

## 研究报告

## 计算机辅助药物设计筛选嗜水气单胞菌 AhyI合成酶抑制剂

奉玉欣<sup>#1</sup>, 李冰昕<sup>#1</sup>, 邹飘<sup>1</sup>, 张耘泽<sup>1</sup>, 孙维宝<sup>2</sup>, 刘家璇<sup>2</sup>, 宋杰<sup>2</sup>, 耿辉<sup>1</sup>, 熊丽<sup>\*1</sup>

1 华中师范大学生命科学学院 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室, 湖北 武汉 430079

2 喀什大学生命与地理科学学院 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 新疆 喀什 844000

奉玉欣, 李冰昕, 邹飘, 张耘泽, 孙维宝, 刘家璇, 宋杰, 耿辉, 熊丽. 计算机辅助药物设计筛选嗜水气单胞菌 AhyI合成酶抑制剂[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2081-2093.

FENG Yuxin, LI Bingxin, ZOU Piao, ZHANG Yunze, SUN Weibao, LIU Jiaxuan, SONG Jie, GENG Hui, XIONG Li. Computer-aided drug design for discovery of small-molecule inhibitors of N-acyl-homoserine lactone synthase in *Aromonas hydrophila*[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2081-2093.

**摘要:**【背景】AhyI合成酶在嗜水气单胞菌(*Aromonas hydrophila*)群体感应调控毒力产生中发挥着关键作用。【目的】研究其结构以寻找高效抑制剂, 切断细菌致病性的源头, 具有极其重要的意义。【方法】利用已解析的蛋白质结构为模板, 运用同源建模和分子动力学模拟手段, 成功建立了 AhyI合成酶的三维结构。接下来, 基于先前研究的基础, 选取 2 个高效抑制剂 N-3-氧代己酰基高丝氨酸内酯(N-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone, NOO)和 5-脱氧-5'-甲硫腺苷(5'-deoxy-5'-methylthioadenosine, MTA)以及传统中药中的部分活性成分, 共选取 214 个候选配体与受体蛋白进行分子对接。【结果】筛选出 4 个潜在抑制剂, 经过最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration, MIC)值、生长曲线、紫色菌素、生物膜形成、胞外蛋白酶、群集运动和泳动实验验证后, 发现青蒿素可以作为嗜水气单胞菌群体感应系统的高效抑制剂。【结论】传统中药青蒿素为水产养殖业中嗜水气单胞菌的有效防治提供基础, 在治疗细菌感染方面具有广阔的应用前景。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; AhyI合成酶; 群体感应抑制剂; 计算机辅助药物设计

资助项目: 国家自然科学基金(32360926); 中央高校自主科研业务费(20205180039)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360926) and the Fundamental Research Funds for the Central University of China (20205180039).

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

\*Corresponding author. E-mail: xionglily@mail.ccnu.edu.cn

Received: 2023-10-23; Accepted: 2023-12-12; Published online: 2024-01-23

# Computer-aided drug design for discovery of small-molecule inhibitors of N-acyl-homoserine lactone synthase in *Aeromonas hydrophila*

FENG Yuxin<sup>#1</sup>, LI Bingxin<sup>#1</sup>, ZOU Piao<sup>1</sup>, ZHANG Yunze<sup>1</sup>, SUN Weibao<sup>2</sup>, LIU Jiaxuan<sup>2</sup>, SONG Jie<sup>2</sup>, GENG Hui<sup>1</sup>, XIONG Li<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, School of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, College of Life and Geographic Sciences, Kashi University, Kashi 844000, Xinjiang, China

**Abstract: [Background]** The N-acyl-homoserine lactone synthase AhlI plays a critical role in regulating the production of virulence in *Aeromonas hydrophila* biofilm. **[Objective]** To reveal the structure of AhlI, so as to discover effective inhibitors that can disrupt bacterial pathogenicity at the source. **[Methods]** We constructed the three-dimensional structure of AhlI by employing homology modeling and molecular dynamics simulation with a resolved protein structure as a template. On the basis of previous research results, we selected 214 candidate ligands including two highly effective inhibitors (NOO and MTA) and active components from Chinese herbal medicines to undergo molecular docking with the receptor protein. **[Results]** Through this process, we identified four potential inhibitors. The minimum inhibitory concentration (MIC), bacterial growth curve, violacein production, biofilm formation, extracellular protease activity, and bacterial swarming and swimming performance showed that artemisinin served as a highly efficient inhibitor of *A. hydrophila* quorum sensing. **[Conclusion]** Artemisinin from the Chinese herbal medicine serves the prevention and treatment of infections of waterborne bacteria in the aquaculture industry, holding a promising prospect for the treatment of bacterial infections in the future.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*; AhlI synthase; quorum sensing inhibitors; computer-aided drug design

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是一种革兰氏阴性菌,广泛存在于淡水环境尤其是鱼类、贝类等生食之中,经常引起各种疾病,如人类腹泻或鱼类细菌性败血症、烂尾病等<sup>[1]</sup>。研究显示,嗜水气单胞菌的致病性及其耐药性的产生均与群体感应(quorum sensing, QS)系统相关, QS 系统是一种广泛存在于多种微生物中的胞间通信系统,细菌产生的自诱导物随着种群密度的增加而积累,诱导细菌对种群密度的响应,参与

调控细菌的致病基因表达、毒素产生、生物膜形成、细胞外多糖合成和分子泵开关等多种生物学过程<sup>[2-3]</sup>。在 QS 系统中, *ahyI* 基因编码的 AhlI 合成酶产生信号分子介导细菌间信号交流系统。在嗜水气单胞菌中,存在 QS1 和 QS2 两种 QS 系统(图 1),分别以高丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactones, AHLs)和自诱导物信号分子呋喃糖基硼酸二酯(AI-2)作为信号分子,两种 QS 系统共同调控与细菌表型相关的基因表达<sup>[4-5]</sup>。*ahyI* 是嗜

水气单胞菌 QS1 系统的关键基因, 该基因在嗜水气单胞菌中具有很高的保守性<sup>[6-7]</sup>, 参与编码 Ahyl 合成酶。该酶介导催化以下反应<sup>[8]</sup>:

$\text{AhyI-ACP} + \text{SAM} \rightarrow \text{AHLs} + \text{Holo-ACP} + \text{MTA}$ 。

AHLs 是介导嗜水气单胞菌群体感应系统的主要信号分子。AHLs 在嗜水气单胞菌中被持续合成并转运到胞外环境。当环境中的 AHLs 信号分子积累到临界浓度时, 嗜水气单胞菌就会启动毒力相关基因表达, 这些毒力基因编码的毒力因子在嗜水气单胞菌引起的运动型气单胞菌败血症 (motile *Aeromonas septicemia*, MAS) 致病过程中起到了关键作用。另外, 嗜水气单胞菌的 QS 系统还介导调控菌体抗生素耐受和宿主免疫对抗过程<sup>[9]</sup>。

迄今为止, 在抑制细菌 QS 的相关研究中,

主要关注于促进信号分子的降解或阻止信号分子与受体蛋白的结合领域, 从源头上控制信号分子产生的相关研究还有待进一步开展<sup>[10]</sup>。目前已有若干其他物种 Ahyl 合成酶的结构信息被解析, 在此基础上借助计算机模拟技术可以较为准确地构建嗜水气单胞菌 Ahyl 合成酶的结构, 为开展基于结构的 Ahyl 合成酶抑制剂筛选提供了条件<sup>[11]</sup>。本研究采用计算机辅助药物设计 (computer-aided drug design, CADD) 的方法虚拟筛选嗜水气单胞菌 QS 系统关键酶的高效抑制剂, 虚拟筛选可基于配体或受体的三维结构特征快速确定药物的生物活性和亲和性, 从而筛选出潜在的候选药物, CADD 技术相较于传统的药物研发方法具有较高的效率和准确性<sup>[12-13]</sup>。相较于其他方法,

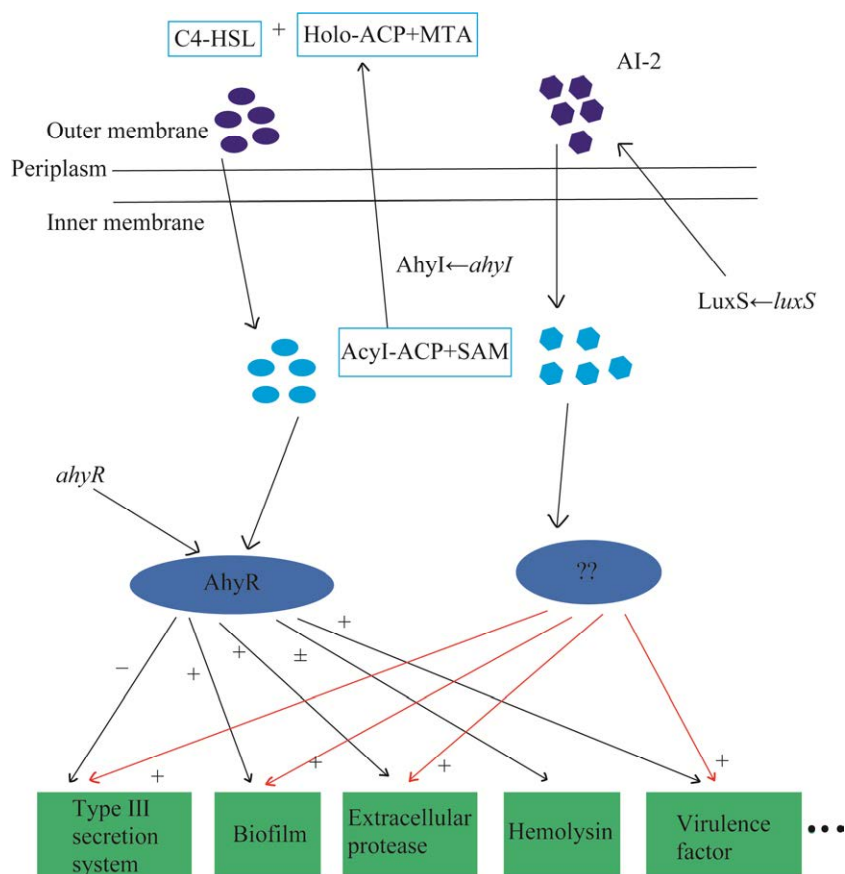


图 1 嗜水气单胞菌的 QS 系统

Figure 1 The QS system of *Aeromonas hydrophila*.

虚拟筛选更为高效环保、安全有效且成本低廉,有利于加速对 QS 系统抑制剂进行合理设计,解决目前的难题。目前, CADD 策略已广泛应用于多种药物开发过程中。例如, HIV 核酸酶抑制剂<sup>[14]</sup>和心血管及神经退行性药物<sup>[15]</sup>研发等,为人类疾病的预防治疗和病原体的控制作出了巨大贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*A. hydrophila* XS91-4-1 为中国科学院水生生物研究所(武汉)李爱华教授惠赠; *Chromobacterium violaceum* CV026 为厦门大学柯才焕教授惠赠,是 *C. violaceum* ATCC 31532 的 mini-Tn5 突变体。

Mueller Hinton (MH)培养基: 20 g 牛肉粉, 17.5 g 酸水解酪蛋白, 1.5 g 可溶性淀粉, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L, pH 为 7.4±0.2, 121 °C 灭菌 25 min; 群集培养基: 10 g 蛋白胨、5 g NaCl、5 g Agar 和 5 g Glucose, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L, 115 °C 灭菌 30 min; 泳动培养基: 10 g 胰蛋白胨、5 g NaCl 和 3 g Agar, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L, 121 °C 灭菌 25 min。

### 1.2 同源建模及评估优化

基于所查得 AhyI 合成酶的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 OOD36466.1), 在蛋白数据库 (protein data bank, PDB) 的 BLAST 在线相似性搜索下载与其同源性较高的蛋白质 pdb 文件, 通过 ClustalW 在线工具进行多序列比对, 选取候选模板; 采用 SWISS-MODEL<sup>[16]</sup>在线服务器、Discovery Studio、Modeller、CPHmodels、Robetta 和 Phyre 等建立 AhyI 合成酶的同源结构模型, 选取建模结果较好的模型, 通过多维尺度分析 (multi-dimensional scaling, MDS) 优化模型使能量最小化; 依靠 SAVES 在线评价程序包、均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 值、

Dali Server 和 ProSA<sup>[17]</sup>进行合理性分析。

### 1.3 分子对接

根据之前的研究<sup>[18]</sup>以及预测的模型疏水性口袋的相关情况, 本研究对 AhyI 同源蛋白家族中已解析结构的蛋白质抑制剂小分子 N-3-氧代己酰基高丝氨酸内酯 (N-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone, NOO) 进行了合理性改造, 将其与传统中药中的抑菌活性成分共 214 个小分子作为配体。画出所有的小分子结构并输出为 mol2 格式, 在 Linux 环境下运行 AutoDockTools 1.5.6, 对小分子配体和受体蛋白进行去水和加氢处理, 采用拉马克遗传算法进行半柔性对接, 运行获得能量最低时的复合体结构。根据输出的结合能高低结果, 选取结合能较低的小分子作为下游实验的候选抑制剂。并借助 PyMOL 2.5.0 软件显示蛋白质-配体复合体结构, 进一步生成可视化相互作用 2D 图。

### 1.4 候选抑制剂对嗜水气单胞菌的影响

#### 1.4.1 嗜水气单胞菌的最小抑菌浓度

参照微量肉汤稀释法<sup>[19]</sup>分别测定 AhyI 合成酶的 4 种候选抑制剂大黄素、青蒿素、 $\beta$ -石竹烯及表儿茶素对菌株 XS91-4-1 的最小抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC), 以细菌的生长被完全抑制的浓度为菌株 XS91-4-1 的 MIC 值。制备 0.5 麦氏浊度的 XS91-4-1 菌悬液, MH 培养基 1:1 000 稀释后每孔加入 100  $\mu$ L, 接着加入对应浓度的候选抑制剂, 再用稀释后的 MH 培养基补齐至 200  $\mu$ L, 从左至右使每孔候选抑制剂的终浓度依次为 10.0、5.00、2.50、1.25、0.625、0.313、0.156 和 0.078 mg/mL。密封 96 孔板, 28 °C 孵育 24 h, 小孔内细菌的生长被完全抑制的化合物浓度即为该候选抑制剂对菌株 XS91-4-1 的 MIC 值。

#### 1.4.2 嗜水气单胞菌的生长曲线测定

细菌生长曲线反映了单细胞微生物在一

定环境培养条件下所表现出的群体生长规律,是以菌量的对数值作纵坐标,生长时间作横坐标绘制的曲线。在 LB 液体培养基中添加候选抑制剂以制备出相应候选抑制剂浓度的培养基,加入菌株 XS91-4-1 的过夜培养物后,28 °C、180 r/min 振荡培养,每隔 2 h 取样,每次取样 3 mL,10 000×g 离心 2 min,用蒸馏水洗涤 3–5 次后二次离心,重复 2 次后,用 3 mL 蒸馏水重悬,测定  $OD_{600}$ ,每组样品重复 3 次。

#### 1.4.3 定量测定菌株 CV026 紫色菌素的产量

嗜水气单胞菌能够合成信号分子 AHLs,信号分子与菌株 CV026 混合后能够产生紫色菌素,测定  $OD_{585}$  表示紫色菌素含量即为信号分子产量。以 1%接种量将菌株 XS91-4-1 过夜培养物( $OD_{600}=1.0$ )接种至对应候选抑制剂浓度的 LB 液体培养基,28 °C、180 r/min 培养 16 h 后参照 Husain 等<sup>[20]</sup>的方法提取信号分子。首先,12 000×g 离心 2 min 弃去菌体,加入等体积酸化乙酸乙酯(含 0.1% HCOOH)萃取,弃去下层,重复操作 3 次,合并有机相萃取液并倒入旋转蒸发器中蒸干,最后加入适量甲醇溶解,将提取的信号分子和 1%菌株 CV026 ( $OD_{600}=1.0$ )菌液接种至新鲜 LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 培养 24 h 后取 1 mL 菌液 13 000 r/min 离心 10 min,沉淀中加入 1 mL DMSO 振荡 30 s,再次离心彻底溶解紫色菌素,取 200  $\mu$ L 离心后的上清液加入 96 孔板中,酶标仪测定  $OD_{585}$ 。

#### 1.4.4 嗜水气单胞菌生物膜产量的测定

使用微孔板法<sup>[21]</sup>定性测定生物膜的形成,与结晶紫染色方法结合,通过  $OD_{590}$  定量反映出候选抑制剂对生物膜产量的影响,各抑制剂的抑制率计算公式为:  $[(OD_{590} \text{ 对照组} - OD_{590} \text{ 实验组}) / OD_{590} \text{ 对照组}] \times 100\%$ 。首先,将菌株 XS91-4-1 过夜活化 2 次,菌液稀释至  $OD_{600}$  为 1.0 后按 1%接种量接种至 LB 培养基。之后于 96 孔板中加入对应浓度的候选抑制剂和稀释后的 LB 培养

基,每孔总体积为 200  $\mu$ L。将 96 孔板置于 28 °C 培养 24 h 后移去培养液,然后用 2.5%戊二醛固定 5 min,倒去固定液,再用 125  $\mu$ L 0.4%的结晶紫染色 15 min,去除孔内多余的染料,其间每次操作前均用 250  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 轻轻冲洗 3–5 次,60 °C干燥 10 min,ddH<sub>2</sub>O 冲洗后再加入 200  $\mu$ L 95%乙醇,酶标仪测定  $OD_{590}$ 。

#### 1.4.5 嗜水气单胞菌中胞外蛋白酶活性的测定

偶氮酪蛋白经蛋白酶降解后产生可溶于三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、具有高紫外线吸收率的偶氮肽。参照 Swift 等<sup>[6]</sup>提出的偶氮酪蛋白测定  $OD_{400}$  值,即不同候选抑制剂浓度对嗜水气单胞菌胞外蛋白酶活性的影响。对照组和实验组的菌株 XS91-4-1 过夜培养物各取 150  $\mu$ L,10 000 r/min 离心 2 min,弃去沉淀的菌体,取 1 mL 0.3%偶氮酪蛋白[0.05 mol/L Tris-HCl 和 0.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5)]加入到上清液中,37 °C孵育 15 min,加入 0.5 mL 10% TCA 终止反应,4 000 r/min 离心 3 min,测定上清液的  $OD_{400}$ 。

#### 1.4.6 嗜水气单胞菌群集运动和细菌泳动情况测定

很多细菌在某个固体表面依靠鞭毛的旋转运动向同一个方向前进,即细菌群体运动。单个细菌在液体环境中依靠鞭毛的旋转运动向一个方向前进,为泳动运动。对于病原菌而言,运动性是重要的致病因素。参照 Husain 等<sup>[22]</sup>的方法进行细菌群集和泳动运动分析,以半固体平板中菌落迁移直径测定不同浓度候选抑制剂对嗜水气单胞菌的群集和泳动现象影响。首先以无水乙醇作为对照,准备不同候选抑制剂浓度的群集培养基(0.5%琼脂)和泳动培养基(0.3%琼脂)平板。在超净工作台中,等待培养基半凝固后,于平板中央加入 5  $\mu$ L 过夜活化的菌株 XS91-4-1 培养液( $OD_{600}=1.0$ ),无菌风干后即可置于 28 °C培养 48 h 后观察菌落迁移情况,每组样品重复 3 次。

### 1.4.7 统计学分析

本研究中所有实验均重复 3 次,所有数据均以平均值 $\pm$ SD ( $n\geq 3$ )表示,并使用  $t$  检验分析对照组和实验组之间的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 同源建模分析及评价

经搜索发现,与目的序列一致性高于 30% 的两个蛋白质分别是 *Burkholderia glumae* TofI (PDB ID: 3p2h)和 *Pseudomonas aeruginosa* LasI (PDB ID: 1ro5),其序列一致性分别为 39.24%和 32.22%。这两个蛋白质的三维结构已被完全解析,可以作为同源建模的模板。其中,3p2h 的分辨率较高(2 Å)且结构完整。

通过模型评价和 MDS 优化后,AhyI 的三维结构模型趋于稳定,在约 2 ns 后 RMSD 值稳定在 2.5 Å,同时蛋白模型的势能也逐渐稳定至最小化。

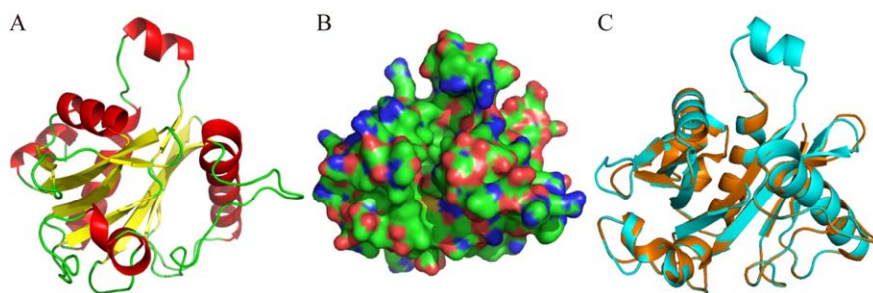
以 3p2h 蛋白为模板,使用 SWISS-MODEL 在线服务器进行非自动建模,得到的模型命名为 AH\_gro,如图 2 所示。AH\_gro 覆盖了 AhyI 合成酶的第 4–192 位氨基酸,并且与模板蛋白 3p2h 具有高度相似的叠合度,底物结合腔高度也相

似。关键氨基酸位于底物结合区附近。

经过 SAVES 在线模型评价服务器的评估,AH\_gro 模型的合理性较好。Ramachandran Plot 显示模型的氨基酸大部分位于最适区,Verify-3D 结果显示通过,ERRAT 结果的 Overall Quality Factor 为 73.84。Dali Server 评价结果显示 AH\_gro 与模板的 RMSD 值为 3 Å,ProSA 评价结果显示其 Z-score 值位于天然蛋白质的特征范围内,表明模型在能量上具备较高的合理性。

### 2.2 分子对接结果

使用 AutoDock 4.2.6 软件将 214 个配体与 AH\_gro 进行分子对接。结果显示,大黄素、青蒿素、 $\beta$ -石竹烯和表儿茶素的结合能分别为 -7.22、-8.06、-6.46 和 -6.88 kJ/mol,输出结果见表 1。使用 PyMOL 对 4 种复合物进行可视化作图分析其相互作用力,4 种配体与 AH\_gro 蛋白的结合情况如图 3 所示。由图 3 可知,大黄素与 AhyI 合成酶的 Arg102 和 Ser145 形成了氢键,青蒿素与 AhyI 合成酶的 Arg102 形成了氢键,表儿茶素与 AhyI 合成酶的 Leu100、Arg102 和 Ser145 形成氢键。进一步分析发现,4 种配体分子还与活性部位的部分氨基酸具有强疏水作用。



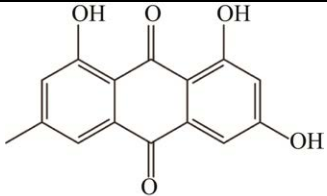
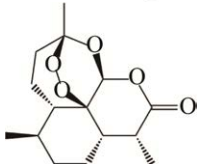
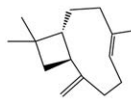
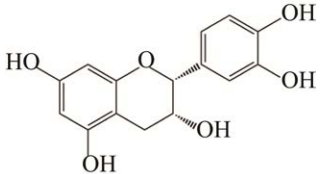
**图 2 AhyI 的同源模型 AH\_gro** A: 在 PyMOL cartoon 模式下,显示 AhyI 同源模型 AH\_gro ( $\alpha$  螺旋为红色, $\beta$  折叠为黄色,无规卷曲为绿色)。B: 在 PyMOL surface 模式下,显示 AhyI 同源模型 AH\_gro 的底物结合区。C: AhyI 同源模型 AH\_gro 与其模板 3p2h align 后的示意图,其中,天蓝色结构代表 AH\_gro

Figure 2 The homology model AH\_gro of AhyI. A: AH\_gro in cartoon view and colored according to its secondary structure, red indicates alpha helices, yellow indicates sheets, and green indicates loops. B: The substrate binding cavity of AH\_gro is shown in surface view by PyMOL. C: AH\_gro colored Sky blue was aligned with 3p2h in cartoon view by PyMOL.



表 1 通过 AutoDock 将 AH\_gro 与 4 种小分子配体进行分子对接后的结果

Table 1 The molecular docking results of AH\_gro with ligands by AutoDock

Candidate compounds	Chemical structure	CAS No.	$\Delta G$ (kcal/mol)	H-bond numbers
Emodin		518-82-1	-7.22	3
Artemisinin		63968-64-9	-8.06	5
$\beta$ -caryophyllene		87-44-5	-6.46	0
Epicatechin		490-46-0	-6.88	5

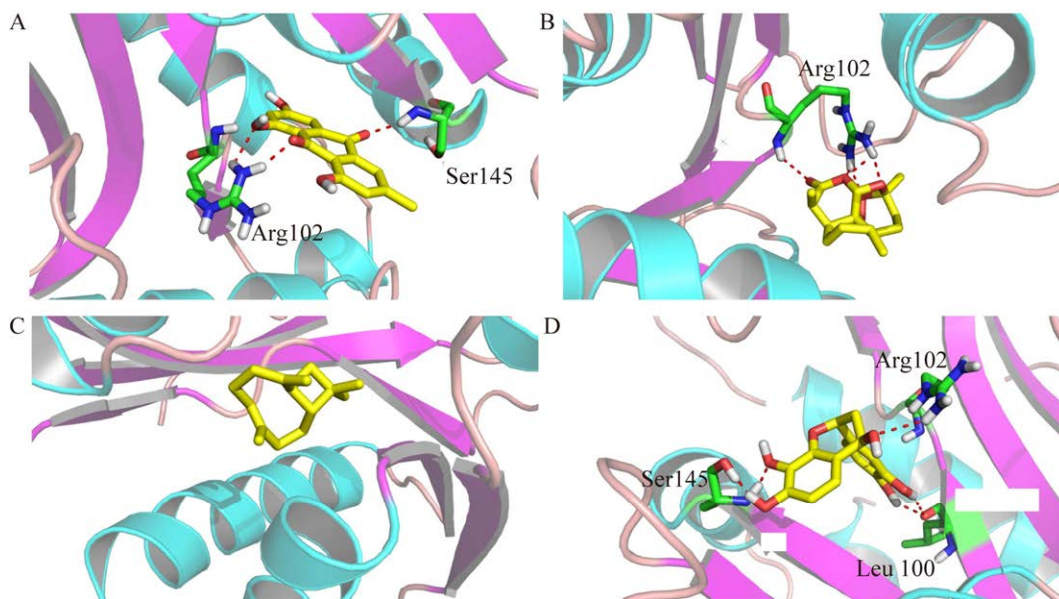


图 3 AH\_gro 与 4 种小分子配体的分子对接示意图 4 个候选抑制剂通过 AutoDock 对接于 AH\_gro 的疏水口袋中, 其中, 氢键用红线表示, 候选抑制剂(黄色)和关键的氨基酸残基用 PyMol 的 stick 模式显示出来. A: 大黄素与 AH\_gro 形成的复合体. B: 青蒿素与 AH\_gro 形成的复合体. C:  $\beta$ -石竹烯与 AH\_gro 形成的复合体. D: 表儿茶素与 AH\_gro 形成的复合体

Figure 3 The molecular docking diagram of AH\_gro with four small molecular ligands. Four candidate compounds are docked in the hydrophobic pocket of AH\_gro by AutoDock. The hydrogen bonds are indicated in red lines, the compounds colored as yellow and key residues labeled are shown with stick. A: Complex between AH\_gro and emodin. B: Complex between AH\_gro and artemisinin. C: Complex between AH\_gro and  $\beta$ -caryophyllene. D: Complex between AH\_gro and epicatechin.

## 2.3 生物学实验结果

### 2.3.1 嗜水气单胞菌在不同化合物下的 MIC 值

选择亚抑菌浓度前,须先进行菌株生长影响测定。因此测定在不同浓度候选抑制剂处理下菌株 XS91-4-1 的 MIC 值,实验结果见表 2。根据 MIC 值测定结果选择后续实验抑制剂浓度分别为:大黄素(emodin) 0.5 mg/mL;青蒿素(artemisinin) 0.05、0.1 和 0.2 mg/mL; $\beta$ -石竹烯( $\beta$ -caryophyllene) 及表儿茶素(epicatechin) 0.2 mg/mL 和 0.5 mg/mL。

### 2.3.2 不同浓度化合物处理下嗜水气单胞菌的生长曲线测定

生长曲线分析结果显示(图 4),在无候选抑制剂介入时,菌株 XS91-4-1 大约在 2 h 进入对数生长期并可持续约 14 h。0.5 mg/mL 的乙醇对照组对菌株 XS91-4-1 的生长影响几乎可以忽略不计;0.2 mg/mL 青蒿素能显著抑制其生长,而 0.1 mg/mL 及以下的青蒿素对菌株 XS91-4-1 生长基本无影响;0.2 mg/mL 的  $\beta$ -石竹烯和表儿茶素有对其生长也基本无影响,当浓度上升到 0.5 mg/mL 时对菌株 XS91-4-1 生长有一定影响,并且有显著的浓度依赖效应。

### 2.3.3 不同浓度化合物处理下菌株 CV026 紫色菌素的定量测定

作为革兰氏阴性菌,嗜水气单胞菌的耐药性与毒力因子表达受到 QS 系统的严格调控,其中,信号分子发挥关键作用。本实验中, $OD_{585}$ 与代表 XS91-4-1 信号分子分泌量的紫色菌素呈正相关。结果显示(图 5),与对照组相比,除 0.2 mg/mL 的  $\beta$ -石竹烯和表儿茶素组外,各实验组均极显著抑制紫色菌素产量,换言之,0.5 mg/mL 的大黄素、 $\beta$ -石竹烯和表儿茶素以及青蒿素均极显著抑制 XS91-4-1 菌株 QS 系统产生信号分子。

表 2 不同浓度的候选抑制剂对菌株 XS91-4-1 的最小抑菌浓度

Table 2 MIC values of strain XS91-4-1 to candidate inhibitors

Candidate compound	MIC (mg/mL)
Emodin	1.25
Artemisinin	1.25
$\beta$ -caryophyllene	2.5
Epicatechin	2.5

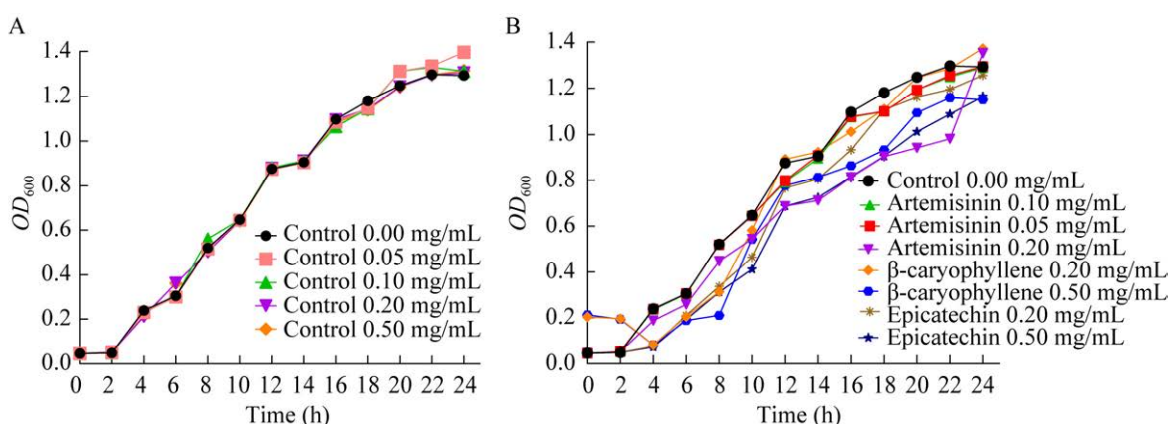


图 4 不同浓度候选抑制剂处理下菌株 XS91-4-1 的生长曲线分析 A: 乙醇对照组. B: 青蒿素、 $\beta$ -石竹烯和表儿茶素组

Figure 4 Growth curve analysis of strain XS91-4-1 under different concentrations of candidate inhibitors. A: Ethanol control group. B: Artemisinin,  $\beta$ -caryophyllene and epicatechin group.



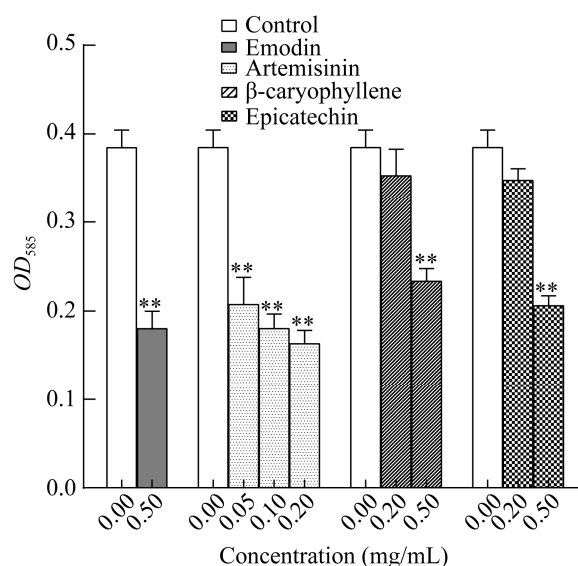


图 5 不同浓度候选抑制剂处理对菌株 CV026 中紫色菌素产量的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of candidate inhibitors on the violacein production in strain CV026. \*\*:  $P < 0.01$ .

### 2.3.4 不同浓度化合物对嗜水气单胞菌生物膜形成的影响

嗜水气单胞菌的生物膜有利于其适应自然环境的改变,减少药物渗透,降低药物敏感性,与其耐药性的产生密切相关。因此,选择微量滴定法测定候选抑制剂对菌株 XS91-4-1 生物膜形成的影响。结果如图 6 所示,相关抑制率参照表 3。结果显示,与对照组相比,实验组的抑制效力高,具有强浓度依赖效应。其中 0.5 mg/mL 大黄素对菌株 XS91-4-1 生物膜形成的抑制最高,其抑制率达到 47.00%,但是,考虑各候选抑制剂实验浓度和对应的抑制效果,青蒿素的相对抑制效果更好。

### 2.3.5 不同浓度化合物对嗜水气单胞菌中胞外蛋白酶产量的影响

嗜水气单胞菌的毒力与其分泌到环境中的多种胞外蛋白酶产量密切相关。胞外蛋白酶的表达受 QS 系统调控,若 QS 系统被候选抑制剂抑

制,则胞外蛋白酶活性也会相应降低。实验结果见图 7,相较于实验对照组,除 0.2 mg/mL 的表儿茶素外,其他实验组胞外蛋白酶的活性显著下降,尤其是青蒿素实验组,随着青蒿素浓度逐渐上升,胞外蛋白酶的活性下降显著,当青蒿素浓度为 0.2 mg/mL 时,其  $OD_{400}$  达到 0.290。

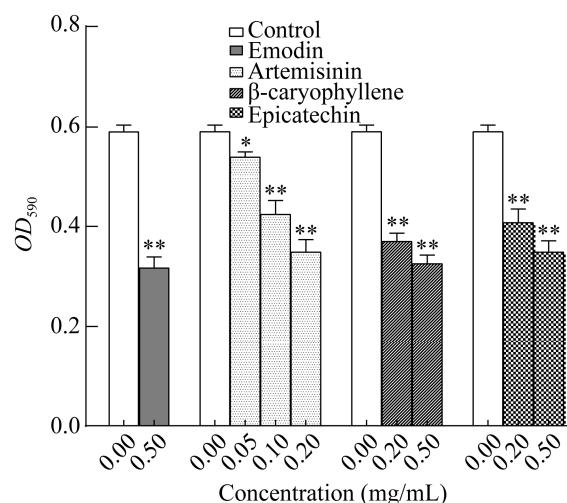


图 6 不同浓度候选抑制剂对菌株 XS91-4-1 生物膜形成的影响

Figure 6 Inhibition of strain XS91-4-1 biofilm formation under different concentrations of candidate inhibitors. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

表 3 不同浓度的候选抑制剂对菌株 XS91-4-1 生物膜形成的抑制率

Table 3 The inhibition rate of strain XS91-4-1 biofilm information under different concentrations of candidate inhibitors

Concentration (mg/mL)	Compound	Inhibitory rate (%)
0.50	Emodin	47.00
0.05	Artemisinin	8.49
0.10	Artemisinin	28.77
0.20	Artemisinin	40.70
0.20	β-caryophyllene	36.26
0.50	β-caryophyllene	44.44
0.20	Epicatechin	30.47
0.50	Epicatechin	40.52

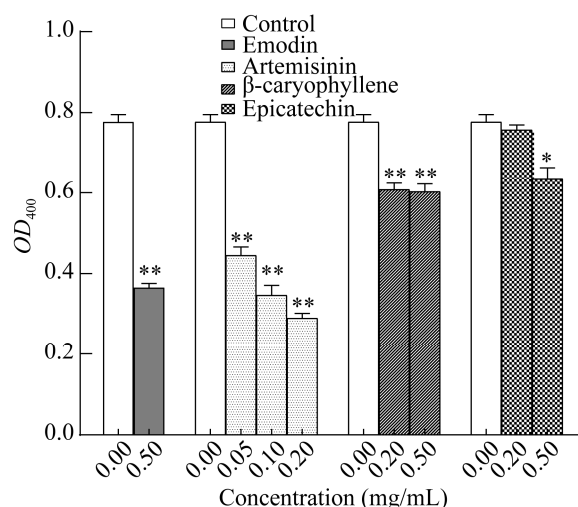


图 7 不同浓度候选抑制剂对菌株 XS91-4-1 胞外蛋白酶产量的影响

Figure 7 The inhibition of exoprotease activity in supernatants of XS91-4-1 under different concentrations of candidate inhibitors. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

### 2.3.6 不同浓度化合物对嗜水气单胞菌群集运动和细菌泳动的影响

细菌的群集和泳动等迁移运动与生物膜的形成以及感染宿主的能力有密切关系,测定多种浓度候选抑制剂下菌株 XS91-4-1 的群集运动和细菌泳动(图 8)。结果显示,与无水乙醇对照组相比,大黄素能显著抑制迁移现象,表明其能有效抑制细菌的 QS 系统;而青蒿素和 β-石竹烯实验组同样具有显著抑制效果,并伴随明显的浓度依赖效应;添加少量表儿茶素时,细菌泳动的直径显著减少,但当表儿茶素上升到 0.5 mg/mL 时,细菌的群集现象却无显著影响,至于其中的相关机制还需要进一步地探究。

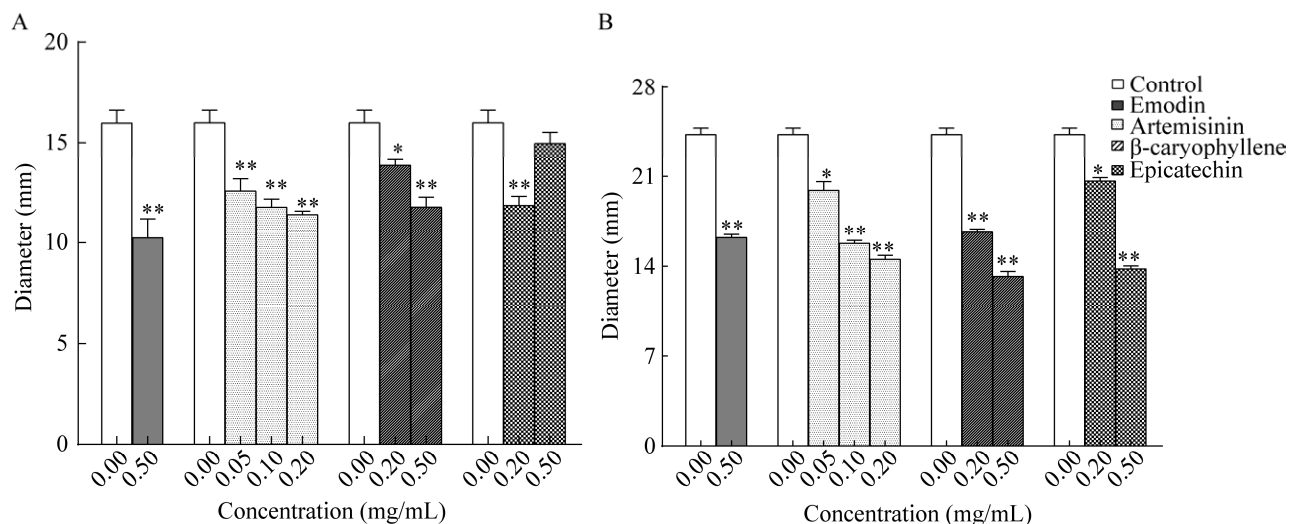


图 8 不同浓度候选抑制剂对菌株 XS91-4-1 运动现象的影响 A:对菌株 XS91-4-1 群集运动的影响. B:对菌株 XS91-4-1 泳动现象的影响

Figure 8 Effects of different concentrations of candidate inhibitors on motility of strain XS91-4-1. A: Effect on the swarming motility of strain XS91-4-1. B: Effect on the swimming motility of strain XS91-4-1. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

## 3 讨论与结论

自 20 世纪以来, 抗生素的研发和应用在细菌性疾病治疗中发挥了重要作用, 然而, 抗生素

的过度使用以及细菌和真菌混合感染的复杂机制, 使得耐药性成为传统抗生素治疗面临的主要问题。同时, 长期使用引发的严重环境问题以及细菌耐药性的问题也引发了广泛关切<sup>[1]</sup>。嗜水气

单胞菌因其较高的遗传不稳定性和较强的环境适应性,成为报告耐药事件较多的病原体之一<sup>[23]</sup>。近年来,群体感应系统中的信号分子(AHLs)和自诱导物(AI-2)对病原菌致病性的影响研究逐步深入<sup>[24]</sup>。以群体感应通路相关的蛋白作为抑制细菌增殖和外毒素分泌等过程的嗜水气单胞菌的防治方法也被广泛报道,目前已涵盖了人工合成的化合物、植物天然化合物以及免疫调节剂等<sup>[24]</sup>。其中天然化合物因其制备简单、环境影响小、来源广泛的特点,受到研究者的广泛关注,如植物七叶草提取物、抗菌蛋白、藻类和益生菌等<sup>[25]</sup>。在对白黎蒴醇的抗菌性研究中发现,其能够有效改变铜绿假单胞菌细胞膜通透性,从而抑制细菌毒力因子的表达,增强对抗生素的敏感性<sup>[26]</sup>。另一项对染料木素的研究发现,其作为一种黄酮化合物,能够通过减少气溶素产生和生物膜形成来抑制群体感应系统基因 *ahyI* 和 *ahyR* 的转录,从而提升鱼类抗感染能力<sup>[27]</sup>。在对连翘提取物的研究中,发现其可作为嗜水气单胞菌新型抑制剂,分子对接结果验证槲皮素、咖啡酸等成分可与细菌群体感应 LasR 受体蛋白竞争性结合,从而抑制群体感应系统<sup>[28]</sup>。丁婷等<sup>[29]</sup>也从米曲霉 D01 中分离了一种环二肽 L-苯丙氨酸-L-脯氨酸,该物质能与 LuxI 型蛋白竞争性结合,阻碍信号分子产生,显著抑制荧光假单胞菌胞外蛋白酶产生及生物被膜的形成。这些天然物质具有低毒性、高效性、不易导致耐药性等优点,在替代性治疗方面具有重要意义。

本研究运用同源建模方法,构建了嗜水气单胞菌群体感应关键酶的三维结构模型 AH\_gro,并为分子对接筛选小分子抑制剂提供了受体蛋白模型。在已有研究的基础上,Chung 等<sup>[10]</sup>发现了两个高效抑制剂 NOO 和 MTA,其中 NOO 对 AhyI 合成酶的抑制效力更强。鉴于 AH\_gro 与 3p2h 的活性部位相似,NOO 极有可能成为 AhyI

合成酶的潜在抑制剂。因此,通过前期研究和模型预测,本研究确定了配体来源,一部分源自合理改造的 NOO;另一部分源自传统中药的抑菌活性成分,共计 214 个配体。通过分子对接和力场分析,从中选取了 4 种结合能较低的候选抑制剂进行生物学实验验证,并通过可视化作图分析 4 种配体与 AH\_gro 蛋白的氢键结合情况及相互作用力,说明青蒿素等候选抑制剂是通过与 AhyI 合成酶作用,抑制该酶在细菌 QS 系统中发挥作用,减少 AHLs 等信号分子的生成,从而起到控制细菌毒力因子产生、生物膜的形成等作用,抑制细菌的致病性。

在体外试验中,通过测定 MIC 值和生长曲线评估了候选抑制剂对菌株生长的影响,为确定实验浓度提供了依据。实验结果显示,大黄素、青蒿素、 $\beta$ -石竹烯和表儿茶素能有效抑制信号分子的产生,且这种抑制作用呈现剂量依赖效应。而在 0.2 mg/mL 浓度下的青蒿素可以显著抑制嗜水气单胞菌生物膜形成、胞外蛋白酶活性及细菌运动作用,推测青蒿素可通过减少 AHLs 干扰群体感应系统从而降低毒力因子的表达。此外,群体感应抑制剂通过抑制 AhyI 合成酶产生信号分子,有利于从源头上减少耐药菌的产生。

青蒿素作为一种天然药物,随着生产工艺研究的深入,已逐步解决了制约其规模化生产的关键技术,显著降低了生产成本<sup>[30]</sup>。而在大规模水体中使用青蒿素的应用效果涉及多个方面,包括抑菌效果、稳定性和分解速度等。在实际应用中,还需对水体体积、水质条件以及细菌的种类和浓度等因素作多方面检测分析。目前关于青蒿素在大规模水体中的应用效果尚且缺乏全面的研究数据,参考其他相关药物的使用情况发现,青蒿素相比于其他抗菌类药物,由于其具有的天然性、无害性,能够有效避免对水体环境的污染,但同时也要注意合理适度使用,防止菌群耐药性

的产生<sup>[31]</sup>。已有研究显示,青蒿素及其衍生物对结核分枝杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌及幽门螺杆菌等多种临床常见的致病菌、耐药菌都具有直接或者协同的抗菌作用<sup>[32]</sup>。本研究表明青蒿素可作为嗜水气单胞菌群体感应系统的高效抑制剂,但由于不同菌株所具有理化性质的不同,可能存在不同种产 AHLs 细菌对青蒿素的敏感程度不同,因此关于青蒿素对其他产生群体感应信号的细菌的治疗效果仍需要进一步的实验研究来评估。总而言之,青蒿素这种传统中药,在水产养殖业中作为有效防治嗜水气单胞菌的药物具有广阔的应用前景。本研究不仅为水产养殖业中嗜水气单胞菌的有效防治提供了基础,也为预防细菌耐药性的产生提供了新思路。

## REFERENCES

- [1] RAMOS-GALLARDO G. Chronic wounds in burn injury: a case report on importance of biofilms[J]. World Journal of Plastic Surgery, 2016, 5(2): 175-180.
- [2] BÄUERLE T, FISCHER A, SPECK T, BECHINGER C. Self-organization of active particles by quorum sensing rules[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3232.
- [3] WEI CJ, ZHAO XH. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by low temperature and its resuscitation[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2728.
- [4] 崔一. 嗜水气单胞菌群体感应系统对其生物学特性的调控研究[D]. 大连: 大连工业大学硕士学位论文, 2016.
- CUI Y. Regulation of *Aeromonas hydrophila* quorum sensing system on its biological characteristics[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2016 (in Chinese).
- [5] KOZLOVA EV, POPOV VL, SHA J, FOLTZ SM, EROVA TE, AGAR SL, HORNEAN AJ, CHOPRA AK. Mutation in the *S*-ribosylhomocysteine (*luxS*) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbial Pathogenesis, 2008, 45(5/6): 343-354.
- [6] SWIFT S, LYNCH MJ, FISH L, KIRKE DF, TOMÁS JM, STEWART GS, WILLIAMS P. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(10): 5192-5199.
- [7] KIRKE DF, SWIFT S, LYNCH MJ, WILLIAMS P. The *Aeromonas hydrophila* LuxR homologue AhvR regulates the *N*-acyl homoserine lactone synthase, AhvI positively and negatively in a growth phase-dependent manner[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 241(1): 109-117.
- [8] CHANG CY, KRISHNAN T, WANG H, CHEN Y, YIN WF, CHONG YM, TAN LY, CHONG TM, CHAN KG. Non-antibiotic quorum sensing inhibitors acting against *N*-acyl homoserine lactone synthase as druggable target[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 7245.
- [9] ZENG ZR, QIAN L, CAO LX, TAN HM, HUANG YL, XUE XL, SHEN Y, ZHOU SN. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 79(1): 119-126.
- [10] 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.
- [11] MAEDA T, GARCÍA-CONTRERAS R, PU MM, SHENG LL, GARCIA LR, TOMÁS M, WOOD TK. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds[J]. The ISME Journal, 2012, 6(3): 493-501.
- [12] JAVED MR. CADD and molecular dynamic simulations: potential impacts to conventional medicines[J]. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2022, 25(4): 658-659.
- [13] SALMAN MM, AL-OBAIDI Z, KITCHEN P, LORETO A, BILL RM, WADE-MARTINS R. Advances in applying computer-aided drug design for neurodegenerative diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4688.
- [14] ZHANG LN, WEI FJ, ZHANG JW, LIU CF, LÓPEZ-CARROBLES N, LIU XY, MENÉNDEZ-ARIAS L, ZHAN P. Current medicinal chemistry strategies in the discovery of novel HIV-1 ribonuclease H inhibitors[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 243: 114760.
- [15] LLORACH-PARES L, NONELL-CANALS A, AVILA C, SANCHEZ-MARTINEZ M. Computer-aided drug design (CADD) to de-orphanize marine molecules: finding potential therapeutic agents for neurodegenerative and cardiovascular diseases[J]. Marine Drugs, 2022, 20(1): 53.
- [16] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, PEITSCH MC.

- SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [17] HOLM L, ROSENSTRÖM P. Dali server: conservation mapping in 3D[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(suppl\_2): W545-W549.
- [18] WIEDERSTEIN M, SIPPL MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(suppl\_2): W407-W410.
- [19] 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(2): 163-175.
- [20] HUSAIN FM, AHMAD I, KHAN MS, AHMAD E, TAHSEEN Q, KHAN MS, ALSHABIB NA. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 420.
- [21] CHU WH, ZHOU SX, ZHU W, ZHUANG XY. Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 5446.
- [22] HUSAIN FM, AHMAD I. Doxycycline interferes with quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation in gram-negative bacteria[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(6): 949-957.
- [23] ABDUL KARI Z, WEE W, MOHAMAD SUKRI SA, CHE HARUN H, HANIF REDUAN MF, IRWAN KHOO M, van DOAN H, WEN GOH K, SEONG WEI L. Role of phytochemicals in relieving the impacts of *Aeromonas hydrophila* infection on aquatic animals: a mini-review[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 1023784.
- [24] CHEN JH, WEI WY, LIANG C, REN YQ, GENG Y, CHEN DF, LAI WM, GUO HR, DENG HD, HUANG XL, OUYANG P. Protective effect of cinnamaldehyde on channel catfish infected by drug-resistant *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 167: 105572.
- [25] SUN B, LUO HZ, JIANG H, WANG ZN, JIA AQ. Inhibition of quorum sensing and biofilm formation of esculetin on *Aeromonas hydrophila*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 737626.
- [26] 綦国红, 杨志萍, 王海翔, 陈贵堂. 白藜芦醇对铜绿假单胞菌群体感应抑制作用[J]. 食品工业, 2023, 44(5): 178-182.
- QI GH, YANG ZP, WANG HX, CHEN GT. Inhibition effect of resveratrol on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. The Food Industry, 2023, 44(5): 178-182 (in Chinese).
- [27] DONG J, ZHANG DF, LI JR, LIU YT, ZHOU S, YANG YB, XU N, YANG QH, AI XH. Genistein inhibits the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* by disrupting quorum sensing mediated biofilm formation and aerolysin production[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 753581.
- [28] 许腾腾, 赵慧娟, 刘尊英. 连翘提取物对嗜水气单胞菌群体感应系统的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 256-269.
- XU TT, ZHAO HJ, LIU ZY. Effect of *Forsythia suspensa* extract on quorum sensing system of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 256-269 (in Chinese).
- [29] 丁婷, 李勇. 米曲霉来源的环二肽对荧光假单胞菌群体感应的抑制及其机制[J]. 生物加工过程, 2020, 18(2): 234-244.
- DING T, LI Y. Inhibition on quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* by cyclic dipeptide isolated from *Aspergillus oryzae* and its mechanism[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(2): 234-244 (in Chinese).
- [30] 张锁江, 张军平, 张梅香, 王慧, 张迎, 张永强. 一种生产青蒿素的系统[P]: 中国, ZP201821539174.5. 2019-06-07.
- ZHANG SJ, ZHANG JP, ZHANG MX, WANG H, ZHANG Y, ZHANG YQ. A system for producing artemisinin[P]: China, ZL201821539174.5. 2019-06-07 (in Chinese).
- [31] 田凌云. 茜草素对湖水中微生物耐药性及其群落的影响[D]. 南京: 南京信息工程大学硕士学位论文, 2023.
- TIAN LY. Effect of rubicin on microbial resistance and community in lake water[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Information Science & Technology, 2023 (in Chinese).
- [32] 蒋为薇, 钱妍. 青蒿素及其衍生物抗菌活性的研究进展[J]. 中国药房, 2019, 30(14): 2003-2007.
- JIANG WW, QIAN Y. Research progress on antibacterial activity of artemisinin and its derivatives[J]. China Pharmacy, 2019, 30(14): 2003-2007 (in Chinese).