影响 \*\*:  $P < 0.01$ ; ns: 无显著差异  
Figure 4 Effects of compound C3 (A) and compounds C4 and C5 (B) on growth of *Salmonella* Typhimurium. \*\*:  $P < 0.01$ ; ns: No significant difference.

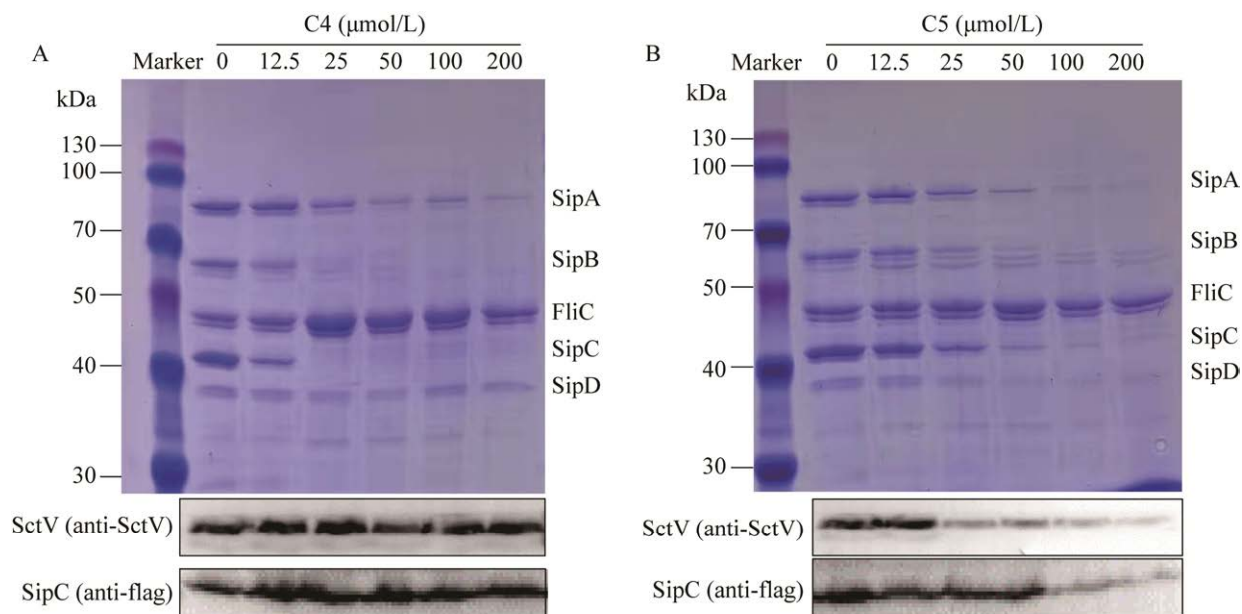


图5 不同浓度的 C4 (A)和 C5 (B)对 T3SS 分泌能力的影响  
Figure 5 Effect of compounds C4 (A) and C5 (B) with different concentrations on T3SS secretion.

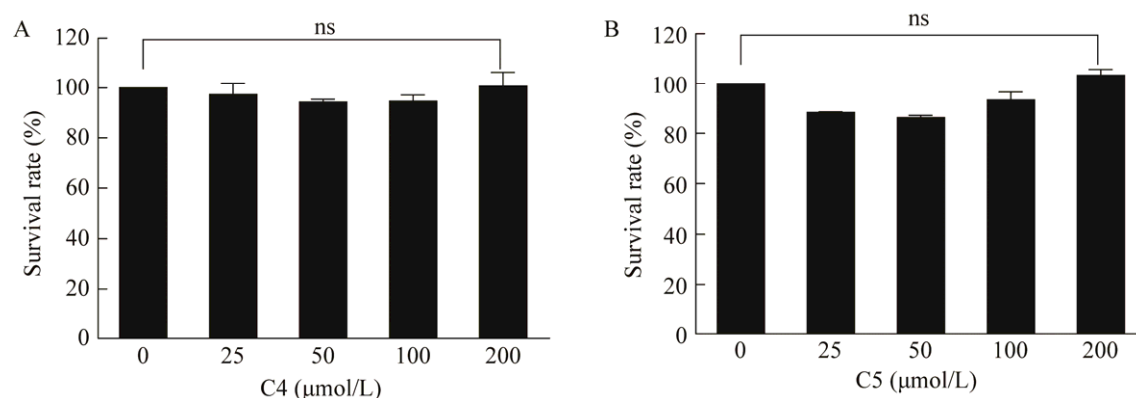


图 6 化合物 C4 (A)和 C5 (B)对 NCM460 细胞生长的影响 ns: 无显著差异

Figure 6 The cytotoxicity detection of compounds C4 (A) and C5 (B) toward NCM460 cells. ns: No signification difference.

约为 21  $\mu\text{mol/L}$ 。结合图 5 的 Western blotting 检测沙门氏菌 SctV 和效应蛋白 SipC 的表达水平的结果,发现不同浓度 C4 处理后的沙门氏菌均可正常表达 SctV 和 SipC,而对于 C5 处理的沙门氏菌, SctV 和 SipC 的表达量随 C5 的浓度增加而减少(图 5)。这表明 C4 的作用靶点不是 SctV<sub>C</sub>,而 C5 有可能通过与 SctV 结合来抑制其

功能,进而抑制 T3SS 效应蛋白的分泌。总而言之, C4 和 C5 是通过不同机制来抑制 T3SS 效应蛋白的分泌能力。

研究表明, T3SS 分泌效应蛋白基因和结构基因的转录受到 HilD-RtsA-HilC 调控网络的调控<sup>[33-34]</sup>。这三者之间既存在自我调控又存在相互调控, HilD 控制整个调控系统, HilC 和 RtsA 负责放大调控信号,最终通过 HilA 实现对 T3SS 效应蛋白和结构组分的调控。为进一步探究 C4 和 C5 的作用机制,我们对 T3SS 调控基因(*invF*、*hilD*、*hilC*、*rtsA*、*hilA*)、结构基因 *sctV*、效应蛋白基因 *sipA* 和伴侣蛋白基因 *sicA* 进行 RT-qPCR,测定 mRNA 水平,以此来确定 C4 和 C5 的作用靶点。

与 DMSO 对照组相比, C4 处理后的细菌 T3SS 相关调控基因的表达水平无明显改变,而 C5 处理后的 T3SS 结构组分 SctV、效应蛋白 SipA 和伴侣蛋白 SicA 的基因转录水平都受到了抑制, *hilD* 基因的下调进而引起 *hilC* 和 *rtsA* 基因转录水平的下调,从而抑制下游 T3SS 结构基因和效应蛋白表达,导致 T3SS 分泌水平的下降(图 9)。这个结果与前面提到的 Western blotting 的检测结果(图 5)一致。因此, C4 对 T3SS

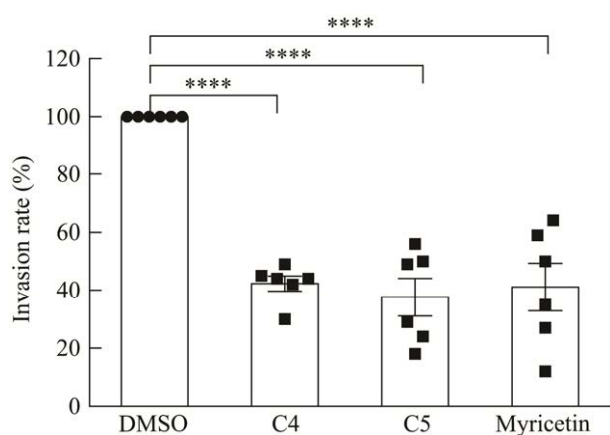


图 7 C4 和 C5 对鼠伤寒沙门氏菌侵袭能力的影响  
Figure 7 The effect of C4 and C5 on invasion of *Salmonella* Typhimurium. The rates of the invasion were calculated by setting the values of the blank control DMSO as 100%. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . The  $P$  value was calculated by comparing with the negative control DMSO. Myricetin: Positive control.

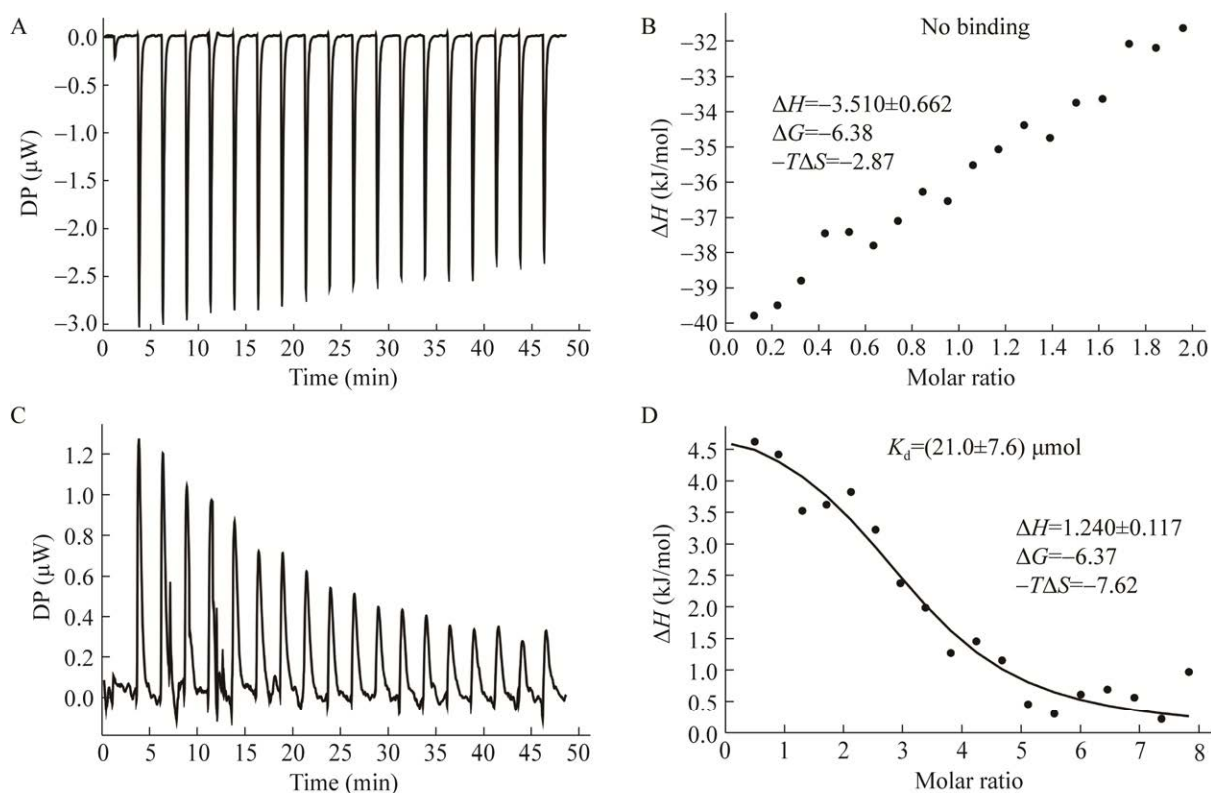


图 8 C4 (A、B)和 C5 (C、D)与 SctV<sub>C</sub> 蛋白的亲和力比较

Figure 8 Comparison of the affinities of C4 (A, B) and C5 (C, D) with SctV<sub>C</sub> by ITC.

的抑制作用并不是通过调控基因来实现, 有可能通过调控未知的通路或者结合 T3SS 的其他结构蛋白; 而 C5 虽然可以结合 SctVc, 但其对于 T3SS 的抑制作用可能主要是通过抑制 *hilD*

基因的表达, 从而下调抑制了下游效应蛋白和结构基因的转录水平, 导致细菌 T3SS 效应蛋白分泌减少, 最终表现为对 NCM460 细胞的侵袭能力下降。

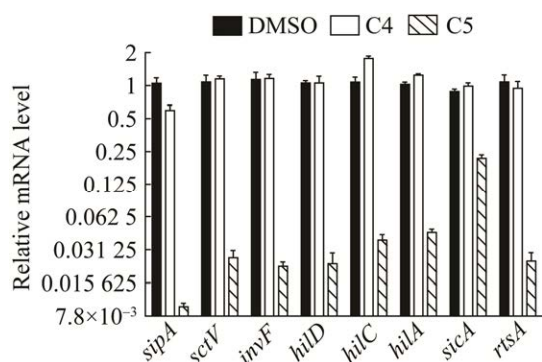


图 9 C4 和 C5 对 T3SS 相关基因 mRNA 相对水平的影响

Figure 9 The effect of C4 and C5 on the relative mRNA levels of T3SS genes.

### 3 讨论与结论

沙门氏菌是一种常见的肠道病原菌, 由其引起的疾病(如食物中毒)是最常见的食源性疾病之一, 全世界范围内每年有数以千万计的感染病例<sup>[2]</sup>。III 型分泌系统的组装和效应蛋白的分泌是沙门氏菌入侵宿主细胞的关键一步<sup>[35]</sup>, 而位于 T3SS 核心跨膜区的关键组分 SctV 蛋白是 T3SS 中最保守的组分之一, 在参与 T3SS 能量供应和底物分选、分泌的过程中发挥重要作用<sup>[17,24]</sup>。

前期我们对 SctV 家族蛋白胞内区的三维结构进行了研究,在此基础上,我们选择以 SctV 蛋白为新靶点,通过虚拟筛选得到 18 个小分子化合物。经过体外诱导沙门氏菌 T3SS 效应蛋白分泌实验和细菌生长曲线测定,初筛得到两个候选分子 C4 和 C5。进一步通过细胞实验确定了 C4 和 C5 能够有效抑制鼠伤寒沙门氏菌对 NCM460 细胞的侵染;并结合 ITC 实验检测 C4、C5 与 SctVc 蛋白的结合能力,其中 C4 与 SctVc 未结合,而 C5 可以与 SctVc 结合。结合荧光定量 PCR 的实验结果, C4 对 T3SS 分泌功能的抑制可能是作用于 T3SS 未知的调控通路或结合到 T3SS 的其他结构蛋白上;而 C5 虽然可以结合 SctVc,但会影响 SctV 蛋白和效应蛋白在细菌胞内的表达水平,因此 C5 更有可能是通过抑制调控基因 *hilD* 的表达来抑制 T3SS 效应蛋白分泌。虽然 C4 和 C5 未直接特异性地作用于 SctV,但是 C4 和 C5 通过不同的机制抑制了 T3SS 效应蛋白的分泌,达到抑菌而不杀菌的效果,这些化合物有望作为新型抗感染药物开发的前体药物,实现对一系列病原菌的广谱性抑制,有利于减缓细菌耐药性的发展,对保障民众身体与生命健康安全具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] KNODLER LA, ELFENBEIN JR. *Salmonella enterica*[J]. Trends in Microbiology, 2019, 27(11): 964-965.
- [2] KIRK MD, PIRES SM, BLACK RE, CAIPO M, CRUMP JA, DEVLEESSCHAUWER B, DÖPFER D, FAZIL A, FISCHER-WALKER CL, HALD T, HALL AJ, KEDDY KH, LAKE RJ, LANATA CF, TORGERSON PR, HAVELAAR AH, ANGULO FJ. World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis[J]. PLoS Medicine, 2015, 12(12): e1001921.
- [3] SABBAGH SC, FOREST CG, LEPAGE C, LECLERC JM, DAIGLE F. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 305(1): 1-13.
- [4] HERRERO-FRESNO A, ELMERDHAHL OLSEN J. *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host-a mini-review[J]. Food Microbiology, 2018, 71: 98-110.
- [5] van der HEIJDEN J, FINLAY BB. Type III effector-mediated processes in *Salmonella* infection[J]. Future Microbiology, 2012, 7(6): 685-703.
- [6] HELAINE S, CHEVERTON AM, WATSON KG, FAURE LM, MATTHEWS SA, HOLDEN DW. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters[J]. Science, 2014, 343(6167): 204-208.
- [7] KURTZ JR, ALAN GOGGINS J, McLACHLAN JB. *Salmonella* infection: interplay between the bacteria and host immune system[J]. Immunology Letters, 2017, 190: 42-50.
- [8] ELBEDIWI M, SHI DW, BISWAS S, XU XB, YUE M. Changing patterns of *Salmonella enterica* serovar Rissen from humans, food animals, and animal-derived foods in China, 1995-2019[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 702909.
- [9] KANIGA K, BOSSIO JC, GALÁN JE. The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins[J]. Molecular Microbiology, 1994, 13(4): 555-568.
- [10] GALÁN JE, CURTISS R 3rd. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(16): 6383-6387.
- [11] MICHIELS T, CORNELIS GR. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(5): 1677-1685.
- [12] HU YM, HUANG H, CHENG X, SHU XS, WHITE AP, STAVRINIDES J, KÖSTER W, ZHU GQ, ZHAO ZD, WANG YJ. A global survey of bacterial type III secretion systems and their effectors[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(10): 3879-3895.
- [13] MARSHALL NC, FINLAY BB. Targeting the type III secretion system to treat bacterial infections[J]. Expert

- Opinion on Therapeutic Targets, 2014, 18(2): 137-152.
- [14] DUNCAN MC, LININGTON RG, AUERBUCH V. Chemical inhibitors of the type three secretion system: disarming bacterial pathogens[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(11): 5433-5441.
- [15] HOTINGER JA, PENDERGRASS HA, MAY AE. Molecular targets and strategies for inhibition of the bacterial type III secretion system (T3SS); inhibitors directly binding to T3SS components[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 316.
- [16] BUTAN C, LARA-TEJERO M, LI WW, LIU J, GALÁN JE. High-resolution view of the type III secretion export apparatus *in situ* reveals membrane remodeling and a secretion pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(49): 24786-24795.
- [17] GALÁN JE, GINOCCHIO C, COSTEAS P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(13): 4338-4349.
- [18] 徐京华. 沙门氏菌III型分泌系统 SctV 家族蛋白结构与功能研究及抑制剂筛选分析[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2022.
- XU JH. Structural and functional analysis and inhibitors screening of SctV from the *Salmonella* T3SS[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2022 (in Chinese).
- [19] LEE PC, RIETSCH A. Fueling type III secretion[J]. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(5): 296-300.
- [20] KUHLEN L, JOHNSON S, CAO J, DEME JC, LEA SM. Nonameric structures of the cytoplasmic domain of FlhA and SctV in the context of the full-length protein[J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0252800.
- [21] MATTHEWS-PALMER TRS, GONZALEZ-RODRIGUEZ N, CALCRAFT T, LAGERCRANTZ S, ZACHS T, YU XJ, GRABE GJ, HOLDEN DW, NANS A, ROSENTHAL PB, ROUSE SL, BEEBY M. Structure of the cytoplasmic domain of SctV (SsaV) from the *Salmonella* SPI-2 injectisome and implications for a pH sensing mechanism[J]. *Journal of Structural Biology*, 2021, 213(2): 107729.
- [22] YUAN B, PORTALIOU AG, PARAKRA R, SMIT JH, WALD J, LI YC, SRINIVASU B, LOOS MS, DHUPAR HS, FAHRENKAMP D, KALODIMOS CG, DUONG van HOA F, CORDES T, KARAMANOUS, MARLOVITS TC, ECONOMOU A. Structural dynamics of the functional nonameric type III translocase export gate[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(21): 167188.
- [23] MAJEWSKI DD, LYONS BJE, ATKINSON CE, STRYNADKA NCJ. Cryo-EM analysis of the SctV cytosolic domain from the enteropathogenic *E. coli* T3SS injectisome[J]. *Journal of Structural Biology*, 2020, 212(3): 107660.
- [24] ABRUSCI P, VERGARA-IRIGARAY M, JOHNSON S, BEEBY MD, HENDRIXSON DR, ROVERSI P, FRIEDE ME, DEANE JE, JENSEN GJ, TANG CM, LEA SM. Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(1): 99-104.
- [25] JENSEN JL, YAMINI S, RIETSCH A, SPILLER BW. “The structure of the Type III secretion system export gate with CdsO, an ATPase lever arm”[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(10): e1008923.
- [26] TERAHARA N, INOUE Y, KODERA N, MORIMOTO YV, UCHIHASHI T, IMADA K, ANDO T, NAMBA K, MINAMINO T. Insight into structural remodeling of the FlhA ring responsible for bacterial flagellar type III protein export[J]. *Science Advances*, 2018, 4(4): eaao7054.
- [27] ERHARDT M, WHEATLEY P, KIM EA, HIRANO T, ZHANG Y, SARKAR MK, HUGHES KT, BLAIR DF. Mechanism of type-III protein secretion: regulation of FlhA conformation by a functionally critical charged-residue cluster[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(2): 234-249.
- [28] INOUE Y, OGAWA Y, KINOSHITA M, TERAHARA N, SHIMADA M, KODERA N, ANDO T, NAMBA K, KITAO A, IMADA K, MINAMINO T. Structural insights into the substrate specificity switch mechanism of the type III protein export apparatus[J]. *Structure*, 2019, 27(6): 965-976.e6.
- [29] MINAMINO T, INOUE Y, KINOSHITA M, NAMBA K. FliK-driven conformational rearrangements of FlhA and FlhB are required for export switching of the flagellar protein export apparatus[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(3): e00637-e00619.
- [30] GALÁN JE. Common themes in the design and function of bacterial effectors[J]. *Cell Host & Microbe*,

- 2009, 5(6): 571-579.
- [31] XU JH, WANG JQ, LIU AJ, ZHANG YQ, GAO X. Structural and functional analysis of SsaV cytoplasmic domain and variable linker states in the context of the InvA-SsaV chimeric protein[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(3): e0125121.
- [32] XING Q, SHI K, PORTALIOU A, ROSSI P, ECONOMOU A, KALODIMOS CG. Structures of chaperone-substrate complexes docked onto the export gate in a type III secretion system[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1773.
- [33] LÜ QH, LV YZ, DOU XY, LANAN WASSY S, JIA GB, WEI LJ, YU QL, DENG XM, ZHANG CJ, WANG JF. Myricetin inhibits the type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by downregulating the *Salmonella* pathogenic island I gene regulatory pathway[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 150: 104695.
- [34] PAREDES-AMAYA CC, VALDÉS-GARCÍA G, JUÁREZ-GONZÁLEZ VR, RUDIÑO-PIÑERA E, BUSTAMANTE VH. The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(17): 6578-6592.
- [35] 汤佩佩, 蔺志杰, 潘志明, 焦新安. 沙门菌 T3SS 相关效应蛋白作用机制的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 277-280, 288.
- TANG PP, LIN ZJ, PAN ZM, JIAO XA. Research progress on T3SS relative effector protein of *Salmonella*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2015, 31(3): 277-280, 288 (in Chinese).