

研究报告

N-十一烷酰基环戊酰胺对铜绿假单胞菌生物被膜及毒力的影响

蔺妍妍, 姚慧慧, 刘亚利, 宋文涛, 黎梦姣, 唐德平*

兰州交通大学生物与制药工程学院, 甘肃 兰州 730070

蔺妍妍, 姚慧慧, 刘亚利, 宋文涛, 黎梦姣, 唐德平. N-十一烷酰基环戊酰胺对铜绿假单胞菌生物被膜及毒力的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 5015-5030.

LIN Yanyan, YAO Huihui, LIU Yali, SONG Wentao, LI Mengjiao, TANG Deping. N-Undecanoyl cyclopentamide affects the biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 5015-5030.

摘要:【背景】铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)耐药性问题日趋严重的重要原因之一是细菌生物被膜的产生, 群体感应(quorum sensing, QS)系统在其生物被膜形成过程中发挥了重要作用。QS 抑制剂能够抑制生物被膜的形成和毒力因子的分泌, 成为解决细菌耐药性问题的新策略。【目的】通过化学方法对 las 系统信号分子 N-(3-氧十二烷基)-L-高丝氨酸内酯[N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, OdDHL]的母核和酰基侧链同时改变, 合成 N-十一烷酰基环戊酰胺, 命名为 Y0-C11-HSL, 探讨其对 *P. aeruginosa* 生物被膜形成和毒力因子分泌的作用潜力和分子机制。【方法】采用结晶紫染色和扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)评价 Y0-C11-HSL 对生物被膜形成和结构的影响, 通过测定毒力因子的产生和运动试验评析 Y0-C11-HSL 的抑制活性, 通过傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)研究 Y0-C11-HSL 对胞外聚合物(extracellular polymers, EPS)表面化学基团的影响, 采用分子对接进一步解析 Y0-C11-HSL 的作用机制。【结果】与对照组相比, 在 10–200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度下, Y0-C11-HSL 能够减少 *P. aeruginosa* 生物被膜形成, 且在 200 $\mu\text{mol/L}$ 时减少率达 24.1% ($P<0.01$)。此外, 在 200 $\mu\text{mol/L}$ 处理下, Y0-C11-HSL 能够显著抑制绿脓菌素、鼠李糖脂、胞外多糖和水解蛋白酶的分泌, 抑制率分别为 34.7% ($P<0.01$)、33.1% ($P<0.01$)、27.3% ($P<0.01$)和 37.3% ($P<0.01$), 抑制 swarming 和 twitching 运动, 抑制率分别为 45.6% ($P<0.01$)和 51.7% ($P<0.01$), 影响了 EPS 表面化学基团。分子对接结果表明, Y0-C11-HSL 能与 OdDHL 结合的 LasR 受体蛋白竞争性结合。【结论】Y0-C11-HSL 能与 OdDHL 结合的 LasR 受体蛋白竞争性结合, 对转录蛋白产生影响, 进而下

资助项目: 国家自然科学基金地区基金(32160025); 甘肃省自然科学基金(20JR10RA224); 甘肃省高等学校创新基金(2020A-041)

This work was supported by the Regional Fund of the National Natural Science Foundation of China (32160025), the Natural Science Foundation of Gansu Province (20JR10RA224), and the Higher Education Innovation Fund of Gansu Province (2020A-041).

*Corresponding author. E-mail: tangdp@mail.lzjtu.cn

Received: 2023-04-19; Accepted: 2023-06-21; Published online: 2023-07-24

调 *P. aeruginosa* QS 相关基因的表达。

关键词: 铜绿假单胞菌; 生物被膜; 毒力因子; 群体感应抑制剂; Y0-C11-HSL

N-Undecanoyl cyclopentamide affects the biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*

LIN Yanyan, YAO Huihui, LIU Yali, SONG Wentao, LI Mengjiao, TANG Deping*

School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: **[Background]** Biofilm formation is one of the major reasons for the increasing drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, and the quorum sensing (QS) system plays a key role in biofilm formation. **[Objective]** QS inhibitors can inhibit the formation of biofilm and the secretion of virulence factors, serving as a new approach to address drug resistance. We chemically altered both the parent nucleus and acyl side chains of the las QS signaling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) to synthesize N-undecanoyl cyclopentamide, named Y0-C11-HSL, aiming to reveal the effects of Y0-C11-HSL on the biofilm formation and virulence factor secretion of *P. aeruginosa* and the underlying molecular mechanism. **[Methods]** Crystal violet staining and scanning electron microscopy (SEM) were employed to evaluate the effects of Y0-C11-HSL on the biofilm formation and structure. The inhibitory activity of Y0-C11-HSL was assessed by measuring the production and movement of virulence factors. The effect of Y0-C11-HSL on the surface chemical groups of extracellular polymers (EPS) was investigated by Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR), and the mechanism of action of Y0-C11-HSL was studied by molecular docking. **[Results]** Compared with the control group, 10–200 $\mu\text{mol/L}$ Y0-C11-HSL reduced the biofilm formation of *P. aeruginosa*, and the reduction rate reached 24.1% at 200 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). In addition, 200 $\mu\text{mol/L}$ Y0-C11-HSL inhibited the secretion of pyocyanin, rhamnolipid, extracellular polysaccharide, and hydrolytic protease by *P. aeruginosa*, with the inhibition rates of 34.7% ($P < 0.01$), 33.1% ($P < 0.01$), 27.3% ($P < 0.01$), and 37.3% ($P < 0.01$), respectively. Furthermore, Y0-C11-HSL inhibited the swarming and twitching of *P. aeruginosa*, with the inhibition rates of 45.6% ($P < 0.01$) and 51.7% ($P < 0.01$), respectively, and it affected the EPS surface chemical groups. The molecular docking results showed that Y0-C11-HSL competitively bound to the OdDHL-bound LasR receptor. **[Conclusion]** Y0-C11-HSL could competitively bind to OdDHL-bound LasR receptor to affect the transcriptional proteins and thus down-regulate the expression of *P. aeruginosa* QS-related genes.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; virulence factors; quorum sensing inhibitor; Y0-C11-HSL

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种自然界广泛存在的非发酵革兰氏阴性杆状细菌^[1],也是一种最常见的条件致病菌,在医院内极易引发感染^[2-3]。*P. aeruginosa*可在正常人的皮肤表面、呼吸道和黏膜组织等部位定殖^[4-5]。此外,该菌对不同环境具有很好的适应性、侵袭性和产毒性^[6]。在上皮损伤或人体免疫力低下时,如手术创伤和侵入性诊疗后引起的机械性损伤^[2,7]、呼吸机相关性肺炎^[8]和囊性纤维化引起的慢性肺炎^[9]等,*P. aeruginosa*能够引起局部和全身感染。这些感染的高发病率主要因为*P. aeruginosa*容易在宿主细胞表面形成生物被膜,并分泌大量的弹性蛋白酶、绿脓菌素和鼠李糖脂等毒力因子,能够对宿主造成损害并克服宿主免疫反应,促进感染^[10]。尽管新型的抗菌药物不断被发现,但*P. aeruginosa*仍然表现出很高的致死率,在20%–60%之间^[11]。因此,开发新的治疗方法显得尤为重要。

生物被膜的形成是*P. aeruginosa*内在耐药性机制之一^[12],是细菌免遭抗菌剂侵害的一种保护性屏障^[13]。据估计,微生物导致的慢性感染有80%与生物被膜形成相关^[14]。研究发现,群体感应(quorum sensing, QS)在调节细菌毒力的产生和生物被膜的形成中发挥着重要作用,被认为是应对细菌感染和抗生素耐药性的一种新的潜在治疗策略^[15-16]。目前针对*P. aeruginosa*的*las*、*rhl*和*pqs*(*Pseudomonas* quinolone signal)这3个主要的QS系统研究最多,它们与*P. aeruginosa*的致病性和慢性感染的建立密切相关^[17]。*las*、*rhl*系统由酰基高丝氨酸内酯(acyl-homoserine-lactones, AHLs)信号分子介导,其中*las*系统信号分子为N-(3-氧十二烷基)-L-高丝氨酸内酯[N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, OdDHL],*rhl*系统信号分子为N-丁酰-L-高丝氨酸内酯(N-butanoyl-L-homoserine lactone,

BHL),*pqs*系统信号分子为2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮(*Pseudomonas* quinolone signal, PQS),每一种信号分子都充当特定传感和响应系统自诱导剂^[18],一旦这些信号达到“群体水平”^[19],细菌将响应这一变化并通过级联信号传导来调控体内QS相关基因的表达,形成生物被膜及分泌毒力因子^[20]。

QS抑制剂作为一种抗毒力因子疗法,能够干扰QS系统,减弱QS介导的毒力^[21],且与传统抗生素相比,具有不抑制细菌生长、不使细菌出现生长压力及较低的细菌耐药性发生率等优势。已知干扰细菌QS系统的方式有3种:(1)抑制*lasI*、*rhlI*的基因活性或下调LasR、RhlR受体的结合位点,抑制QS信号分子的生物合成;(2)利用内酯酶、酰化酶氧化还原酶等对AHL信号分子进行降解失活;(3)利用信号分子结构类似物竞争性地与其同源调节蛋白结合,导致AHL活性降低^[22]。AHLs由一个高丝氨酸内酯(hormone-sensitive lipase, HSL)环和一个酰基侧链组成,侧链长度可以在4–18个碳原子之间发生变化,除酰基链的长度外,AHL在酰基链的饱和态和第3位的氧化态上也会有所不同^[23]。各种合成先导物和天然类似物作为AHL的拮抗剂已有报道^[24]。基于此,本文通过化学方法对*las*系统信号分子OdDHL的母核和酰基侧链同时改变,合成一种AHL类似物,研究该化合物对*P. aeruginosa*生物被膜的形成、毒力的分泌、运动性以及胞外聚合物(extracellular polymers, EPS)表面化学基团的影响,并通过分子对接对该化合物作用机理进行探究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

铜绿假单胞菌 ATCC 15692,保存于兰州交

通大学生物与制药工程学院实验室。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0。

Proteose peptone glucose ammonium salts (PPGAS)培养基(g/L): 氯化铵 1.1, 氯化钾 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, 葡萄糖 5.0, 蛋白胨 10.0, Tris-HCl 14.5, pH 7.2。

群集(swarming)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母提取物 5.0, 琼脂 5.0, 葡萄糖 5.0, pH 6.4。

抽搐(twitching)培养基: 含 12 g/L 琼脂的 LB 固体培养基。

脱脂牛奶固体平板(g/L): (A 液)脱脂奶粉 40.0, (B 液)琼脂 30.0, 103 kPa 灭菌 20 min 后将 A、B 液混匀, 制备平板, 凝固后倒置过夜, 用无菌打孔器打孔备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

Y0-C11-HSL 由实验室合成; 二氯甲烷(CH_2Cl_2), 利安隆博华(天津)医药化学有限公司; 环戊胺和十一烷酰氯, 上海麦克林生化科技有限公司; 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 西陇科学股份有限公司。pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; 多功能酶标仪, 北京普朗新技术有限公司; 红外-拉曼光谱仪和超导液相核磁共振波谱仪, 布鲁克分析仪器公司; 立式高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器

厂; 真空冷冻干燥系统, 浙江江南制药机械有限公司; 离子溅射喷金仪, 南京覃思科技有限公司; 场发射扫描电子显微镜, 卡尔蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 化合物 Y0-C11-HSL 的合成及表征

通过化学方法对 las 系统信号分子 OdDHL 的母核和酰基侧链同时改变, 合成 N-十一烷基环戊酰胺化合物, 命名为 Y0-C11-HSL。Y0-C11-HSL 化学合成反应如图 1 所示, 具体过程: 在冰浴条件下将 100 mmol/L 环戊胺(改变 OdDHL 母核结构)加入到含有 10 mL CH_2Cl_2 的圆底烧瓶中, 再逐滴加入 10 mmol/L 十一烷酰氯(改变 OdDHL 酰基侧链结构), 反应 30 min 后撤去冰浴, 在室温搅拌条件下继续反应 14 h, 并通过薄层色谱法监测反应; 反应结束后, 分别用等体积的 5% (体积分数)的 NaHCO_3 溶液、1 mol/L HCl、饱和 NaCl 溶液洗涤, 收集有机相并加入足量无水 MgSO_4 除去残留的水分, 浓缩, 产物经核磁共振(nuclear magnetic resonance, ^1H NMR)测定后, 与目标产物 ^1H NMR 一致, 确定为 Y0-C11-HSL, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 密封保存备用。

1.2.2 菌株的培养条件

在无菌条件下, 用灭菌牙签挑取粉末菌并添加到 50 mL LB 液体培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、150 r/min 培养过夜。

1.2.3 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 生物被膜形成的影响

将对数期(2.8×10^9 CFU/mL)菌液用新鲜的 PPGAS 培养基稀释至菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL,

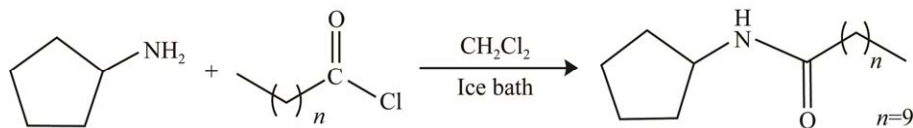


图 1 化合物 Y0-C11-HSL 的化学合成方法

Figure 1 Methods for the chemical synthesis of compound Y0-C11-HSL.

分组并标记。试验组加入 Y0-C11-HSL (终浓度分别为 10、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$), 对照组为含有 0.3% DMSO 的菌液, 每孔加入 150 μL 混合液, 每组设 6 个平行。将 96 孔板用纱布覆盖后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静态孵育 24 h, 弃菌悬液, 生物被膜用无菌磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤 3 次, 每孔继续加入 150 μL 0.5% 的结晶紫染色 15 min, 弃结晶紫溶液, 用 PBS 缓冲液洗涤各孔, 以除去游离的结晶紫, 室温晾干后加入 33% 的醋酸溶解结晶紫, 测 OD_{570} 量化生物被膜的形成^[25]。

1.2.4 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 生长的影响

将获得的菌液 (1×10^7 CFU/mL) 分组并标记。试验组加入 Y0-C11-HSL (终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$), 对照组为浓度是 0.3% DMSO 的菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 24 h, 每隔 2 h 测定 OD_{600} ^[26]。重复 3 次。

1.2.5 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 生物被膜结构的影响

将无菌盖玻片置于 6 孔板中, 试验组加入 2 mL 含有终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Y0-C11-HSL 的菌液 (1×10^7 CFU/mL), 对照组加入等量终浓度为 0.3% DMSO 的菌液, 每组 3 个平行。37 $^{\circ}\text{C}$ 静态孵育 3 d, 弃上清液, 用无菌 PBS 洗涤去除浮游细菌, 用 2.5% 戊二醛溶液固定过夜。用无菌 PBS 将膜轻轻冲洗 3 次, 然后分别用梯度乙醇 (50%、70%、80%、90% 和 95%) 各脱水 15 min, 100% 乙醇脱水 2 次, 每次 20 min。将 6 孔板放置在真空冷冻干燥机中干燥 24 h, 然后利用离子溅射仪对样品喷金, 增加其导电性。最后通过扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察生物被膜的形态和结构, 放大倍数为 4 000 倍^[27]。

1.2.6 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 毒力因子的影响

绿脓菌素测定采用氯仿-盐酸双向萃取法^[28]。将获得的菌液分装在无菌三角瓶中, 试验组加入 Y0-C11-HSL, 终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$, 对照组是浓度为 0.3% DMSO 的菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 16 h, 4 000 r/min 离心 10 min 后用 0.22 μm 过滤器过滤, 保留上清液。将上清液与氯仿按 5:3 的体积比加入 10 mL 离心管中充分振荡 1 min 后萃取, 用 1 mL 0.2 mol/L 盐酸对有机相进行反向萃取, 测定 OD_{520} ^[29]。

鼠李糖脂的测定采用苔黑酚-浓硫酸法。同绿脓菌素测定方法中获得的菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 48 h。4 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液并用浓盐酸调 pH 值为 2.0, 取 2 mL 上清液加入等体积乙酸乙酯, 萃取 2 次, 彻底挥发乙酸乙酯后加入 500 μL 去离子水溶解鼠李糖, 向 900 μL 苔黑酚-浓硫酸溶液中加入 100 μL 鼠李糖, 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min, 待反应液冷却后测定 OD_{421} ^[30]。

胞外多糖的测定采用苯酚-浓硫酸法。同绿脓菌素测定方法中获得的菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 24 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 将上清液用 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 取 2 mL 滤液加入 1 mL 6% 苯酚和 5 mL 浓硫酸, 摇匀, 待冷却后测定 OD_{490} ^[31]。

水解蛋白酶的测定方法采用脱脂牛奶固体平板法。将胞外多糖测定方法中获得的滤液取 20 μL 加入脱脂牛奶平板预先打好的孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后测量透明圈的大小^[32]。

1.2.7 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 运动性的影响

对 swarming 运动的影响: 将 swarming 培养基灭菌后, 冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 试验组加入 Y0-C11-HSL (终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$), 对照组是

浓度为 0.3% DMSO 的菌液,充分混匀后制备固体平板,待平板凝固后倒置培养过夜;然后将 2 μL 培养至 2.8×10^9 CFU/mL 的菌液加入平板中央,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,测量孵育部位周围的迁移距离^[33]。

对 twitching 运动的影响:将 twitching 培养基灭菌后,冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右,试验组加入 Y0-C11-HSL (终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$),对照组是浓度为 0.3% DMSO 的菌液,充分混匀后制备固体平板,待平板凝固后倒置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,用无菌牙签挑取培养至 2.8×10^9 CFU/mL 的菌悬液,刺过琼脂层到培养皿底部,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h,小心地弃去培养基,然后用 0.1% 的结晶紫溶液将平板上的 twitching 环染色,测量染色区的直径以评估 *P. aeruginosa* twitching 运动^[34]。

1.2.8 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 胞外聚合物表面基团的影响

将获得的工作菌分装至无菌三角瓶,试验组加入 Y0-C11-HSL (终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$),对照组是浓度为 0.3% DMSO 的菌液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 24 h,取 10 mL 培养液于 4 000 r/min 离心 10 min 弃上清液,用无菌水重悬,再次离心,重复 3 次。沉淀在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下速冻 10 min,然后真空冷冻干燥 24 h,样品与溴化钾按照 1:100 (质量比)的比例研磨并压片,用傅里叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)对样品表面化学基团进行检测^[35]。

1.2.9 分子对接分析

分子对接可用于验证分子相互之间的结合活性。本研究鉴于 LasR 蛋白在铜绿假单胞菌的 QS 系统中发挥着重要作用,选取 LasR 蛋白作为目标靶蛋白^[36],Protein Data Bank (PDB) ID 为 2uvo,在 PDB 数据库中获取,然后将 2uvo 指定为受体,将 OdDHL 和 Y0-C11-HSL 指定为配体,采用 AutoDock Vina 分子对接程

序进行对接。Pymol 软件用于分子结构和对接结合物的可视化。AutoDockTools 用于加氢,检查电荷,将原子类型指定为 AD4 类型,计算 gasteiger,并构建受体分子(2uvo)的对接网格盒。此外,配体小分子应确定 root,在 AutoDockTools 中选择配体的可扭转键。最后,在 AutoDockTools 中将受体分子和配体分子的格式从“.mol2”转换为“.PDBQT”,以便进一步对接。利用 Vina 对接后,计算小分子与 2uvo 蛋白组合的得分,并使用 Pymol 和 Discovery Studio 软件进行作用力分析和可视化。

1.2.10 统计学分析

采用 MestReNova.exe 对 Y0-C11-HSL 进行结构表征。采用 Origin 2021 软件对试验结果作图,统计分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别判定具有显著性和极显著性。

2 结果与分析

2.1 化合物 Y0-C11-HSL 的合成及表征

产物经 ^1H NMR 测定后,与目标产物 ^1H NMR 一致,确定为 Y0-C11-HSL, ^1H NMR 结果:(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.67 (d, $J=7.3$ Hz, 1H), 3.96 (h, $J=6.8$ Hz, 1H), 2.00 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.76 (dq, $J=12.9, 7.2, 6.8$ Hz, 2H), 1.65–1.57 (m, 2H), 1.52–1.43 (m, 4H), 1.34–1.20 (m, 16H), 0.85 (t, $J=6.8$ Hz, 3H)。产物产率为 85%。

2.2 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 生物被膜形成的影响结果

通过检测 Y0-C11-HSL 在终浓度为 10、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 时对 *P. aeruginosa* 生物被膜形成的影响,评估 Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 生物被膜形成的作用。与对照组相比,如图 2A 所示,Y0-C11-HSL 处理 24 h 后,当浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 *P. aeruginosa* 的生物被膜产量有显著影响,其中在 200 $\mu\text{mol/L}$ 时表现出更好

的抑制效果,其抑制率为 24.1% ($P<0.01$),因此后续试验基于此浓度进行。

在 200 $\mu\text{mol/L}$ Y0-C11-HSL 浓度时评估 *P. aeruginosa* 的生长情况,探究 Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 生长的影响。从图 2B 生长曲线中可以明显看出,与对照组相比,200 $\mu\text{mol/L}$ Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 浮游细胞的生长无显著影响。进一步表明 Y0-C11-HSL 降低

P. aeruginosa 生物被膜产生的同时,对细菌不产生生存压力。

2.3 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 生物被膜结构的影响结果

为了探究 200 $\mu\text{mol/L}$ Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 成熟生物被膜的分散作用,将获得的附着生物被膜的盖玻片在 SEM 下观察。如图 3 所示,对照组盖玻片表面覆盖有较厚

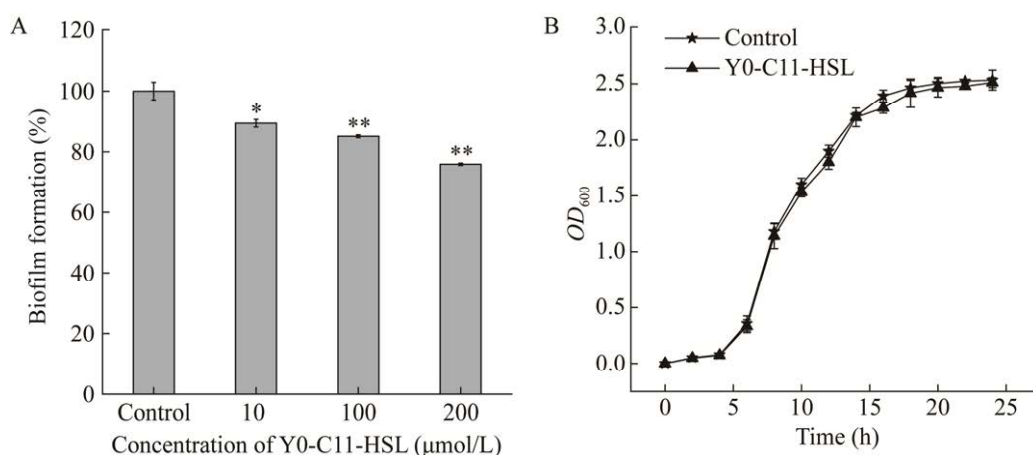


图 2 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 生物被膜形成及生长曲线的影响 A:不同浓度 Y0-C11-HSL 处理对 *P. aeruginosa* 生物被膜的影响. B: 200 $\mu\text{mol/L}$ Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 生长曲线的影响

Figure 2 Effect of Y0-C11-HSL on biofilm formation and growth curves in *Pseudomonas aeruginosa*. A: Effect of *P. aeruginosa* biofilm after treatment with different concentrations of Y0-C11-HSL. B: Effect of 200 $\mu\text{mol/L}$ Y0-C11-HSL on the growth curve of *P. aeruginosa*. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

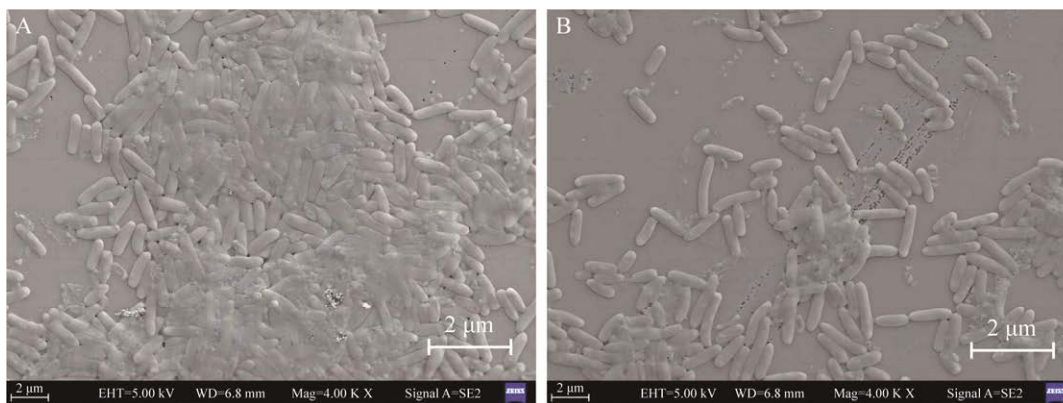


图 3 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 生物被膜结构的影响 A: 对照组. B: Y0-C11-HSL 试验组
Figure 3 Effect of Y0-C11-HSL on the biofilm structure in *Pseudomonas aeruginosa*. A: Control group. B: The Y0-C11-HSL experimental group.

的多糖基质, 单个细胞很少, 表明形成了较厚的三维生物被膜。与对照组相比, 试验组中附着在盖玻片表面的生物被膜数量显著减少, 多糖基质减少, 细胞分散, 能清晰地观察到 *P. aeruginosa* 形态特征, 进一步说明 Y0-C11-HSL 能够抑制生物被膜的产生。

2.4 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 毒力因子的影响结果

在终浓度是 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Y0-C11-HSL 存在下, 评估 *P. aeruginosa* 的绿脓菌素、鼠李糖脂、

胞外多糖和水解蛋白酶 4 种毒力因子的分泌情况。如图 4 所示, 与对照组相比, Y0-C11-HSL 对绿脓菌素、鼠李糖脂、胞外多糖和水解蛋白酶具有极显著的抑制作用, 其抑制率分别达到 34.7% ($P<0.01$)、33.1% ($P<0.01$)、27.3% ($P<0.01$) 和 37.3% ($P<0.01$)。

2.5 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 运动性的影响结果

在终浓度是 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Y0-C11-HSL 浓度下, 评估 *P. aeruginosa* 的 swarming 与 twitching

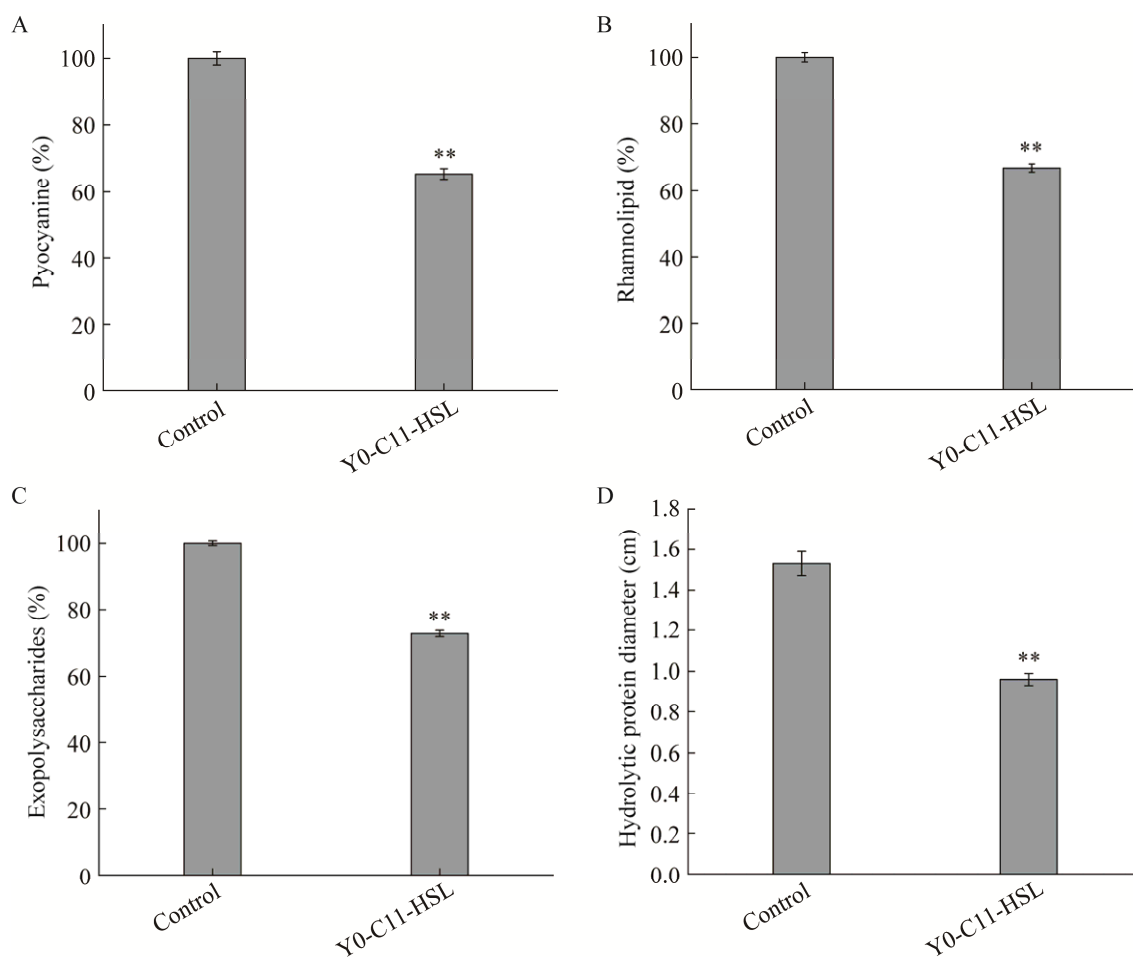


图 4 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 毒力因子的影响 A: 绿脓菌素的产生率. B: 鼠李糖脂的产生率. C: 胞外多糖的产生率. D: 水解蛋白酶在脱脂牛奶平板上的水解直径

Figure 4 Effect of Y0-C11-HSL on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. A: Production rate of pyocyanine. B: Production rate of rhamnolipid. C: Production rate of exopolysaccharides. D: Hydrolytic diameter of hydrolyzed proteases on skimmed milk plates. **: $P<0.01$.

运动。如图 5 所示,与对照组相比,Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 的 swarming 运动具有显著的抑制作用,抑制率达到 45.6% ($P<0.01$),同时对 twitching 运动也具有明显的抑制作用,抑制率为 51.7% ($P<0.01$)。结果表明, QS 抑制剂能够抑制铜绿假单胞菌的 swarming 与 twitching 运动,并对 swarming 运动抑制效果更好。

2.6 化合物 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 胞外聚合物表面基团的影响结果

通过红外光谱法对 EPS 表面的基团进行分

析,如图 6 所示,在 $500-4\,000\text{ cm}^{-1}$ 波段出现了较多的峰。其中,波数为 $3\,420\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰是由 O-H 伸缩振动产生的,是多糖的特征峰,表明产生了大量的多糖。波数为 $2\,926\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰是由 C-H 伸缩振动引起,波数为 $1\,640\text{ cm}^{-1}$ 处的峰是由于蛋白酰胺 I 带 C=O 伸缩振动所引起,波数为 $1\,000-1\,200\text{ cm}^{-1}$ 范围内出现的峰是单糖的特征峰^[37],波数为 $1\,330-1\,340\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰是 C=O 键的对称伸缩振动,表明多糖在此段吸收峰内含有羧基和一些苷类物质^[38]。

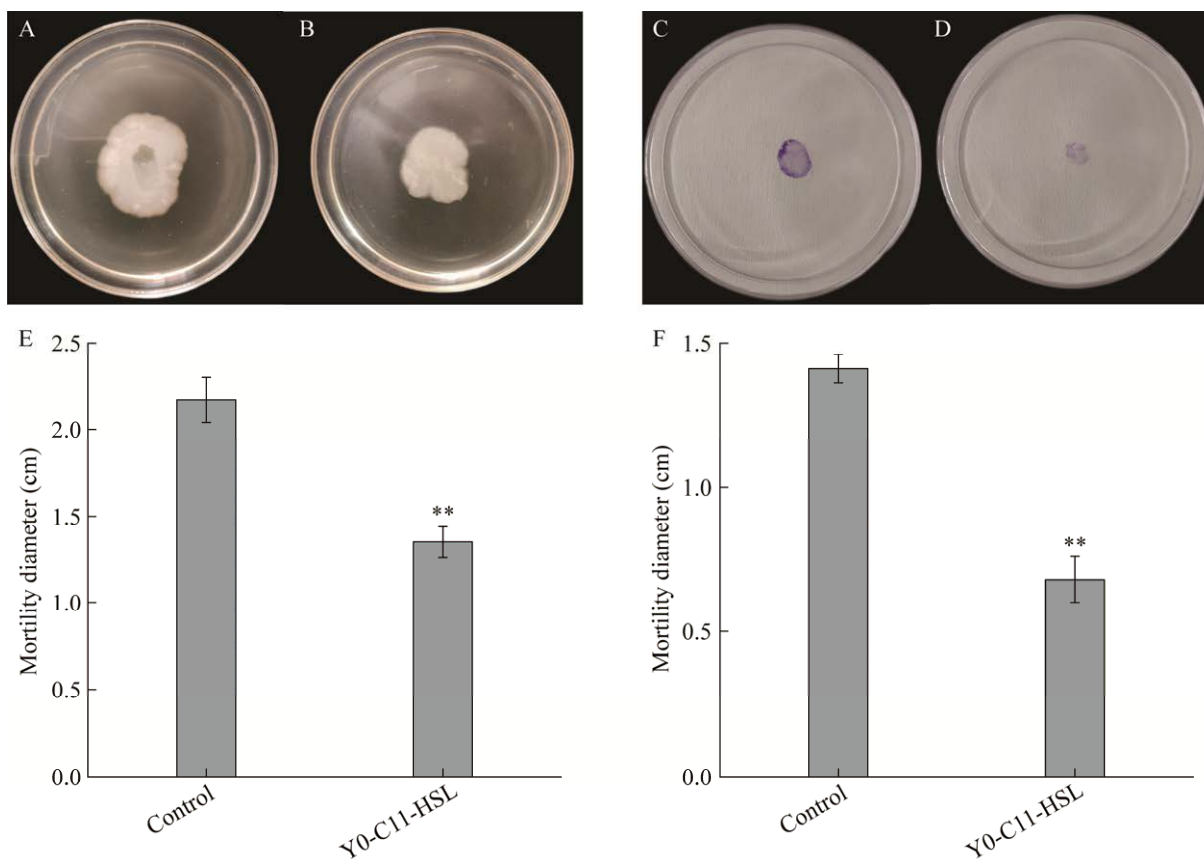


图 5 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 运动性的影响 A: Swarming 运动对照组. B: Swarming 运动 Y0-C11-HSL 试验组. C: Twitching 运动对照组. D: Twitching 运动 Y0-C11-HSL 试验组. E: Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* Swarming 的影响. F: Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* twitching 的影响

Figure 5 Effect of Y0-C11-HSL on the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. A: Swarming motilities control group. B: Swarming motilities Y0-C11-HSL experimental group. C: Twitching motilities control group. D: Twitching motilities Y0-C11-HSL experimental group. E: Effect of Y0-C11-HSL on *P. aeruginosa* swarming motilities. F: Effect of Y0-C11-HSL on *P. aeruginosa* twitching motilities. **: $P<0.01$.

从图 6 中可以明显看出, 试验组相较对照组吸收峰发生变化, 这表明 Y0-C11-HSL 对 EPS 表面 O-H、C=O 等吸电子基团有影响^[39]。

2.7 分子对接分析结果

AHL 合成酶 LasI 受到 *lasI* 基因的调控^[40]。因此, Y0-C11-HSL 对 *lasI* 基因的抑制活性可能最终反映为 OdDHL 减少积累。

如图 7 所示, Y0-C11-HSL 通过氢键的形成和疏水作用力有效地与 LasR 受体蛋白结合。表 1 显示, 受体分子(2uxo)与 Y0-C11-HSL 和 OdDHL 两个配体小分子之间的平均结合能均为 -5.8 kcal/mol。通常情况下, 当配体与靶蛋白的结合能小于 0 时可以自发结合。因此, Y0-C11-HSL 可能是与自诱导剂 OdDHL 结合的 LasR 受体蛋白结合, 进一步抑制 QS 基因的相对表达。Y0-C11-HSL 与 LasR 受体蛋白结合, 有 1 个残基与氢键相互作用, 有 11 个残基通过疏水作用力相互作用。OdDHL 与 Y0-C11-HSL 具有相似的空间结构, 并与 LasR 蛋白结合, 其中 1 个残基与氢键相互作用, 不同的是, Y0-C11-HSL

有 11 个残基通过疏水作用力相互作用, 而 OdDHL 只有 7 个残基通过疏水作用力相互作用。此外, OdDHL 可通过一条盐桥作用力与受体分子 2uxo 的 114 号 His 氨基酸残基结合, 但 Y0-C11-HSL 却不与这个氨基酸残基结合。不同的作用力不会影响蛋白与小分子的稳定结合, 因为 2 个小分子与受体分子(2uxo)之间的结合能均为 -5.8 kcal/mol, 受体分子(2uxo)与 2 个配体小分子之间均结合稳定。Y0-C11-HSL 和自诱导因子 OdDHL 有 7 个共同的相互作用残基位点: Asn-110、Leu-92、Val-96、Val-171、Ile-175、Leu-66 和 Leu-93。这 7 个活性位点可能在自诱导剂和 LasR 调节因子之间的结合中发挥重要作用, 并最终对转录蛋白产生影响。

3 讨论与结论

QS 是一种广泛被病原菌使用的系统^[41]。*P. aeruginosa* 通过 QS 系统级联调控不同毒力基因的表达, 形成生物被膜和分泌主要致病性毒力因子^[6]。在抗生素耐药性出现后, 靶向 QS 系统治疗细菌感染, 为减缓细菌耐药性发展提供了新方案。QS 抑制剂最先在澳大利亚海洋红藻(*Delisea pulchra*)产生的次级代谢物中发现, 其中卤代呋喃酮结构类似于 AHL, 并能够通过特异性干扰 LuxR 蛋白水平上 AHL 介导 QS 系统的基因表达, 进而控制细菌在介质表面的定殖^[42]。近年来, 越来越多的研究发现, 来自植物(黄芩^[43]、肉桂^[44])、动物(牛、马)^[45]和微生物(海洋链霉菌)^[46]的天然 QS 抑制剂能够减少 QS 调节的毒力因子的表达以及 *P. aeruginosa* 生物被膜的形成。然而, 由于天然资源开发的有限性及具体组分的复杂性, 多项研究倾向于改变 QS 系统信号分子的结构来获取非天然 QS 抑制剂^[47]。

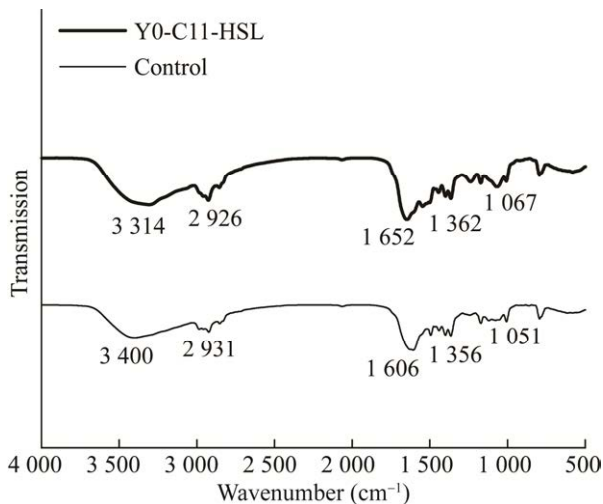


图 6 Y0-C11-HSL 对 *Pseudomonas aeruginosa* 胞外聚合物的 FT-IR 光谱图

Figure 6 FT-IR spectrum of Y0-C11-HSL on the EPS of *Pseudomonas aeruginosa*.

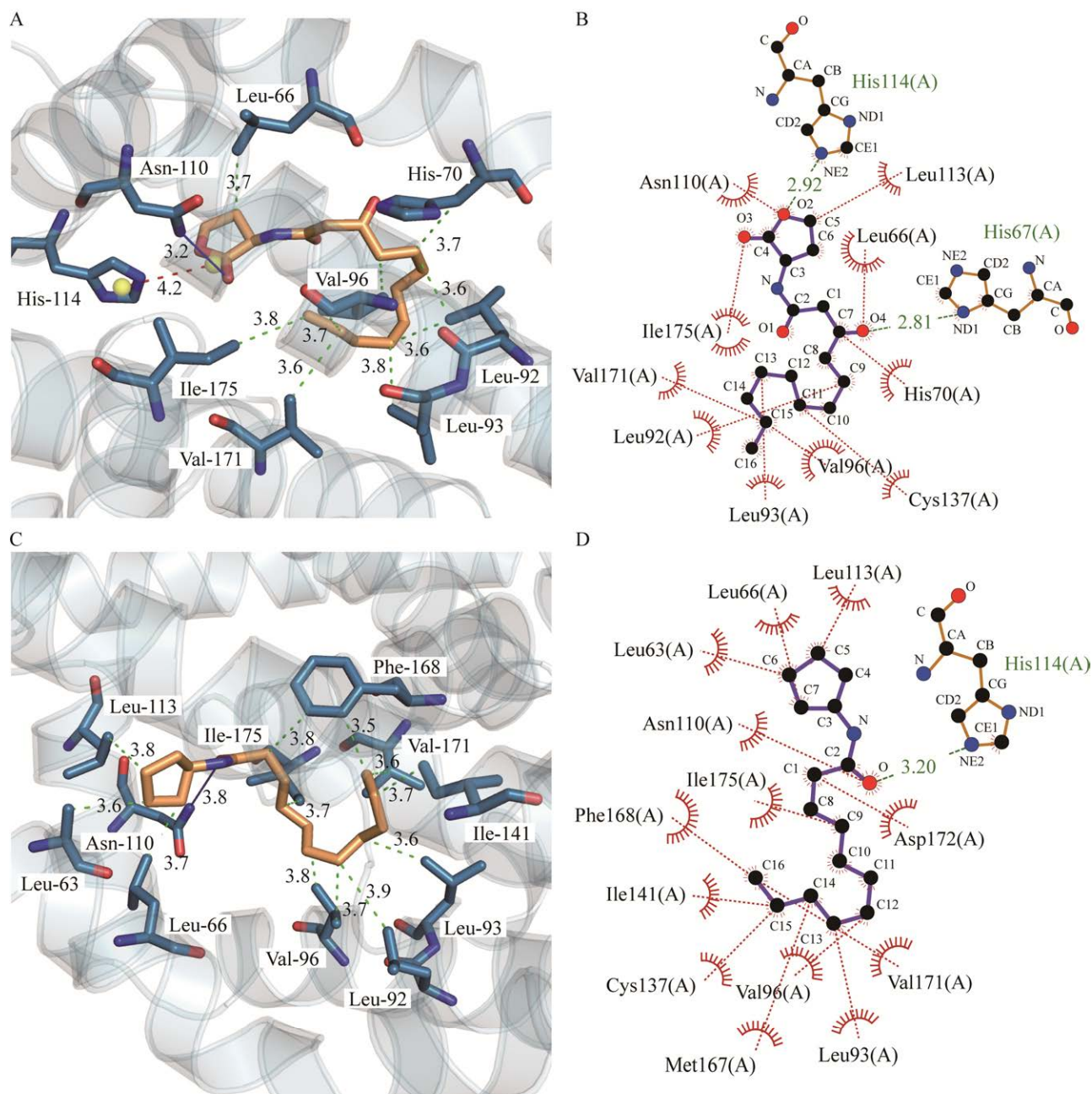


图 7 OdDHL 和 Y0-C11-HSL 分别与 LasR 蛋白的分子对接分析图 A: OdDHL 与 LasR 蛋白三维分子对接分析. B: OdDHL 与 LasR 蛋白二维分子对接分析. C: Y0-C11-HSL 与 LasR 蛋白三维分子对接分析. D: Y0-C11-HSL 与 LasR 蛋白二维分子对接分析. 在三维图中蓝色虚线表示氢键, 绿色虚线表示疏水作用力, 红色虚线表示盐桥作用力; 在二维图中绿色表示氢键, 红色表示疏水作用力

Figure 7 Molecular docking analysis of OdDHL and Y0-C11-HSL with LasR proteins figure. A: Analysis of 3D molecular docking of OdDHL and LasR protein. B: Analysis of 2D molecular docking of OdDHL and LasR protein. C: Analysis of 3D molecular docking of Y0-C11-HSL and LasR protein. D: Analysis of 2D molecular docking of Y0-C11-HSL and LasR protein. In the 3D plot the blue dashed lines represents the hydrogen bonds, green dashed lines represent hydrophobic force, red dashed lines are salt bridge force; In the 2D plot green represents the hydrogen bonds and red represents the hydrophobic force.

表1 OdDHL与Y0-C11-HSL的结合部位和对接分数

Table 1 Binding sites and docking scores of OdDHL to Y0-C11-HSL

配体	OdDHL	Y0-C11-HSL
Ligand		
对接分数	-5.8	-5.8
Docking score (kcal/mol)		
氢键相互作用残基	Asn-110	Asn-110
Hydrogen bond-interacting residues		
疏水作用力残基	Leu-92, Val-96, Val-171, Ile-175,	Leu-92, Val-96, Val-171, Ile-175, Leu-66, Leu-93,
Of the hydrophobic-acting force residues	Leu-66, Leu-93, His-70	Phe-168, Leu-92, Ile-141, Leu-113, Leu-63
盐桥作用力残基	His-114	/
Salt-bridge-acting force residues		

/: 不存在盐桥作用力残基

/: No salt-bridge-acting force residues.

细菌生物被膜是细菌为适应逆境形成的一种保护机制,是一种复杂的多细胞三维结构。在LasI/LasR系统中,LasI产生OdDHL作为自诱导剂,当达到阈值时,被受体蛋白LasR识别并结合形成配体-受体复合物,激活毒力产生和生物被膜形成相关基因的表达^[48]。前人研究发现,通过同时改变OdDHL信号分子的内酯环结构与烷基侧链长度合成的系列QS抑制剂,对*P. aeruginosa*生物被膜产量具有不同程度的抑制作用,其酰基侧链的长度和环结构对抑制活性至关重要^[49]。2015年,Park等^[50]将OdDHL的内酯环替换为吡咯环的同时改变烷基侧链长度,合成的系列化合物能够干扰OdDHL和LasR之间的结合,抑制*P. aeruginosa*生物被膜的形成;体外试验表明,在较长的烷基侧链即达到十二烷基(C12)时表现出较强的抑制生物被膜形成活性。在本研究中,同时改造OdDHL内酯环和酰基侧链合成Y0-C11-HSL,通过定量*P. aeruginosa*生物被膜的形成,证明Y0-C11-HSL在10、100和200 μmol/L浓度时对生物被膜形成具有统计学意义,并且在200 μmol/L浓度时抑制效果更好。通过SEM观察了200 μmol/L Y0-C11-HSL对*P. aeruginosa*成熟生物被膜的分散作用,发现与对照组相

比,试验组生物被膜分散,有大多可视的单细胞,几乎看不到微菌落的存在。这些结果表明Y0-C11-HSL能够阻碍生物被膜的发育并促进成熟生物被膜的分散。

*P. aeruginosa*依赖QS系统调节分泌的弹性蛋白酶(LasA/LasB)在其致病过程中有关键作用^[51],LasA和LasB可通过降解细胞外基质的成分,包括胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白和黏蛋白以及细胞连接处的成分,如血管内皮细胞钙黏蛋白,起到调节蛋白酶活性作用,进而参与铜绿假单胞菌从宿主免疫系统的逃逸,导致宿主定殖和组织破坏^[52]。在感染期间,*P. aeruginosa*通过II型分泌系统产生一种重要的吩嗪类毒性产物即绿脓菌素,它具有分子量小、容易穿透生物被膜、能够对宿主细胞产生氧化应激作用、消耗谷胱甘肽及使细胞丧失清除氧自由基的能力,最终引起胞内氧自由基量增加,造成细胞死亡^[53]。此外,细胞外DNA(eDNA)是*P. aeruginosa*生物被膜形成和稳定的重要组分,研究发现绿脓菌素能够通过促进eDNA的释放来促进生物被膜的形成^[54]。鼠李糖脂是一种糖脂生物表面活性剂,能促进*P. aeruginosa*表面运动过程^[55]。细胞相互之间黏附并贴附在介质表面形成微生物群落,这些贴壁细胞通常嵌入自

产的 EPS 基质中, *P. aeruginosa* 产生至少 3 种细胞外多糖, 即藻酸盐、Pel 和 Psl, 它们与生物膜的发育与形成有关。其中, 在黏液菌株中, 藻酸盐是基质的主要细胞外多糖, 而非黏液菌株主要利用 Pel 和 Psl 多糖形成生物被膜^[56]。Müh 等^[57]通过高通量筛选技术, 发现将 OdDHL 信号分子的内酯环和侧链均改变后产生的新化合物 PD12 与 V-06-018, 这两种化合物均含有较长的烷基侧链, 且都能通过抑制 *lasR* 基因的表达降低弹性蛋白酶以及绿脓菌素等毒力因子的分泌。本实验研究了 200 μmol/L Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 分泌的绿脓菌素、鼠李糖脂、胞外多糖和弹性蛋白酶的影响, 结果表明 200 μmol/L Y0-C11-HSL 显著降低这些毒力因子的产生。这项结果进一步支持了化学合成 QS 抑制剂可以有效减弱 *P. aeruginosa* QS 相关毒力基因的表达。另外, 本研究通过 FT-IR 对 EPS 表面化学基团进行探究, 与对照组相比, 200 μmol/L Y0-C11-HSL 改变了 *P. aeruginosa* 的 EPS 表面化学基团的波数。

P. aeruginosa 引起感染的基础离不开宿主表面生物被膜的形成^[58]。研究发现, swarming 运动与生物被膜的形成和病原体的入侵息息相关, 鞭毛的附着能力促进了初始生物被膜的建立, 而运动性允许细胞在最后步骤中扩散^[59]。此外, 在细菌起始黏附过程中, IV 型菌毛介导的 twitching 运动通过促进细胞的表面附着来促进生物被膜的形成^[60]。在本研究中, 200 μmol/L Y0-C11-HSL 显著抑制 swarming 和 twitching 运动, 表明 Y0-C11-HSL 可能具有干扰鞭毛和 IV 型菌毛的功能。另外, QS 系统对于细菌的运动有调节作用^[61], 因此 Y0-C11-HSL 对 *P. aeruginosa* 运动的抑制可能是通过干扰 QS 电路或直接作用于鞭毛和 IV 型菌毛, 从而对细菌的黏附和定殖、生物被膜的形成起抑制作用。

最后, 将 Y0-C11-HSL 和 OdDHL 这 2 个配体小分子分别与 LasR 受体蛋白进行分子对接, 结果表明, 受体分子(2uxo)与 Y0-C11-HSL 和 OdDHL 这 2 个配体小分子之间的平均结合能均为 -5.8 kcal/mol, 配体和受体蛋白可以稳定地结合, 因此, Y0-C11-HSL 可能是与自诱导剂 OdDHL 结合的 LasR 受体蛋白结合, 进一步抑制 QS 基因的相对表达。此外, Y0-C11-HSL 和自诱导因子 OdDHL 有 7 个共同的相互作用残基位点: Asn-110、Leu-92、Val-96、Val-171、Ile-175、Leu-66 和 Leu-93, 这 7 个活性位点可能在自诱导剂和 LasR 调节因子之间的结合中发挥重要作用, 并最终对转录蛋白产生影响。

综上所述, Y0-C11-HSL 在 200 μmol/L 浓度条件下对 *P. aeruginosa* 生长不产生影响的同时, 对生物被膜的形成、毒力因子的体外产生、运动性等均具有抑制作用。分子对接结果表明, Y0-C11-HSL 能与 OdDHL 结合的 LasR 受体蛋白稳定结合, 抑制 QS 系统。QS 抑制剂通过减弱毒力而不是杀死病原体极大地减少了传统抗菌素治疗引发的相关抗生素耐药细菌的出现, 这为临床治疗病原菌感染和解决抗生素耐药问题作出了贡献。

REFERENCES

- [1] GELLATLY SL, HANCOCK REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses[J]. Pathogens and Disease, 2013, 67(3): 159-173.
- [2] BUHL M, KÄSTLE C, GEYER A, AUTENRIETH IB, PETER S, WILLMANN M. Molecular evolution of extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients and hospital environment in a prolonged outbreak[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1742.
- [3] AZAM MW, KHAN AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Drug Discovery Today, 2019, 24(1): 350-359.
- [4] KOLLEF MH, CHASTRE J, FAGON JY, FRANÇOIS

- B, NIEDERMAN MS, RELLO J, TORRES A, VINCENT JL, WUNDERINK RG, GO KW, REHM C. Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Critical Care Medicine*, 2014, 42(10): 2178-2187.
- [5] BASSETTI M, VENA A, CROXATTO A, RIGHI E, GUERY B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *Drugs in Context*, 2018, 7: 212527.
- [6] TURKINA MV, VIKSTRÖM E. Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2019, 11(3): 263-279.
- [7] BEN HAJ KHALIFA A, MOISSENET D, VU THIEN H, KHEDHER M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation[J]. *Annales De Biologie Clinique*, 2011, 69(4): 393-403.
- [8] ERB CT, PATEL B, ORR JE, BICE T, RICHARDS JB, METERSKY ML, WILSON KC, THOMSON CC. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia[J]. *Annals of the American Thoracic Society*, 2016, 13(12): 2258-2260.
- [9] PATRIQUIN GM, BANIN E, GILMOUR C, TUCHMAN R, GREENBERG EP, POOLE K. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 662-671.
- [10] GALDINO ACM, VIGANOR L, de CASTRO AA, Da CUNHA EFF, MELLO TP, MATTOS LM, PEREIRA MD, HUNT MC, O'SHAUGHNESSY M, HOWE O, DEVEREUX M, MCCANN M, RAMALHO TC, BRANQUINHA MH, SANTOS ALS. Disarming *Pseudomonas aeruginosa* virulence by the inhibitory action of 1, 10-phenanthroline-5, 6-Dione-based compounds: elastase B (LasB) as a chemotherapeutic target[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1701.
- [11] TUON FF, DANTAS LR, SUSS PH, TASCA RIBEIRO VS. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review[J]. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(3): 300.
- [12] AHMED SAKS, RUDDEN M, SMYTH TJ, DOOLEY JSG, MARCHANT R, BANAT IM. Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(8): 3521-3535.
- [13] OLIVARES E, BADEL-BERCHOUX S, PROVOT C, PRÉVOST G, BERNARDI T, JEHL F. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 2894.
- [14] JAMAL M, AHMAD W, ANDLEEB S, JALIL F, IMRAN M, NAWAZ MA, HUSSAIN T, ALI M, RAFIQ M, KAMIL MA. Bacterial biofilm and associated infections[J]. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMSA*, 2018, 81(1): 7-11.
- [15] HERNANDO-AMADO S, SANZ-GARCÍA F, MARTÍNEZ JL. Antibiotic resistance evolution is contingent on the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2019, 36(10): 2238-2251.
- [16] PAPPENFORTH K, BASSLER BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588.
- [17] GARCÍA-REYES S, SOBERÓN-CHÁVEZ G, COCOTL-YANEZ M. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69(1): 25-34.
- [18] ISMAIL AS, VALASTYAN JS, BASSLER BL. A host-produced autoinducer-2 mimic activates bacterial quorum sensing[J]. *Cell Host & Microbe*, 2016, 19(4): 470-480.
- [19] HMELO LR. Quorum sensing in marine microbial environments[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2017, 9: 257-281.
- [20] CHEN JW, WANG BX, LU YJ, GUO YQ, SUN JD, WEI B, ZHANG HW, WANG H. Quorum sensing inhibitors from marine microorganisms and their synthetic derivatives[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(2): 80.
- [21] MOK N, CHAN SY, LIU SY, CHUA SL. Vanillin inhibits PqsR-mediated virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Food & Function*, 2020, 11(7): 6496-6508.
- [22] CHUNG J, GOO E, YU S, CHOI O, LEE J, KIM J, KIM H, IGARASHI J, SUGA H, MOON JS, HWANG I, RHEE S. Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(29): 12089-12094.
- [23] LASARRE B, FEDERLE MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2013, 77(1): 73-111.
- [24] SINGH S, BHATIA S. Quorum sensing inhibitors: curbing pathogenic infections through inhibition of bacterial communication[J]. *Iranian Journal of*

- Pharmaceutical Research: IJPR, 2021, 20: 486-514.
- [25] HE XJ, HWANG HM, AKER WG, WANG P, LIN YF, JIANG XL, HE XY. Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiological Research, 2014, 169(9/10): 759-767.
- [26] HAN XF, NAN MY, CAI XY, QIAO BL, CHEN L, SHEN LX. Sennoside a inhibits quorum sensing system to attenuate its regulated virulence and pathogenicity via targeting LasR in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1042214.
- [27] SANKAR GANESH P, RAVISHANKAR RAI V. Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2018, 8(1): 170-177.
- [28] RAMPIONI G, GIALONARDI G, D'ANGELO F, LEONI L. A coculture-based approach for screening campaigns aimed at identifying novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors[M]//Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017: 287-296.
- [29] 于晓晨, 张滕滕, 于文功, 宫倩红. 铜绿假单胞菌群体感应抑制剂的研究进展[J]. 齐鲁医学杂志, 2017, 32(3): 367-369, 373.
- YU XC, ZHANG MM, YU WG, GONG QH. Research progress on quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Medical Journal of Qilu, 2017, 32(3): 367-369, 373 (in Chinese).
- [30] BANERJEE M, MOULICK S, BHATTACHARYA KK, PARAI D, CHATTOPADHYAY S, MUKHERJEE SK. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, virulence and biofilm formation by extracts of *Andrographis paniculata*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 113: 85-93.
- [31] 张爱余. AHLs 类信号分子对铜绿假单胞菌成膜的影响机制研究[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2021.
- ZHANG AY. Effects of AHLs on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its mechanism[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University, 2021 (in Chinese).
- [32] 张安, 吴洁, 储卫华. 中药群体感应抑制剂的筛选及对铜绿假单胞菌的作用[J]. 药物生物技术, 2016, 23(1): 35-38.
- ZHANG A, WU J, CHU WH. Screening of quorum sensing inhibitors from traditional Chinese herbal medicines and their effects on *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 23(1): 35-38 (in Chinese).
- [33] SELEEM NM, ATALLAH H, ABD EL LATIF HK, SHALDAM MA, EL-GANINY AM. Could the analgesic drugs, paracetamol and indomethacin, function as quorum sensing inhibitors?[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 158: 105097.
- [34] 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(3): 300-306.
- [35] NAIR AV, K PN, M LA, VIJAYAN KK. Antibacterial assay guided isolation of a novel hydroxy-substituted pentacyclo ketonic compound from *Pseudomonas aeruginosa* MBTDCMFRI Ps04[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(1): 335-347.
- [36] 刘颖. 虚拟筛选用于铜绿假单胞菌群体感应抑制因子的探索[D]. 唐山: 华北理工大学硕士学位论文, 2017.
- LIU Y. Virtual screening for quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Tangshan: Master's Thesis of North China University of Science and Technology, 2017 (in Chinese).
- [37] 杨艳芳. 柠檬明串珠菌 N21 胞外多糖的分子结构和理化性质研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2018.
- YANG YF. Molecular structure and physicochemical properties research of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc citreum* N21[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2018 (in Chinese).
- [38] 徐镇祥. 两种菌株胞外多糖的结构及功能活性研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2020.
- XU ZX. Study on structure and functional activity of extracellular polysaccharides from two strains[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [39] 皋德祥, 邓欢欢, 张明华, 葛利云, 王红武. 微生物胞外聚合物的研究进展[J]. 温州医学院学报, 2012(3): 297-301.
- GAO DX, DENG HH, ZHANG MH, GE LY, WANG H. Research progress in microbial extracellular polymeric substance[J]. Journal of Wenzhou Medical College, 2012(3): 297-301 (in Chinese).
- [40] GENG YF, YANG C, ZHANG Y, TAO SN, MEI J, ZHANG XC, SUN YJ, ZHAO BT. An innovative role for luteolin as a natural quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Life Sciences, 2021, 274: 119325.
- [41] PADDER SA, PRASAD R, SHAH AH. Quorum

- sensing: a less known mode of communication among fungi[J]. Microbiological Research, 2018, 210: 51-58.
- [42] MANEFIELD M, de NYS R, NARESH K, ROGER R, GIVSKOV M, PETER S, KJELLEBERG S. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein[J]. Microbiology, 1999, 145(2): 283-291.
- [43] LUO J, DONG BY, WANG K, CAI SQ, LIU TJ, CHENG XJ, LEI DQ, CHEN YL, LI YN, KONG JL, CHEN YQ. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176883.
- [44] DIDEHDAR M, CHEGINI Z, TABAEIAN SP, RAZAVI S, SHARIATI A. *Cinnamomum*: the new therapeutic agents for inhibition of bacterial and fungal biofilm-associated infection[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 930624.
- [45] YANG F, WANG LH, WANG J, DONG YH, HU JY, ZHANG LH. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species[J]. FEBS Letters, 2005, 579(17): 3713-3717.
- [46] YOUNIS KM, USUP G, AHMAD A. Secondary metabolites produced by marine streptomyces as antibiofilm and quorum-sensing inhibitor of uropathogen *Proteus mirabilis*[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(5): 4756-4767.
- [47] LI QQ, MAO S, WANG H, YE XY. The molecular architecture of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors[J]. Marine Drugs, 2022, 20(8): 488.
- [48] KUMAR L, CHHIBBER S, KUMAR R, KUMAR M, HARJAI K. Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Fitoterapia, 2015, 102: 84-95.
- [49] ISHIDA T, IKEDA T, TAKIGUCHI N, KURODA A, OHTAKE H, KATO J. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-acyl cyclopentylamides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(10): 3183-3188.
- [50] PARK S, KIM HS, OK K, KIM Y, PARK HD, BYUN Y. Design, synthesis and biological evaluation of 4-(alkyloxy)-6-methyl-2H-pyran-2-one derivatives as quorum sensing inhibitors[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(15): 2913-2917.
- [51] LI XH, LEE JH. Quorum sensing-dependent post-secretional activation of extracellular proteases in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(51): 19635-19644.
- [52] EVERETT MJ, DAVIES DT. *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target[J]. Drug Discovery Today, 2021, 26(9): 2108-2123.
- [53] HALL S, MCDERMOTT C, ANOOPKUMAR-DUKIE S, MCFARLAND AJ, FORBES A, PERKINS AV, DAVEY AK, CHESS-WILLIAMS R, KIEFEL MJ, ARORA D, GRANT GD. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Toxins, 2016, 8(8): 236.
- [54] DAS T, MANEFIELD M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46718.
- [55] THAKUR P, SAINI NK, THAKUR VK, GUPTA VK, SAINI RV, SAINI AK. Rhamnolipid the glycolipid biosurfactant: emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 1.
- [56] SKARIYACHAN S, SRIDHAR VS, PACKIRISAMY S, KUMARGOWDA ST, CHALLAPILLI SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal[J]. Folia Microbiologica, 2018, 63(4): 413-432.
- [57] MÜH U, SCHUSTER M, HEIM R, SINGH A, OLSON ER, GREENBERG EP. Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(11): 3674-3679.
- [58] BUCIOR I, MOSTOV K, ENGEL JN. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces of the polarized epithelium[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(3): 939-953.
- [59] SCHWARZER C, FISCHER H, MACHEN TE. Chemotaxis and binding of *Pseudomonas aeruginosa* to scratch-wounded human cystic fibrosis airway epithelial cells[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150109.
- [60] MARKO VA, KILMURY SLN, MacNEIL LT, BURROWS LL. *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity[J]. PLoS Pathogens, 2018, 14(5): e1007074.
- [61] ATKINSON S, CHANG CY, SOCKETT RE, CÁMARA M, WILLIAMS P. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(4): 1451-1461.