

氮杂环卡宾银配合物 SBC3 靶向大肠杆菌 TDRS 杀菌的作用机制

谭超^{1,2#}, 伍中宝^{1#}, 沈舒楚¹, 黎国春³, Matthias Tacke⁴, 王君^{5*}, 邹黎黎^{1*}

1 三峡大学 基础医学院, 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室&宜昌市感染与炎症损伤重点实验室, 湖北 宜昌

2 宜昌市中心人民医院, 湖北 宜昌

3 宜昌市夷陵人民医院, 湖北 宜昌

4 School of Chemistry, University College Dublin, Dublin, Ireland

5 宜昌市第二人民医院, 湖北省老年胃肠癌精准防治临床医学研究中心, 湖北 宜昌

谭超, 伍中宝, 沈舒楚, 黎国春, Matthias Tacke, 王君, 邹黎黎. 氮杂环卡宾银配合物 SBC3 靶向大肠杆菌 TDRS 杀菌的作用机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2128-2143.

TAN Chao, WU Zhongbao, SHEN Shuchu, LI Guochun, Matthias Tacke, WANG Jun, ZOU Lili. The N-heterocyclic carbene-silver complex SBC3 inhibits *Escherichia coli* by targeting TDRS[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(5): 2128-2143.

摘要: 新型氮杂环卡宾银配合物(N-heterocyclic carbene silver, Ag-NHC)兼具优异的稳定性、水溶性和杀菌活性,是具有巨大应用前景的抗菌候选物。【目的】探讨合成的 1,3-二苄基 Ag-NHC [1,3-dibenzyl-4,5-diphenylimidazol-2-ylidene silver (I) acetate, SBC3]对大肠杆菌的抗菌活性及作用机制。【方法】采用可见分光光度法检测 SBC3 的抗菌活性;使用透射电子显微镜观察 SBC3 处理后大肠杆菌 DHB4 菌株的形态学变化;通过 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]实验检测 SBC3 处理后 DHB4 胞内硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)及硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)的活性和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量;利用流式细胞术检测 SBC3 对 DHB4 胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的影响,并通过还原剂二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)进行挽救实验。通过在实验室连续传代,获得 SBC3 耐受性大肠杆菌菌株 SBC3-resistant strains (SRSs)。其中 SRS3、SRS4 和 SRS7 菌株对 SBC3 的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)依次为 24、32 和 56 $\mu\text{g/mL}$,分别为野生菌株 MIC 的 3 倍、4 倍和 7 倍。

资助项目: 国家自然科学基金(32170191);湖北省自然科学基金创新发展联合基金(2024AFD132);宜昌市医疗卫生计划(B24-2-011)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170191), the Natural Science Foundation Joint Fund for Innovation and Development of Hubei Province (2024AFD132), and the Yichang Medical and Health Program (B24-2-011).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: ZOU Lili, zoulili@ctgu.edu.cn; WANG Jun, wangjfox@ctgu.edu.cn

Received: 2024-11-25; Accepted: 2024-12-23; Published online: 2025-02-28

将对应的菌株分别命名为 SRS3、SRS4 和 SRS7, 并使用这 3 种菌株复测上述指标; 采用 Western blotting 检测 SBC3 对 Trx1 及 *S*-谷胱甘肽化蛋白(*S*-glutathionylated proteins, *S*-PSSG)表达量的影响。【结果】SBC3 对实验菌株的 MIC 为 8.0–30.0 $\mu\text{g/mL}$; SBC3 处理后的 DHB4 菌株发生肿胀, 并伴有内容物流出; SBC3 可显著抑制 DHB4 胞内 Trx 和 TrxR 的活性, 明显降低 GSH 的含量, 同时升高 ROS 水平。此外, SBC3 处理后的 SRS3、SRS4 和 SRS7 菌株胞内 Trx 和 TrxR 的蛋白活性降低, GSH 含量和 *S*-PSSG 的蛋白表达水平降低, 但与 DHB4 菌株相比有不同程度的升高。【结论】SBC3 通过靶向大肠杆菌的硫醇依赖的氧化还原系统(thiol-dependent redox system, TDRS)系统发挥其抗菌作用, 为 SBC3 作为新型抗菌剂的开发设计提供了新思路。

关键词: SBC3; 氮杂环卡宾银配合物; 硫醇依赖的氧化还原系统

The N-heterocyclic carbene-silver complex SBC3 inhibits *Escherichia coli* by targeting TDRS

TAN Chao^{1,2#}, WU Zhongbao^{1#}, SHEN Shuchu¹, LI Guochun³, Matthias Tacke⁴, WANG Jun^{5*}, ZOU Lili^{1*}

1 Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy & Yichang Key Laboratory of Infection and Inflammation, School of Basic Medicine, China Three Gorges University, Yichang, Hubei, China

2 Yichang Central People's Hospital, Yichang, Hubei, China

3 Yichang Yiling Hospital, Yichang, Hubei, China

4 School of Chemistry, University College Dublin, Dublin, Ireland

5 Hubei Provincial Clinical Research Center for Precise Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer in the Elderly, The Second People's Hospital of Yichang, Yichang, Hubei, China

Abstract: N-Heterocyclic carbene-silver (Ag-NHC) complexes possessing excellent stability, water solubility, and bactericidal activity are antimicrobial candidates with great potential. **[Objective]** To study the inhibitory activity and mechanism of a novel Ag-NHC complex 1,3-dibenzyl-4,5-diphenylimidazol-2-ylidene silver (I) acetate (SBC3), synthesized by Matthias Tacke's team against *Escherichia coli*. **[Methods]** Visible spectrophotometry was employed to examine the antimicrobial activity of SBC3. Transmission microscopy was employed to observe the morphological changes of DHB4 cells post SBC3 treatment. Flow cytometry was performed to detect the effect of SBC3 on the intracellular reactive oxygen species (ROS) content. The 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) assay was used to determine the intracellular thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) activities and the content of glutathione (GSH) post SBC3 treatment. Dithiothreitol (DTT), the ROS scavenger, was added to rescue DHB4 from ROS. SBC3-resistant strains (SRSs) were obtained by successive passaging in the laboratory. The obtained strains showed the minimal inhibitory concentrations (MICs) against SBC3 being 24, 32, and 56 $\mu\text{g/mL}$, respectively, which were 3, 4, and 7 folds of the MIC of WT. The three strains were named SRS3, SRS4, and SRS7 and then used to retest the above indicators. Western blotting was

performed to determine the expression levels of Trx1 and *S*-glutathionylated proteins (*S*-PSSG) post SBC3 treatment. **[Results]** The MIC values of SBC3 against tested pathogens were 8.0–30.0 $\mu\text{g/mL}$. The DHB4 cells treated with SBC3 underwent swelling, which was accompanied by contents leakage. SBC3 significantly inhibited the Trx and TrxR activities, reduced the GSH content, and elevated the ROS level in DHB4. SBC3 treatment decreased the Trx and TrxR activities, reduced the GSH content, and down-regulated the expression of *S*-PSSG in SRS3, SRS4, and SRS7. However, all the above indicators were increased to different extent compared with those in DHB4. **[Conclusion]** SBC3 can target the thiol-dependent redox system (TDRS) of *E. coli* to exert antibacterial effects. This study provides a new idea for the design of SBC3 as a novel antimicrobial agent.

Keywords: SBC3; N-heterocyclic carbene-silver (Ag-NHC) complex; thiol-dependent redox system (TDRS)

抗生素应用于抗感染治疗已将近一个世纪，而抗生素的广泛使用甚至滥用加剧了细菌抗生素耐受性的获得性进化^[1]。抗生素耐药基因在细菌间广泛传播，给临床抗感染治疗和全球公共卫生带来了巨大挑战。因此，开发新型抗菌药物与提高传统抗生素疗效成为了全球公共卫生领域的研究重点。

银离子(silver ion, Ag^+)因其广谱抗菌、低毒性等特点^[2]，自古以来就被广泛应用于烧伤、创伤和细菌感染的治疗^[3-4]。然而， Ag^+ 耐受性细菌的出现使得临床感染性疾病的治疗面临着新的挑战^[5-6]。含 Ag^+ 化合物，如硝酸银和磺胺嘧啶银，虽被广泛应用，但存在用药部位留存浓度不足、影响皮肤正常屏障功能等缺点。因此，这些化合物在控制创面愈合方面往往无法及时发挥效用，选择更加理想的抗菌材料至关重要^[7]。为了提高 Ag^+ 的抗菌效能，研究人员尝试了多种改造方法，包括制备纳米银、氟化银和银基化合物等^[8-9]。

氮杂环卡宾化合物(N-heterocyclic carbene, NHC)得益于其特殊的电子结构、较高的反应活性、形成配合物后的稳定性以及绿色环保可循环再利用性，被用于 Ag^+ 化合物的改造中。第一个被表征结构的氮杂环卡宾银复合物(Ag-NHC)由游离卡宾和银盐^[10]制备而成，并已应用于乙

酸银^[11]、 Ag_2O ^[12]及 Ag_2CO_3 ^[13]等的合成中。Melaiye 等^[14]研究发现，Ag-NHC 对革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌均有出色的抗菌效果，且其抗菌效果优于银盐^[15]。Ag-NHC 的稳定性、水溶性和杀菌活性使其在生物医药研究领域得到拓展应用^[16]，其能够通过缓慢释放 Ag^+ 来持续发挥预防感染和促进伤口愈合的作用^[17]。

本研究旨在阐述 Matthias Tacke 团队合成的 Ag-NHC，即 1,3-二苄基 Ag-NHC (1,3-dibenzyl-4,5-diphenylimidazol-2-ylidene silver (I) acetate, SBC3^[18-19])的抗菌机制，为临床治疗感染性疾病及抗菌药物设计提供参考^[20-21]。研究发现 SBC3 对常见实验室菌株具有良好抗菌作用，值得进一步探究其杀菌机制。已知 Ag^+ 可与细菌胞内的硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)/硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)活性位点发生不可逆结合，从而破坏 TrxR 和 Trx 的功能，影响细菌胞内的硫醇氧化还原稳态^[22]。硫醇依赖的氧化还原系统(thiol-dependent redox system, TDRS)，即 Trx 与谷胱甘肽(glutathione, GSH)系统，是细菌胞内最重要的维持活性氧(reactive oxygen species, ROS)稳态的系统^[23-24]。近年来，靶向细菌胞内氧化还原系统的抗菌药物(如依布硒啉^[25]、金诺芬^[26])均展现出了优异的抗菌能力。

SBC3 作为一种可通过快速释放 Ag^+ 而发挥

抗菌活性的药物^[27], 据此推测它也可通过靶向 TDRS 发挥抗菌活性。在此基础上, 本研究进一步通过实验室连续传代, 获得了 DHB4 来源的 SBC3 耐受性大肠杆菌菌株(SBC3-resistant *Escherichia coli* strains, SRSs), 包括 SRS3、SRS4 和 SRS7, 均已通过体外实验验证其表型稳定性。本研究拟以标准株 DHB4 和耐药株 SRS3、SRS4、SRS7 为模型, 探究 SBC3 是否通过损伤细菌的 TDRS 导致氧化还原稳态失调, 从而发挥其抗菌活性。这一研究将为理解 Ag-NHC 的抗菌机制提供新的视角, 并有助于制定有效的抗菌策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

大肠杆菌 DHB4、鲍曼不动杆菌 ATCC-19606、阴沟肠杆菌 ATCC-700323、肺炎克雷伯杆菌 ATCC-700603、铜绿假单胞菌 ATCC-27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China general Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。实验室连续传代获得以 DHB4 为来源的 SBC3 耐受性菌株 SRS3、SRS4 和 SRS7。

本研究检测 SBC3 对菌株的最小抑菌浓度及菌落形成实验中所使用的细菌初始菌量均为 $OD_{600}=0.4$ 后按 1:1 000 的比例稀释混匀, 其余实验初始菌量为 $OD_{600}=0.4$ 。因此, 各实验中使用的 SBC3 浓度会根据起始菌量的差异而不同。

1.1.2 主要试剂和仪器

SBC3, Matthias Tacke 团队合成; EbSe, Selleck Chemicals 公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 北京普利莱基因技术有限公司; 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯、硫氧还蛋白、谷胱甘肽还原酶、二甲基亚砜, Sigma-Aldrich 公司; 二硫苏糖醇, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 大肠杆菌属 anti-glutathione 单抗、anti-PSSG 单抗, ViroGen

公司; 硫氧还蛋白还原酶、大肠杆菌属 thioredoxin 1 蛋白, IMOC Crop 公司; 山羊抗小鼠 IgG, 艾博抗(上海)贸易有限公司; 兔抗绵羊 IgG, 北京百奥莱博科技有限公司。

全自动酶标仪, ThermoFisher Scientific 公司; 恒温摇床, 上海捷呈实验仪器有限公司; 台式高速离心机, Eppendorf 公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 电子恒温水浴锅, 上海齐欣科学仪器有限公司; 化学发光成像仪, 上海勤翔科学仪器有限公司; 电泳仪电源, 北京市六一仪器厂; 分析型流式细胞仪, Beckman Coulter 公司; 脱色摇床, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 透射电子显微镜, Hitachi 公司。

1.2 可见分光光度法检测 SBC3 的抗菌活性

可见分光光度法是根据被测菌液对可见波段范围单色光的吸收或反射光谱特性进行细菌定量分析的一种方法。在 600 nm 波长下, 酶标仪(分光光度计)对浊度的反应较为灵敏。 OD_{600} 是指在 600 nm 波长下测得的吸光值, 本研究用于测量细菌生长情况或菌液密度。

大肠杆菌 DHB4、鲍曼不动杆菌 ATCC-19606、阴沟肠杆菌 ATCC-700323、肺炎克雷伯杆菌 ATCC-700603、铜绿假单胞菌 ATCC-27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 于 37 °C、220 r/min 培养过夜后, 分别用 LB 液体培养基将培养至对数生长期($OD_{600}=0.6-0.8$)的菌液 OD_{600} 调至 0.4。按照 1:1 000 的比例稀释混匀后, 用不同浓度的 SBC3 处理(环丙沙星作为阳性对照)。混匀后接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 设置 4 个复孔。将 96 孔板置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 并在酶标仪上连续监测 0、2、4、8、16、24 h 的 OD_{600} 。

1.3 菌落形成实验检测 SBC3 对 DHB4 菌株的杀伤效果

大肠杆菌 DHB4 于 37 °C、220 r/min 培养 12 h 后, 用 LB 液体培养基将培养至对数生长期

($OD_{600}=0.6-0.8$)的菌液 OD_{600} 调至 0.4, 按照 1:1 000 的比例稀释混匀。随后用不同浓度的 SBC3 处理(DMSO 作为对照), 置于 37 °C 温箱静置 16 h, 孵育完毕后, 将处理好的菌液依次倍比稀释至 10^{-6} , 混合均匀后在 LB 固体培养基上进行菌液滴定, 每次 1 μ L, 之后将 LB 固体培养基置于 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h, 观察菌落形成情况。

1.4 透射电子显微镜观察 SBC3 对 DHB4 菌株形态学的影响

将培养至对数生长期($OD_{600}=0.6-0.8$)的菌液用 LB 液体培养基调节其 OD_{600} 为 0.4, 用不同浓度(48 μ g/mL、54 μ g/mL)的 SBC3 处理 10 min, 以 0.8% DMSO 为对照。于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 获得细胞, 弃去上清液后用 PBS 重悬清洗, 去除胞外残留药物及 LB 培养基。清洗后再次离心获得细胞, 继续清洗, 重复 3 次后去除上清液, 用 PBS 重悬细胞, 并用 2.5% 戊二醛固定。在 80 kV 工作电压下, 于透射电子显微镜下以 7 000 $\times$ 、15 000 $\times$ 放大倍数观察 *E. coli* 形态在给药前后的变化。

1.5 流式细胞术检测 SBC3 对 DHB4 胞内 ROS 产量的影响

大肠杆菌 DHB4 于 37 °C、220 r/min 培养 12 h 后, 利用 LB 液体培养基将培养至对数生长期($OD_{600}=0.6-0.8$)的菌液 OD_{600} 调至 0.4, 用 SBC3 处理 30 min; 4 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 用 PBS 重悬 3 次, 最后重悬于 800 μ L PBS 中, 并用终浓度为 10 mmol/L 的 H_2DCFDA 在 37 °C 染色 30 min。用流式细胞仪检测并记录 FITC 通道的平均荧光强度, 最佳激发波长为 488 nm, 最佳发射波长为 525 nm。

1.6 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithio-bis- (2-nitrobenzoic acid), DTNB] 法检测 SBC3 对 DHB4 菌株 TDRS 的影响

TrxR/Trx 与 GSH 活性测定中, TrxR 催化还

原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen, NADPH)还原 DTNB 生成 2-硝基-5-巯基苯甲酸(5-mercapto-2-nitrobenzoic acid, TNB)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $NADP^+$), 谷胱甘肽(glutathione, GSH)与 DTNB 可反应生成 TNB 和谷胱甘肽二硫化物(glutathione disulfide, GSSG), OD_{412} 是 TNB 的最大吸收峰, 为 DTNB 实验的特征产物检测波长。

1.6.1 细菌预处理

大肠杆菌 DHB4 于 37 °C、220 r/min 培养 12 h 后, 用 LB 液体培养基将培养至对数生长期($OD_{600}=0.6-0.8$)的菌液的 OD_{600} 调至 0.4。使用 SBC3 进行处理后混匀, 37 °C 恒温孵育 30 min。4 °C、5 000 r/min 离心 3 min, 用等体积的 PBS 重悬 3 次后弃去上清。

1.6.2 细菌蛋白制备

用 150 μ L 50 mmol/L Tris-HCl 和 2 mmol/L EDTA 重悬细菌沉淀, 加入 10 μ L 蛋白酶抑制剂和 40 μ L 5 mmol/L 溶菌酶混匀, 置于 37 °C 水浴锅中 30 min。利用超声破碎仪裂解细菌(2 mm 变幅杆, 20%-25% 功率, 超声 8 min), 置于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清, 进行蛋白定量。

1.6.3 Trx 活性

取 25 μ g 蛋白, 用超纯水定容至 20 μ L, 加入 200 μ mol/L NADPH、2 mmol/L DTNB、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、2 mmol/L EDTA、100 nmol/L TrxR, 于 OD_{412} 处连续检测 30 min。

1.6.4 TrxR 活性

取 25 μ g 蛋白, 用超纯水定容至 20 μ L, 加入 200 μ mol/L NADPH、2 mmol/L DTNB、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、2 mmol/L EDTA、5 μ mol/L Trx, 于 OD_{412} 处连续检测 30 min。

1.6.5 GSH 含量

取 25 μ g 蛋白, 用超纯水定容至 20 μ L, 加入 200 μ mol/L NADPH、2 mmol/L DTNB、50 mmol/L

Tris-HCl (pH 7.5)、2 mmol/L EDTA、50 nmol/L GR, 于 OD_{412} 处连续检测 30 min。

1.7 耐药菌的筛选与培养

在实验室通过连续传代筛选以 DHB4 为基础的 SBC3 耐受性菌株, 获得 SRS3、SRS4、SRS7 菌株, 这 3 株菌对 SBC3 的 MIC 分别为 DHB4 的 3 倍、4 倍和 7 倍。取少量菌液进行四区平板划线, 于 37 °C 培养过夜(12 h)后, 挑取单克隆接种于装有 2 mL 液体培养基的 EP 管中, 置于 37 °C、220 r/min 恒温摇床中培养 12 h 至对数生长期用于后续实验。

1.8 流式细胞术检测 SBC3 对 SRSs 胞内 ROS 产量的影响

大肠杆菌 DHB4、SRS3、SRS4、SRS7 37 °C 培养过夜后, 按照 1.5 节方法进行后续操作。

1.9 DTNB 实验检测 SBC3 对 SRSs 胞内 TDRS 的影响

大肠杆菌 DHB4、SRS3、SRS4、SRS7 37 °C 培养过夜后, 按照 1.6 节方法进行后续操作。

1.10 Western blotting 检测 SBC3 对 DHB4 及 SRSs 菌株 Trx1 表达水平的影响

大肠杆菌 DHB4 与 SRS3、SRS4、SRS7 37 °C 培养过夜后, 按照 1.6.1 和 1.6.2 节方法进行细菌预处理与蛋白制备。

取 25 μ g 蛋白, 用超纯水定容至 20 μ L, 加入 5 μ L 5 $\times$ Loading Buffer 混匀后, 100 °C 煮沸 10 min。在 12% 聚丙烯酰胺凝胶中进行分组加样, 60 V 恒压电泳 30 min 后, 转为 120 V 继续电泳。180 mA 恒流转膜 60 min, 取出 PVDF 膜置于 5 g/L 脱脂牛奶中封闭 2 h, TBST 清洗 1 次。一抗(Trx)在 4 °C、30 r/min 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; 二抗(兔抗羊)室温、80 r/min 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min。将

PVDF 膜置于 ECL 显影液中 1 min 后, 于显影仪中进行 Trx1 蛋白显影并拍照。

1.11 Western blotting 检测 SBC3 对 DHB4 及 SRSs 菌株 S-PSSG 表达量的影响

大肠杆菌 DHB4 与 SRS3、SRS4、SRS7 37 °C 培养过夜后, 按照 1.6.1 和 1.6.2 节方法进行细菌预处理与蛋白制备。

每组取 25 μ g 蛋白, 后续操作与 1.10 方法一致。封闭洗涤完成后, 一抗(PSSG)在 4 °C、30 r/min 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; 二抗(鼠抗羊)室温、80 r/min 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 将 PVDF 膜置于 ECL 显影液中 1 min 后, 于显影仪中进行 S-PSSG 蛋白显影并拍照。

1.12 统计学方法

实验结果采用统计软件 SPSS 20 进行分析。数值以 mean $\pm$ SD 表示, 组间比较采用 *t* 检验(Student's *t*-test); 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SBC3 具备良好的抗菌活性

为了评价 SBC3 的抗菌效果, 首先检测了其抗菌活性, 并以临床常用抗生素环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)作为阳性对照。连续监测 24 h 发现(图 1), SBC3 可显著抑制大肠杆菌 DHB4、鲍曼不动杆菌 ATCC-19606、阴沟肠杆菌 ATCC-700323、肺炎克雷伯菌 ATCC-700603、铜绿假单胞菌 ATCC-27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC-25923 的生长, 其 MIC 值分别为 8、20、25、30、25 和 16 μ g/mL。这表明 SBC3 对上述实验室常见菌株均具有良好的抗菌活性。

2.2 SBC3 可破坏大肠杆菌细胞正常形态

大肠杆菌 DHB4 过夜培养后, 调整 OD_{600} 为 0.4 后进行菌落形成实验(图 2A)。结果显示, 与对照组相比, 16 μ g/mL 的 SBC3 可抑制大肠

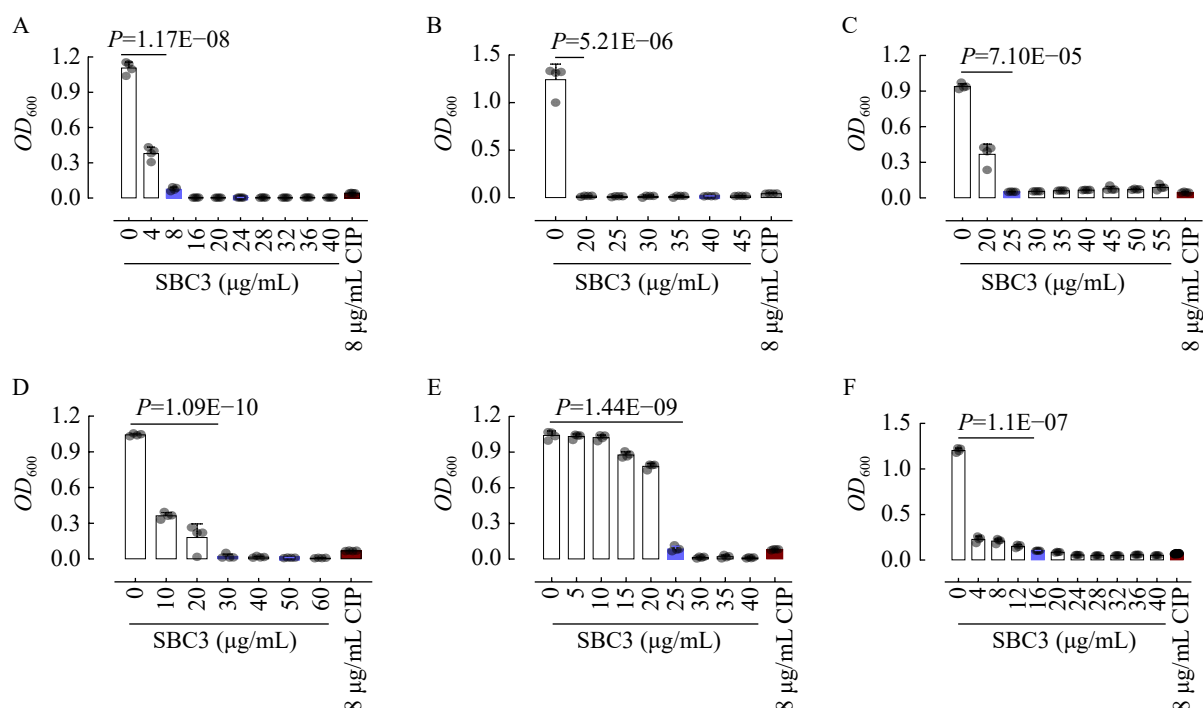


图1 SBC3抗菌活性。 A: SBC3对大肠杆菌DHB4的抗菌效果; B: SBC3对鲍曼不动杆菌ATCC-19606的抗菌效果; C: SBC3对阴沟肠杆菌ATCC-700323的抗菌效果; D: SBC3对肺炎克雷伯菌ATCC-700603的抗菌效果; E: SBC3对铜绿假单胞菌ATCC-27853的抗菌效果; F: SBC3对金黄色葡萄球菌ATCC-25923的抗菌效果。 $P < 0.05$ 表示差异显著, Student's t -test, $n=4$ 。

Figure 1 Antimicrobial activity of SBC3. A: Antibacterial effect of SBC3 against *Escherichia coli* DHB4; B: Antibacterial effect of SBC3 against *Acinetobacter baumannii* ATCC-19606; C: Antibacterial effect of SBC3 against *Enterobacter cloacae* ATCC-700323; D: Antibacterial effect of SBC3 against *Klebsiella pneumoniae* ATCC-700603; E: Antibacterial effect of SBC3 against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853; F: Antibacterial effect of SBC3 against *Staphylococcus aureus* ATCC-25923. $P < 0.05$ indicates significant difference, Student's t -test, $n=4$.

杆菌生长, 而 $18 \mu\text{g/mL}$ 的 SBC3 抑制效果更强, 推测其可能影响细菌的正常生理形态。

进一步通过透射电子显微镜观察(图 2B), 结果表明, 对照组细菌表面光滑, 边缘清晰可见; 而经 SBC3 处理后的细菌发生肿胀, 并伴有内容物流出。这表明 SBC3 可通过破坏大肠杆菌的正常结构来发挥抗菌活性。

2.3 SBC3 可导致大肠杆菌胞内 ROS 产量升高

利用 SBC3 处理对数生长期的 DHB4, 通过 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 荧光探针检测细菌胞内 ROS 水平变

化。与对照组相比(图 3), $48 \mu\text{g/mL}$ 的 SBC3 可使大肠杆菌胞内产生大量 ROS ($P < 0.05$)。二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)是一种经典的细胞内 ROS 清除剂, 与 N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC) 具有类似的清除效果^[28-31]。加入小分子还原剂 DTT 进行“挽救”实验发现, 与未加入 DTT 的组相比, 加入 DTT 可使细菌胞内 ROS 含量显著下降, 并恢复细菌活性($P < 0.05$)。这说明 SBC3 可导致大肠杆菌 DHB4 胞内氧化压力升高。

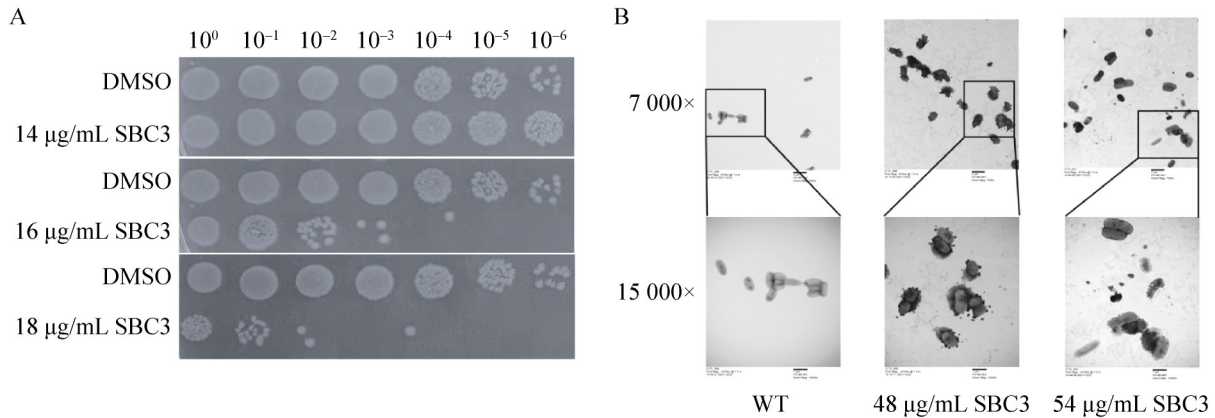


图2 SBC3对DHB4形态的影响。 A: 菌落形成实验评价SBC3对DHB4的杀伤效果; B: 透射电子显微镜下观察SBC3对DHB4形态的影响。

Figure 2 Effect of SBC3 on the morphology of DHB4. A: Colony formation assay to evaluate the killing effect of SBC3 on DHB4; B: Transmission electron microscopy to observe the effect of SBC3 on the morphology of DHB4.

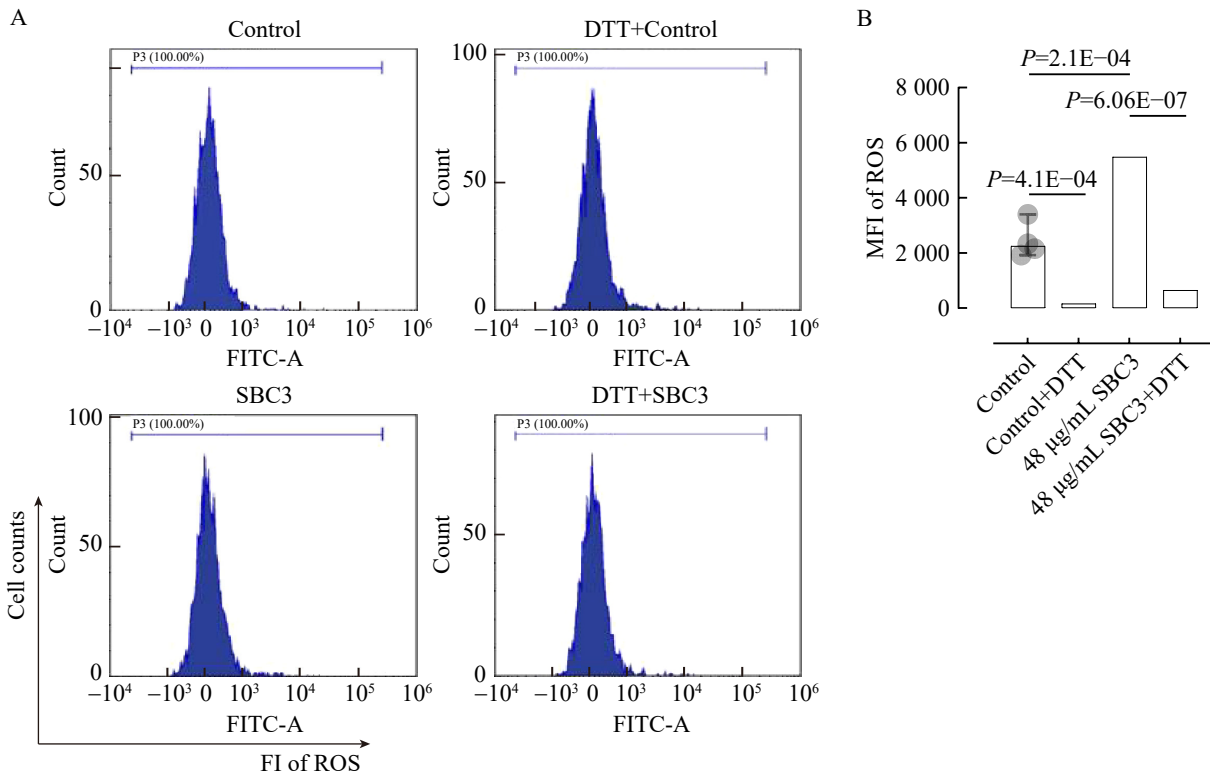


图3 SBC3对DHB4胞内活性氧含量的影响。 A: 流式细胞术检测SBC3对DHB4胞内ROS含量的影响; B: SBC3处理组与SBC3+DTT组的ROS含量的平均荧光强度(MFI)。 $P<0.05$ 表示差异显著, Student's *t*-test, $n=4$ 。

Figure 3 Effect of SBC3 on the intracellular ROS content of DHB4. A: Effect of SBC3 on ROS content in DHB4 *in vivo* detected by flow cytometry; B: Mean fluorescence intensity (MFI) of ROS content in SBC3-treated vs. SBC3+DTT groups. $P<0.05$ indicates significant difference, Student's *t*-test, $n=4$.

2.4 SBC3 可损伤大肠杆菌 TDRS 系统

TDRS 系统是大肠杆菌胞内最重要的抵御氧化压力的硫醇依赖的氧化还原系统。通过 DTNB 法检测 SBC3 对 DHB4 胞内的 Trx、TrxR 活性和 GSH 含量的影响。如图 4 所示, 与对照组相比, 24 $\mu\text{g/mL}$ 的 SBC3 即可显著抑制 Trx 和 TrxR 的活性($P<0.05$), 并降低 GSH 的含量($P<0.05$), 表明 SBC3 可损伤大肠杆菌的 TDRS 系统。

2.5 SRSs 对 SBC3 的耐受性相对于野生菌株显著增高

通过实验室连续定向传代, 获得 SBC3 耐药性菌株 SRSs。为了评价耐药株对 SBC3 的耐药性, 通过 96 孔板实验检测了 SBC3 对耐药株的抗菌活性(图 5)。结果显示, SBC3 对 SRS3、SRS4、SRS7 的 MIC 分别为 24.0、32.0 和 56.0 $\mu\text{g/mL}$, 分别为野生株 DHB4 的 MIC (8.0 $\mu\text{g/mL}$) 的 3 倍、4 倍和 7 倍。

2.6 耐 SBC3 菌株 SRSs 胞内 ROS 含量更低

细菌胞内 ROS 基线水平是评价其抵御杀菌型抗生素抗菌能力的关键指标之一。使用 H_2DCFDA 荧光探针对 SRS3、SRS4、SRS7 进行染色后(图 6A), 流式细胞仪检测细菌胞内 ROS

含量(图 6B)。SRSs 胞内的 ROS 含量显著低于 DHB4 ($P<0.05$), 表明 SRSs 胞内 ROS 基线水平更低。

2.7 SBC3 可影响耐 SBC3 菌株 SRSs 胞内 TDRS 活性

Trx 系统作为大肠杆菌的抗氧化系统, 可通过清除胞内多余的 ROS 避免氧化应激导致的细胞损伤。通过 DTNB 法检测 SBC3 对 SRS3、SRS4、SRS7 胞内的 Trx/TrxR 活性与 GSH 含量的影响, 以 DHB4 为阳性对照(图 7)。结果显示, 与未处理组相比, 54 $\mu\text{g/mL}$ 的 SBC3 可显著抑制 SRS3 的 Trx 和 TrxR 活性及 GSH 含量($P<0.05$)。相比之下, 菌株 SRS4 和 SRS7 对 SBC3 表现出较强的耐受性, SBC3 处理前后 Trx/TrxR 活性与 GSH 含量均无显著变化。此结果进一步表明, SBC3 对大肠杆菌的杀伤作用与其抑制 TDRS 系统活性密切相关。

2.8 SBC3 对 SRSs 蛋白表达的影响

通过 Western blotting 检测发现(图 8), 54 $\mu\text{g/mL}$ SBC3 处理后, 大肠杆菌 DHB4 和 SRS3、SRS4、SRS7 胞内 Trx1 蛋白表达量与未处理组相比均无明显差异($P>0.05$), 表明 SBC3 并不影响 Trx1 蛋白的表达, 仅影响其活性。

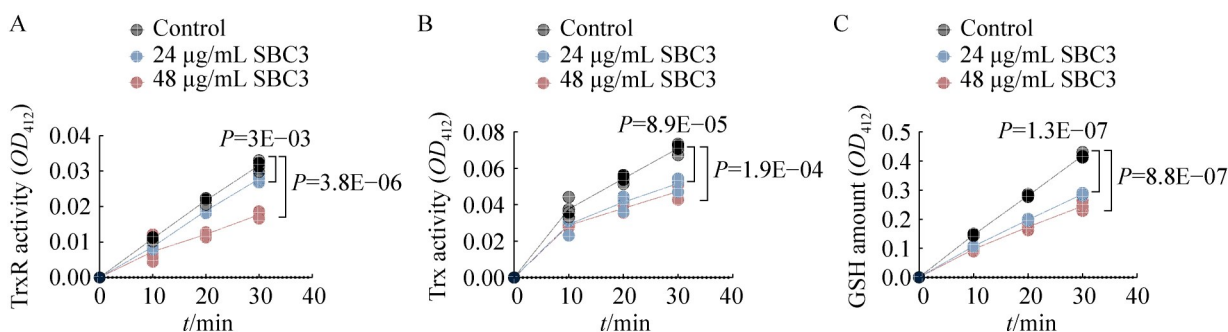


图4 SBC3对大肠杆菌TrxR、Trx活性及GSH含量的影响。A: SBC3对DHB4胞内TrxR的影响; B: SBC3对DHB4胞内Trx的影响; C: SBC3对DHB4胞内GSH含量的影响。 $P<0.05$ 表示差异显著, Student's t -test, $n=4$ 。

Figure 4 Effect of SBC3 on TrxR and Trx activities and GSH content in *E. coli*. A: Effect of SBC3 on DHB4 intracellular TrxR; B: Effect of SBC3 on DHB4 intracellular Trx; C: Effect of SBC3 on DHB4 intracellular GSH content. $P<0.05$ indicates significant difference, Student's t -test, $n=4$.

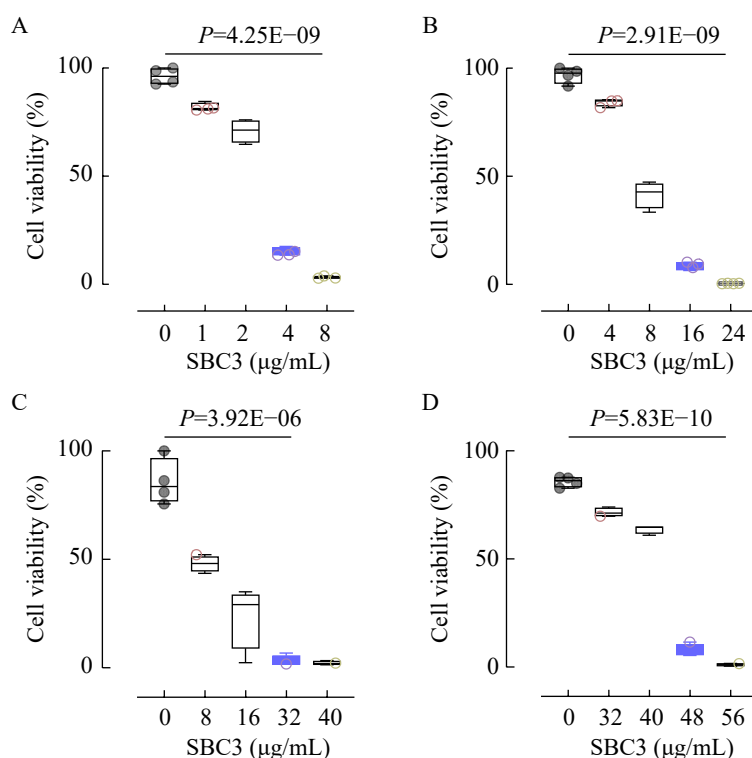


图5 SBC3作用下SRSs的生长曲线。 A: SBC3对大肠杆菌DHB4的抗菌活性; B: SBC3对大肠杆菌耐药株SRS3的抗菌活性; C: SBC3对大肠杆菌耐药株SRS4的抗菌活性; D: SBC3对大肠杆菌耐药株SRS7的抗菌活性。 $P < 0.05$ 表示差异显著, Student's t -test, $n=4$ 。

Figure 5 Growth curves of SRSs in the presence of SBC3. A: Antibacterial activity of SBC3 against *E. coli* DHB4; B: Antibacterial activity of SBC3 against SRS3; C: Antibacterial activity of SBC3 against SRS4; D: Antibacterial activity of SBC3 against SRS7. $P < 0.05$ indicates a significant difference, Student's t -test, $n=4$.

2.9 SBC3可降低耐SBC3菌株SRSs胞内S-PSSG水平

GSH系统是与大肠杆菌Trx系统相互支撑的抗氧化系统。谷胱甘肽与反应性蛋白半胱氨酸共价结合,这一过程称为S-谷胱甘肽化(PSSG)。通过观察每条泳道蛋白的整体表达水平来评价细菌胞内蛋白发生S-PSSG修饰的水平。结果显示(图9),与对照组相比,54 μg/mL SBC3处理可显著下调DHB4、SRS3、SRS4、SRS7胞内S-PSSG蛋白表达水平($P < 0.05$)。此结果进一步表明,SBC3对大肠杆菌的杀伤作用与其抑制GSH系统活性密切相关。

3 讨论与结论

本研究探讨了SBC3的抗菌作用及其机制。ROS是细胞内重要的信号分子,但过量的ROS可导致氧化应激,进而引发细胞损伤。在调节氧化还原平衡的众多系统中,大肠杆菌主要通过TDRS,即Trx和GSH系统,来维持胞内ROS稳态。本研究发现,SBC3可通过显著抑制Trx和TrxR的活性、降低GSH含量和S-PSSG表达水平,导致大肠杆菌DHB4胞内ROS水平上升,破坏细菌的氧化还原平衡,从而发挥抗菌活性。

本研究阐述了SBC3对耐药性的影响。通过实验室连续传代筛选得到的SBC3耐药性大肠杆菌菌株SRS3、SRS4和SRS7,显示出对SBC3

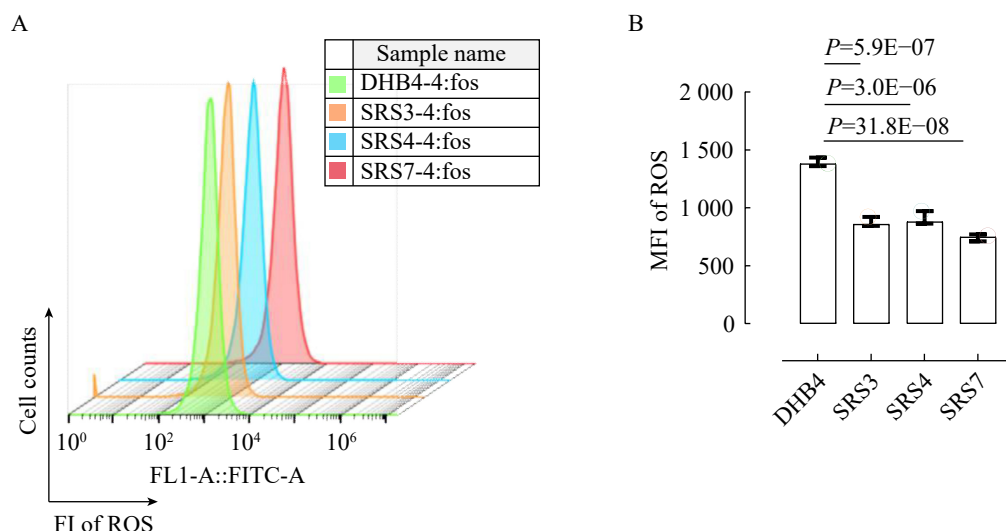


图6 流式细胞术检测SRSs胞内ROS水平。A: 流式细胞术检测DHB4及SRSs经SBC3处理后的胞内细菌数量和ROS含量; B: 流式细胞术检测细菌胞内ROS含量的平均荧光强度。P<0.05表示差异显著, Student's *t*-test, *n*=4。

Figure 6 Detection of intracellular ROS levels in SRSs by flow cytometry. A: Flow cytometry detection of intracellular bacterial counts and ROS levels of DHB4 and SRSs after treatment with SBC3; B: Flow cytometry detection of the mean fluorescence intensity of bacterial intracellular ROS levels. *P*<0.05 indicates a significant difference, Student's *t*-test, *n*=4.

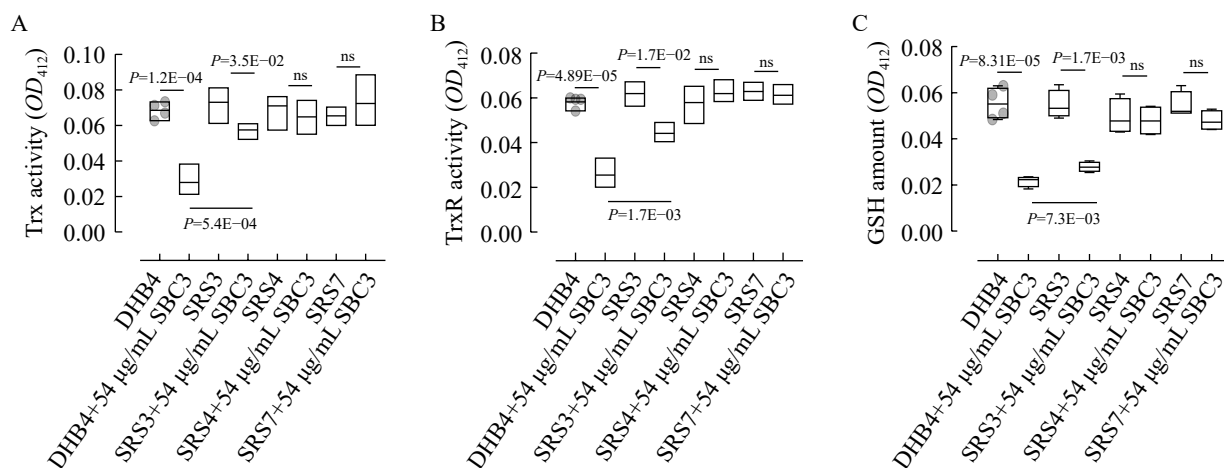


图7 SBC3作用后SRSs中TDRS活性变化。A: SBC3对SRSs胞内Trx活性的影响; B: SBC3对SRSs胞内TrxR活性的影响; C: SBC3对SRSs胞内GSH含量的影响。P<0.05表示差异显著, 反之为差异无统计学意义, 常用无显著差异(no significance, ns)表示, 当Student's *t*-test, *n*=4。

Figure 7 Changes in TDRS activity in SRSs after the treatment of SBC3. A: Effect of SBC3 on SRSs' intracellular Trx activity; B: Effect of SBC3 on SRSs' intracellular TrxR activity; C: Effect of SBC3 on SRSs' intracellular GSH content. *P*<0.05 indicates significant difference, and the ns indicates that difference is not statistically significant, Student's *t*-test, *n*=4.

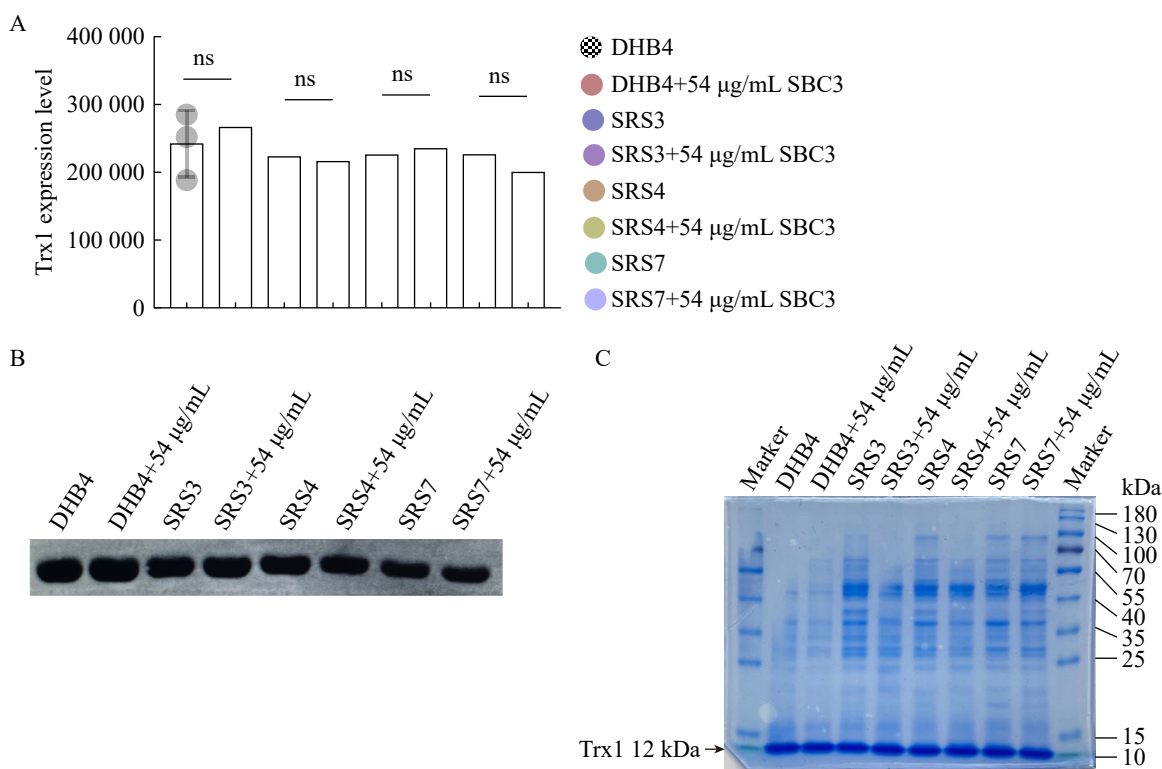


图8 SBC3对Trx1蛋白表达量的影响。 A: 统计Western blotting检测的细菌胞内Trx1表达水平; B: Western blotting检测的细菌胞内Trx1表达水平; C: SDS-PAGE结果图作为上样内参(考马斯蓝染色)。ns为差异无统计学意义, Student's *t*-test, $n=3$ 。

Figure 8 Effect of SBC3 on Trx1 protein expression level. A: Statistics of bacterial intracellular Trx1 expression level detected by Western blotting; B: Bacterial intracellular Trx1 expression level detected by Western blotting; C: SDS-PAGE result graphs were used as the internal reference for up-sampling (stained with Kaomas blue). ns indicates that difference is not statistically significant, Student's *t*-test, $n=3$.

的耐药性。耐药株的 ROS 含量明显低于敏感株 DHB4, 且 SBC3 处理后耐药株 SRS4 和 SRS7 的 Trx/TrxR 活性与 GSH 含量以及 Trx1 表达量无明显变化, 而 S-PSSG 表达量显著下调。这表明即使在细菌具有较高耐药性时, SBC3 仍可作用于 GSH 系统发挥抗菌作用, 在处理多重耐药性革兰氏阴性菌时更具优势, 进一步证实了 TDRS 系统是 SBC3 抗菌作用的靶标。

本研究进一步评估了 SBC3 的抗菌潜力。目前, 具有抗菌活性的 Ag-NHC 已被证实具有用于新型药物设计的潜力^[32]。例如, 静电纺丝经过封装 Ag-NHC 后, 其抗微生物能力显著增强,

且 Ag-NHC 相较于磺胺嘧啶银或硝酸银具有更快的杀灭速率和更高的银生物利用度^[33-34]。Esarev 等^[35]最近也发现, 不同元素配位而成的 Ag-NHC 对革兰氏阴性菌具有广谱的抗菌活性, 不但能够抑制生物膜形成, 还能抑制细菌胞内 GR 和 TrxR^[36]。SBC3 作为一种新型含银化合物, 可充分发挥银的抗菌效能。与传统抗生素不同, SBC3 靶向 TDRS 的抗菌机制涉及破坏细菌的氧化还原平衡, 杀菌作用强且不易产生耐药性, 具有广泛的应用前景。此外, 本研究结果证实, SBC3 可抑制大肠杆菌野生株胞内的 Trx/TrxR 活性和 GSH 含量, 使细菌体内 ROS

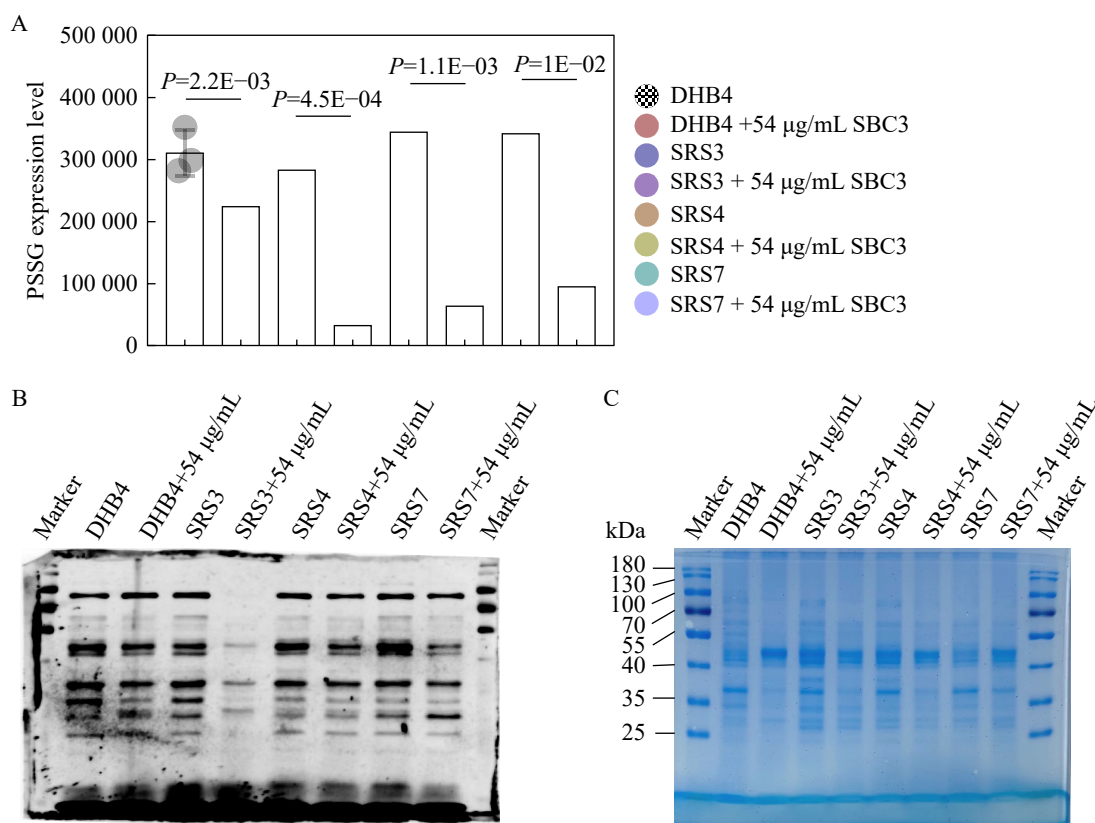


图9 SBC3对S-PSSG蛋白表达量的影响。A: 统计Western blotting检测的细菌胞内S-PSSG表达水平; B: Western blotting检测的细菌胞内S-PSSG表达水平; C: SDS-PAGE结果图作为上样内参(考马斯蓝染色)。 $P < 0.05$ 表示差异显著, Student's t -test, $n=3$ 。

Figure 9 Effect of SBC3 on the expression of S-PSSG protein. A: Statistics of bacterial intracellular S-PSSG expression level detected by Western blotting; B: Bacterial intracellular S-PSSG expression level detected by Western blotting; C: SDS-PAGE result graphs were used as the internal reference for up-sampling (stained with Kaomas blue). $P < 0.05$ indicates significant difference, Student's t -test, $n=3$.

产量升高,通过氧化应激发挥杀菌作用。这一结果与本课题组 Zou 等的长期观察结果一致^[37-40];同时,ROS 作为杀菌型抗生素的作用机制也得到了 Chakraborty 等^[41]、Carvalho 等^[42]和 Song 等^[43]的确认。进一步观察发现,SBC3 处理下耐药株 SRSs 的胞内抗氧化系统活性并无显著变化,这可能是因为其在连续的药物压力下发生了选择性突变(靶点修饰或改变),受体数目减少,同时 SBC3 失去或降低了与靶点的亲和力,导致敏感性和反应性降低。由于细菌体内的抗氧化系统能够正常发挥功能,ROS 处于低

水平,因此不影响细菌的正常生长和代谢。

总之,本研究深入探讨了新型 Ag-NHC 配合物 SBC3 对大肠杆菌的抗菌机制。鉴于抗生素耐药性日益严峻的问题,新型抗菌药物的开发显得尤为迫切。SBC3 因其优异的稳定性、水溶性和杀菌活性成为潜在的抗菌候选物。Zou 等^[44]研究证实,依布硒啉可靶向 TrxR,破坏细菌胞内氧化还原稳态;进一步发现,当依布硒啉与 Ag^+ 联用时抗菌效果更为显著,这依赖于 Ag^+ 诱导的高水平 ROS 增加了细菌的抗氧化负担。这一抗菌机制为我们将 TDRS 系统作为先

导筛选其他抗菌药物奠定了基础。NHC 作为多功能配体, 与过渡金属结合后形成的配合物不仅降低了金属在体内的毒性, 而且发挥了更强的抗菌活性。SBC3 靶向大肠杆菌的 TDRS 系统的抗菌机制涉及破坏细菌的氧化还原平衡, 杀菌作用强且不易产生耐药性, 具有广泛的应用前景。从材料特性来看, Ag-NHC 比银盐表现出更强的抗菌活性。鉴于目前应用较广的是硝酸银, Ag-NHC 有望成为更理想的替代品。在应用过程中, 获得性耐药是细菌在连续低浓度药物处理后产生的一种防御机制。因此, 需要综合考虑使用浓度及其本身的毒理作用来评估细菌产生耐药的可能性。如有耐药情况发生, 应避免长期多次使用 SBC3; 还可联合靶向细菌 TrxR/Trx 的药物(如依布硒啉)以增强抑菌效果和细菌敏感性^[44-45]。由于 SBC3 本身对 GSH 系统具有更直接的靶向效果, 对耐药株已表现出一定的抑菌能力。其对耐药菌株 SRSs 的作用机制在 GSH 系统得到了初步阐释, 耐药株体内的低 ROS 水平以及药物处理后的 Trx 与 GSH 系统功能差异也为理解其深层调节网络和应对耐药性提供了重要信息。本研究不仅为 SBC3 的临床应用提供了科学依据, 也为新型抗菌药物的开发提供了新思路。

尽管本研究证实 SBC3 可靶向 TDRS 发挥杀菌作用, 但其具体分子机制仍然未知。因此, 本课题组对已获得的 SRSs 进行了全基因组测序(whole genome sequencing, WGS), 期望能发现一些新的氧化还原网络相关分子。初步的 WGS 结果分析发现, 编码三甲胺-N-氧化还原酶特异性伴侣蛋白的 *torD* 发生了 AGC→AAC 的突变, 编码环氧核苷还原酶的 *queG* 发生了 GTC→GTT 和 TTC→TTT 的突变。然而, 由于氧化还原家族成员众多且功能互为替补, 要准确判断参与其中的新分子, 仍需进一步的实验验证。我们期望在后续研究中取得突破, 并及时进行报道。

作者贡献声明

谭超: 研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改; 伍中宝: 协助实验操作、论文撰写和修改、论文讨论; 沈舒楚: 协助实验操作、数据收集和处理; 黎国春: 论文讨论; Matthias Tacke: 提供技术支持; 王君: 参与论文讨论、提供技术支持; 邹黎黎: 研究构思和设计、参与论文讨论、论文撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] JIAN ZH, ZENG L, XU TJ, SUN S, YAN SX, YANG L, HUANG Y, JIA JJ, DOU TF. Antibiotic resistance genes in bacteria: occurrence, spread, and control[J]. Journal of Basic Microbiology, 2021, 61(12): 1049-1070.
- [2] MEDICI S, PEANA M, NURCHI VM, ZORODDU MA. Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(13): 5923-5943.
- [3] RAI M, YADAV A, GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(1): 76-83.
- [4] CHOUDHURY H, PANDEY M, LIM YQ, LOW CY, LEE CT, MARILYN TCL, LOH HS, LIM YP, LEE CF, BHATTAMISHRA SK, KESHARWANI P, GORAIN B. Silver nanoparticles: advanced and promising technology in diabetic wound therapy[J]. Materials Science and Engineering: C, 2020, 112: 110925.
- [5] MURAKAMI S, OKADA U, van VEEN HW. Tripartite transporters as mechanotransmitters in periplasmic alternating-access mechanisms[J]. FEBS Letters, 2020, 594(23): 3908-3919.
- [6] HENDRY AT, STEWART IO. Silver-resistant *Enterobacteriaceae* from hospital patients[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1979, 25(8): 915-921.
- [7] BELL TA, GRAYSTON JT, KROHN MA, KRONMAL RA. Randomized trial of silver nitrate, erythromycin, and no eye prophylaxis for the prevention of conjunctivitis among newborns not at risk for gonococcal *Ophthalmitis*. eye prophylaxis study group[J]. Pediatrics, 1993, 92(6): 755-760.
- [8] ZHANG LQ, WANG WX. Dominant role of silver ions in silver nanoparticle toxicity to a unicellular *Alga*: evidence from luminogen imaging[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(1): 494-502.
- [9] ALVES-BARROCO C, RIVAS-GARCÍA L,

- FERNANDES AR, BAPTISTA PV. Light triggered enhancement of antibiotic efficacy in biofilm elimination mediated by gold-silver alloy nanoparticles[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 841124.
- [10] ARDUENGO AJ III, RASIKA DIAS HV, CALABRESE JC, DAVIDSON F. Homoleptic carbene-silver (I) and carbene-copper (I) complexes[J]. *Organometallics*, 1993, 12(9): 3405-3409.
- [11] GUERRET O, SOLÉ S, GORNITZKA H, TEICHERT M, TRINQUIER G, BERTRAND G. 1,2,4-triazole-3,5-diylidene: a building block for organometallic polymer synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(28): 6668-6669.
- [12] WANG HMJ, LIN IJB. Facile synthesis of silver (I)-carbene complexes. useful carbene transfer agents[J]. *Organometallics*, 1998, 17(5): 972-975.
- [13] TULLOCH AAD, DANOPOULOS AA, WINSTON S, KLEINHENZ S, EASTHAM G. N-functionalised heterocyclic carbene complexes of silver[J]. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 2000(24): 4499-4506.
- [14] MELAIYE A, SIMONS RS, MILSTED A, PINGITORE F, WESDEMIOTIS C, TESSIER CA, YOUNGS WJ. Formation of water-soluble pincer silver (I)-carbene complexes: a novel antimicrobial agent[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, 47(4): 973-977.
- [15] PRENCIPE F, ZANFARDINO A, Di NAPOLI M, ROSSI F, D'ERRICO S, PICCIALLI G, MANGIATORDI GF, SAVIANO M, RONGA L, VARCAMONTI M, TESAURO D. Silver (I) N-heterocyclic carbene complexes: a winning and broad spectrum of antimicrobial properties[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5): 2497.
- [16] KARAASLAN MG, AKTAŞ A, GÜRSER C, GÖK Y, ATEŞ B. Chemistry, structure, and biological roles of Au-NHC complexes as TrxR inhibitors[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 95: 103552.
- [17] FULLER FW, PARRISH M, NANCE FC. A review of the dosimetry of 1% silver sulfadiazine cream in burn wound treatment[J]. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 1994, 15(3): 213-223.
- [18] PATIL S, DEALLY A, GLEESON B, MÜLLER-BUNZ H, PARADISI F, TACKE M. Novel benzyl-substituted N-heterocyclic carbene-silver acetate complexes: synthesis, cytotoxicity and antibacterial studies[J]. *Metallomics*, 2011, 3(1): 74-88.
- [19] O'BEIRNE C, PIATEK ME, FOSSEN J, MÜLLER-BUNZ H, ANDES DR, KAVANAGH K, PATIL SA, BAUMANN M, TACKE M. Continuous flow synthesis and antimicrobial evaluation of NHC* silver carboxylate derivatives of SBC3 *in vitro* and *in vivo*[J]. *Metallomics*, 2021, 13(2): mfaa011.
- [20] ALMALIOTI F, MacDOUGALL J, HUGHES S, HASSON MM, JENKINS RL, WARD BD, TIZZARD GJ, COLES SJ, WILLIAMS DW, BAMFORD S, FALLIS IA, DERVISI A. Convenient syntheses of cyanuric chloride-derived NHC ligands, their Ag(I) and Au(I) complexes and antimicrobial activity[J]. *Dalton Transactions*, 2013, 42(34): 12370-12380.
- [21] SÁNCHEZ A, CARRASCO CJ, MONTILLA F, ÁLVAREZ E, GALINDO A, PÉREZ-ARANDA M, PAJUELO E, ALCUDIA A. Antimicrobial properties of amino-acid-derived N-heterocyclic carbene silver complexes[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(4): 748.
- [22] LIAO XW, YANG F, LI HY, SO PK, YAO ZP, XIA W, SUN HZ. Targeting the thioredoxin reductase-thioredoxin system from *Staphylococcus aureus* by silver ions[J]. *Inorganic Chemistry*, 2017, 56(24): 14823-14830.
- [23] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, COLLET JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(7): 385-396.
- [24] LU J, HOLMGREN A. The thioredoxin antioxidant system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75-87.
- [25] OUYANG YF, TANG XW, ZHAO Y, ZUO X, REN XY, WANG J, ZOU LL, LU J. Disruption of bacterial thiol-dependent redox homeostasis by magnolol and honokiol as an antibacterial strategy[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(6): 1180.
- [26] LU J, VLAMIS-GARDIKAS A, KANDASAMY K, ZHAO R, GUSTAFSSON TN, ENGSTRAND L, HOFFNER S, ENGMAN L, HOLMGREN A. Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione[J]. *FASEB Journal*, 2013, 27(4): 1394-1403.
- [27] HARBUT MB, VILCHÈZE C, LUO XZ, HENSLER ME, GUO H, YANG BY, CHATTERJEE AK, NIZET V, JACOBS WR Jr, SCHULTZ PG, WANG F. Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(14): 4453-4458.
- [28] RAFAIRO E, BARR SG, HARRISON JJ, RACZ WJ. Effects of N-acetylcysteine and dithiothreitol on glutathione and protein thiol replenishment during acetaminophen-induced toxicity in isolated mouse hepatocytes[J]. *Toxicology*, 1994, 93(2/3): 209-224.
- [29] ABELLO PA, FIDLER SA, BUCHMAN TG. Thiol reducing agents modulate induced apoptosis in porcine endothelial cells[J]. *Shock*, 1994, 2(2): 79-83.
- [30] DESHPANDE VS, KEHRER JP. Oxidative stress-driven mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis in FL5.12 cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 214(3): 230-236.
- [31] SEOK SH, BAEK MW, LEE HY, KIM DJ, NA YR, NOH KJ, PARK SH, LEE HK, LEE BH, RYU DY, PARK JH. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line[J]. *Toxicology in Vitro*, 2007, 21(5): 870-877.
- [32] PIATEK M, O'BEIRNE C, BEATO Z, TACKE M, KAVANAGH K. Exposure of *Candida parapsilosis* to the silver (I) compound SBC3 induces alterations in the proteome and reduced virulence[J]. *Metallomics*, 2022, 14(8): mfaa046.
- [33] GARRISON JC, YOUNGS WJ. Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure, and application[J]. *Chemical Reviews*, 2005, 105(11): 3978-4008.
- [34] MELAIYE A, SUN ZH, HINDI K, MILSTED A, ELY D,

- RENEKER DH, TESSIER CA, YOUNGS WJ. Silver (I)-imidazole cyclophane gem-diol complexes encapsulated by electrospun tectophilic nanofibers: formation of nanosilver particles and antimicrobial activity[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(7): 2285-2291.
- [35] ESAREV IV, KARGE B, ZENG HX, LIPPMANN P, JONES PG, SCHREY H, BRÖNSTRUP M, OTT I. Silver organometallics that are highly potent thioredoxin and glutathione reductase inhibitors: exploring the correlations of solution chemistry with the strong antibacterial effects[J]. ACS Infectious Diseases, 2024, 10(5): 1753-1766.
- [36] BÜSSING R, KARGE B, LIPPMANN P, JONES PG, BRÖNSTRUP M, OTT I. Gold (I) and gold (III) N-heterocyclic carbene complexes as antibacterial agents and inhibitors of bacterial thioredoxin reductase[J]. ChemMedChem, 2021, 16(22): 3402-3409.
- [37] ZOU LL, WANG J, GAO Y, REN XY, ROTTENBERG ME, LU J, HOLMGREN A. Synergistic antibacterial activity of silver with antibiotics correlating with the upregulation of the ROS production[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 11131.
- [38] DONG CJ, CHEN W, ZOU LL, LIU BB, DENG KH, GUO DR, WANG P, CHEN H, WANG H, WANG J. The assessment on synergistic activity of ebselen and silver ion against *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 963901.
- [39] WANG P, WANG J, XIE ZL, ZHOU JX, LU QQ, ZHAO Y, DONG CJ, ZOU LL. Depletion of multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* BC1 by ebselen and silver ion[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(22): 13139-13150.
- [40] DONG CJ, WANG J, CHEN H, WANG P, ZHOU JX, ZHAO Y, ZOU LL. Synergistic therapeutic efficacy of ebselen and silver ions against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-induced urinary tract infections[J]. Metallomics, 2020, 12(6): 860-867.
- [41] CHAKRABORTY S, SAGARIKA P, RAI S, SAHI C, MUKHERJEE S. Tyrosine-templated dual-component silver nanomaterials exhibit photoluminescence and versatile antimicrobial properties through ROS generation[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(31): 36938-36947.
- [42] CARVALHO ML, PINTO AP, RANIERO LJ, COSTA MS. Biofilm formation by *Candida albicans* is inhibited by photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), using chlorin E6: increase in both ROS production and membrane permeability[J]. Lasers in Medical Science, 2018, 33(3): 647-653.
- [43] SONG D, KIM B, KIM M, LEE JK, CHOI J, LEE H, SHIN S, SHIN D, NAM HY, LEE Y, LEE S, KIM Y, SEO J. Impact of conjugation of the reactive oxygen species (ROS) -generating catalytic moiety with membrane-active antimicrobial peptoids: promoting multitarget mechanism and enhancing selectivity[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 67(17): 15148-15167.
- [44] ZOU LL, LU J, WANG J, REN XY, ZHANG LL, GAO Y, ROTTENBERG ME, HOLMGREN A. Synergistic antibacterial effect of silver and ebselen against multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections[J]. EMBO Molecular Medicine, 2017, 9(8): 1165-1178.
- [45] CHEN H, LU QQ, AN HY, LI JT, SHEN SC, ZHENG X, CHEN W, WANG L, LI JH, DU YQ, WANG YQ, LIU XW, BAUMANN M, TACKER M, ZOU LL, WANG J. The synergistic activity of SBC3 in combination with ebselen against *Escherichia coli* infection[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1080281.