

## • 论著 •

## 吡法齐明抗耐药结核分枝杆菌作用机制的初步研究

张叶 李媛媛 徐建 陈曦 王彬 付雷 陆宇

**【摘要】 目的** 通过测定结核分枝杆菌活性氧含量及过氧化氢酶活性,初步探讨吡法齐明抗耐药结核分枝杆菌的作用机制。**方法** 以 1、2、4、8 倍于最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的氯法齐明和吡法齐明处理 H37Rv 标准株 24 h,应用荧光探针 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)活性氧检测试剂盒测定不同浓度的氯法齐明和吡法齐明处理前后结核分枝杆菌菌体内的活性氧含量水平变化。以过氧化氢酶活性检测试剂盒测定 5 株对氯法齐明和吡法齐明均耐药、3 株对氯法齐明耐药但对吡法齐明敏感、1 株对氯法齐明和吡法齐明均敏感(编号 13385)的结核分枝杆菌及 H37Rv 标准株的过氧化氢酶活性,比较氯法齐明和吡法齐明耐药菌株与敏感菌株的过氧化氢酶活性的差异。采用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计学分析,并对吡法齐明药物处理浓度与所测得的荧光强度值进行 Spearman 相关性分析和线性回归分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。**结果** 活性氧含量水平测定结果显示,结核分枝杆菌在经不同浓度氯法齐明和吡法齐明处理 24 h 后,各浓度药物处理样本的荧光强度值均值排序分别为 1 MIC(6668.5) > 8 MIC(2751.5) > 2 MIC(2572.0) > 4 MIC(2015.0), 8 MIC(2637.5) > 4 MIC(2297.0) > 2 MIC(2085.5) > 1 MIC(1896.0),菌体内积累的活性氧含量均高于无药物刺激的阴性对照样品(H37Rv 标准株+DCFH-DA, 878.5)至少 2 倍;且在各浓度吡法齐明处理的菌株中,菌株测定的荧光强度值与药物浓度间呈现明显的正相关(Spearman 相关性分析,  $r = 0.976$ ,  $P < 0.001$ ),经线性回归方程检验结果显示回归模型有统计学意义( $F = 92.576$ ,  $P = 0.011$ )。菌株过氧化氢酶活性测定结果显示,氯法齐明耐药菌株的过氧化氢酶平均活性( $0.87 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ )是其敏感菌株( $0.48 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ )的近 2 倍;而吡法齐明耐药菌株的过氧化氢酶活性均值( $0.88 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ )略高于其敏感菌株( $0.71 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ),但与氯法齐明耐药菌株均值相近。**结论** 氯法齐明和吡法齐明作用于结核分枝杆菌后均会引起菌体内活性氧含量的积累,两药可能有着相似的作用机制;过氧化氢酶活性增高可能与结核分枝杆菌对氯法齐明和吡法齐明耐药有关。

**【关键词】** 分枝杆菌, 结核; 抗药性; 药理作用分子作用机制; 药物评价, 临床前; 氯法齐明; 吡法齐明

**Preliminary study on the action mechanism of TBI-166 against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*** ZHANG Ye, LI Yuan-yuan, XU Jian, CHEN Xi, WANG Bin, FU Lei, LU Yu. Department of Pharmacology, Beijing Key Laboratory of Drug Resistance Tuberculosis Research, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China  
Corresponding author: LU Yu, Email: luyu4876@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of TBI-166 against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) by determining the reactive oxygen content and catalase activity of MTB. **Methods** H37Rv standard strains were treated with clofazimine (CFZ) or TBI-166 at 1, 2, 4, 8 times the minimal inhibitory concentration (MIC) for 24 hours. The levels of reactive oxygen species (ROS) in bacteria were determined with fluorescent probe 2',7'-dichloro fluorescent yellow diacetate ROS detection kit, and the changes of ROS levels in bacteria were compared before and after the medication of CFZ or TBI-166 with different concentrations. The catalase activities of 5 strains resistant to both CFZ and TBI-166, 3 strains resistant to CFZ but sensitive to TBI-166, 1 strain (13385) sensitive to both CFZ and TBI-166, and H37Rv standard strain were determined by the catalase activity detection kit. The difference in catalase activity between drug-resistant strains and sensitive strains to both CFZ and TBI-166 was compared. SPSS 19.0 software was used for statistical analysis. Spearman correlation analysis and linear



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.11.004

基金项目:国家自然科学基金(81973367)

作者单位:101149 首都医科大学附属北京胸科医院 耐药结核病研究北京市重点实验室 北京市结核病胸部肿瘤研究所药物研究室

通信作者:陆宇, Email: luyu4876@hotmail.com

regression analysis were performed upon the concentrations of TBI-166 and the fluorescence values. The significance level was 0.05. **Results** The ROS results showed that after 24 h of treatments with different concentrations CFZ and TBI-166, the rank order of the fluorescence value of samples were 1 MIC (6668.5) > 8 MIC (2751.5) > 2 MIC (2572.0) > 4 MIC (2015.0), and 8 MIC (2637.5) > 4 MIC (2297.0) > 2 MIC (2085.5) > 1 MIC (1896.0), respectively. The amount of ROS accumulated in the bacteria was at least 2 times higher than that in the negative control samples without drug (H37Rv standard strain+DCFH-DA, 878.5). Moreover, in the strains treated with different concentrations of TBI-166, the fluorescence values were positively correlated with the drug concentration (Spearman correlation analysis,  $r = 0.976$ ,  $P < 0.001$ ). The regression equation test results showed that the regression model was significant ( $F = 92.576$ ,  $P = 0.011$ ). The catalase activity results showed that the average catalase activity of the CFZ-resistant strains ( $0.87 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ) was nearly twice that of the CFZ-sensitive strains ( $0.48 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ). The average catalase activity of the TBI-166-resistant strains ( $0.88 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ) was slightly higher than that of the TBI-166-sensitive strains ( $0.71 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ), and was similar to that of CFZ-resistant strains.

**Conclusion** Both CFZ and TBI-166 can induce the accumulation of intracellular ROS in MTB, and the two drugs may have similar mechanisms of action. Increased catalase activity may be associated with the drug resistance to CFZ and TBI-166 in MTB.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance; Molecular mechanisms of pharmacological action; Drug evaluation, preclinical; Clofazimine; TBI-166

亚胺吩噻类药物具有很强的体内外抗结核和抗炎活性作用,以及抑制耐药菌株的较强作用<sup>[1]</sup>。该类药物中氯法齐明的抗 MTB 活性已得到证实,并被世界卫生组织推荐为耐多药结核病的二线核心治疗药物<sup>[2]</sup>,故其结构改造物不断地被合成和筛选<sup>[3-4]</sup>,其中吡法齐明因活性更强、不良反应更弱而成为我国首个拥有自主知识产权的疗效明确且安全性更高的抗 MTB 新药<sup>[3, 5]</sup>。目前,吡法齐明已进入 I 期临床研究,但尚未见该药作用机制的研究报道,对其机制的探讨均基于对氯法齐明的研究,其中细胞内的氧化还原循环是氯法齐明介导的较公认的抗结核作用机制,该理论源于首先合成氯法齐明的 Barry 等<sup>[6]</sup>的研究,其认为氯法齐明可能是通过在细胞内发生的氧化还原反应生成大量具有抗菌活性的活性氧而起作用。本研究通过测定氯法齐明和吡法齐明刺激前后菌体内活性氧水平和不同氯法齐明和吡法齐明耐药表型的 MTB 过氧化氢酶活性,初步探讨其作用机制及过氧化氢酶活性与 MTB 氯法齐明和吡法齐明耐药表型间的关系。

## 材料和方法

### 一、研究材料

1. 菌株:以 1、2、4、8 倍于最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的氯法齐明和吡法齐明处理 H37Rv 标准株(ATCC 27294,对氯法齐明和吡法齐明均敏感)24 h,应用荧光探针 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)活性氧检测试剂盒测定药物处理后 MTB 菌体内的活性氧含量水平,比较不同浓度的氯法齐明和吡法齐明作用前后菌体内活性氧水平变化。以过氧化氢酶活性检测试剂盒

测定 5 株对氯法齐明和吡法齐明均耐药、3 株对氯法齐明耐药但对吡法齐明敏感、1 株对氯法齐明和吡法齐明均敏感(编号 13385)的 MTB 临床分离株及 H37Rv 标准株的过氧化氢酶活性,比较氯法齐明和吡法齐明耐药菌株与敏感菌株的过氧化氢酶活性的差异。所有菌株均来源于本研究室保存的 300 株耐多药菌株,并经 MIC 筛选后获得。表型药物敏感性试验通过微孔培养显色法(microplate alamar blue assay, MABA)进行测定。

2. 仪器与试剂:Tecan Infinite 200 多功能酶标仪, Nuaire701 二氧化碳恒温培养箱, Thermo Scientific Micro 21R 高速冷冻离心机等。吡法齐明对照品(由中国医学科学院药物研究所提供,批号 HC III-13701-1),氯法齐明对照品(上海瀚香生物科技有限公司,批号 20150888), 7H9 液体培养基干粉(美国 BD 公司,批号 4099145), Middlebrook OADC 增菌液(美国 BD 公司,批号 6237601), 吐温 80(北京索莱宝科技有限公司,批号 301C052), 丙三醇(国药集团化学试剂有限公司,批号 20180223), 二甲基亚砜(美国 VWR 公司,批号 67-68-5)。活性氧检测试剂盒和过氧化氢酶活性检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。

### 二、MTB 菌体内活性氧含量测定

本研究中使用 DCFH-DA 试剂盒进行 MTB 菌体内活性氧检测。具体步骤如下:

1. 菌液及药物的配制和探针的稀释:将培养至对数生长期的 H37Rv 标准株菌液混匀,以 7H9 培养基将菌液稀释为  $1 \times 10^7$  菌落形成单位(CFU)/ml 后,将菌液分装于 12 个 1.5 ml 的离心管中,每管 1.0 ml。以二甲基亚砜配制氯法齐明和吡法齐明储

备液,浓度均为 2.4 mg/ml(初始浓度)。以 7H9 培养基将氯法齐明储备液稀释为 0.24 mg/ml (1 MIC)、0.48 mg/ml (2 MIC)、0.96 mg/ml (4 MIC)、1.92 mg/ml (8 MIC);将吡法齐明储备液稀释为 0.06 mg/ml (1 MIC)、0.12 mg/ml (2 MIC)、0.24 mg/ml (4 MIC)、0.48 mg/ml (8 MIC);将 10 mol/L 的荧光探针 DCFH-DA 稀释 1000 倍,使其终浓度为 10  $\mu$ mol/L。

2. 药物处理:将试剂盒提供的 1  $\mu$ l (1 个单位)和 5  $\mu$ l 的活性氧阳性对照试剂(分别为 1U-Rosup 和 5U-Rosup),以及稀释好的各浓度氯法齐明和吡法齐明溶液各 1  $\mu$ l 分别加入至其中 10 个离心管中,作为菌体细胞阳性刺激管;剩余 2 管作为阴性对照。混匀后将离心管放入含 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h。

3. 加载探针:将孵育好的各样品以 8000  $\times$  g 离心 10 min,弃上清,各管分别加入 1 ml 浓度为 10  $\mu$ mol/L 的荧光探针 DCFH-DA,混匀,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 20 min,使探针和菌体细胞充分接触。再以 7H9 培养基洗涤菌体细胞 3 次,以充分去除未进入菌体细胞内的 DCFH-DA。

4. 活性氧的测定:分别吸取 10 管菌体细胞阳性刺激管中菌液各 200  $\mu$ l 至 96 孔板中,每管加入 2 个微孔;再分别吸取 2 管阴性对照管菌液、7H9 培养基、H37Rv 标准株菌液和试剂盒提供的 Rosup 活性氧阳性对照试剂各 200  $\mu$ l 至 96 孔板中,每管加入 2 个微孔。使用多功能酶标仪实时检测不同条件刺激后的菌体细胞荧光强度值,设定激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm。本研究以试剂盒提供的阳性对照试剂 Rosup、1U-Rosup、5U-Rosup 处理的菌体细胞的荧光强度值作为阳性对照参数,以测定可能影响结果的荧光强度值作为阴性对照参数,包括 7H9 培养基、H37Rv 标准株、H37Rv 标准株 + DCFH-DA(无药物刺激)。

### 三、MTB 胞内过氧化氢酶活性测定

本研究是利用过氧化氢酶能够分解过氧化氢的反应,以及反应溶液在 240 nm 下呈现特征性吸收峰,即吸光度值随着反应时间的延长而降低的特性,来测定过氧化氢溶液吸光度值的变化情况以计算过氧化氢酶的活性(CAT)。以 H37Rv 标准株和两药敏感菌株的过氧化氢酶的活性值作为对照,测定两药耐药菌株的过氧化氢酶活性,以比较耐药株与敏感株的过氧化氢酶活性是否存在差别。

1. MTB 粗酶液提取:在适量培养至对数期的

MTB[包括 H37Rv 标准株、13385 菌株,以及 8 株对氯法齐明和(或)吡法齐明耐药菌株]菌液(约  $5 \times 10^6$  个)中加入 1 ml 试剂盒提供的过氧化氢酶提取液,使得细菌数量( $10^4$  个):提取液体积(ml)为 500:1。超声波(功率 200 W)破碎细菌或细胞 3 min,间隔 10 s,重复 30 次。超声破碎后离心,取上清置于冰上待测。

2. 测定样品吸光度值:取过氧化氢酶活性检测试剂盒中 1 ml 检测工作液(含过氧化氢)于 1 ml 石英比色皿中,再加入 35  $\mu$ l 上一步粗提取样本,混匀 5 s;室温下立即测定 240 nm 下的初始吸光度值 A1 和 1 min 后的吸光度值 A2,计算  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。将每 1 万个细菌在反应体系中每分钟催化 1 nmol 过氧化氢降解定义为 1 个酶活力单位,根据  $\Delta A$  计算过氧化氢酶活性(U/ $10^4$  cell),吸光度值越低过氧化氢酶活性越高。根据试剂盒提供的公式, CAT 活性(U/ $10^4$  cell) =  $[\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.356 \times \Delta A$ 。其中 CAT 活性:过氧化氢酶活性;  $V_{\text{反应}}$ :反应体系总体积,  $1.035 \times 10^{-3}$  L;  $\epsilon$ :过氧化氢摩尔吸光系数,  $4.36 \times 10^4$  L  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>  $\cdot$  cm<sup>-1</sup>;  $d$ :比色皿光径, 1 cm;  $V_{\text{样}}$ :加入样本体积, 0.035 ml;  $V_{\text{样总}}$ :加入提取液体积, 1 ml;  $T$ :反应时间, 1 min; 500:细菌总数, 500 万。

### 四、统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计学分析,对吡法齐明药物处理浓度与所测得的荧光强度值进行 Spearman 相关性分析和线性回归分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、阴阳性对照试剂活性氧的荧光强度值测定结果

本研究以试剂盒提供的阳性对照试剂 Rosup、1 U-Rosup 和 5 U-Rosup 处理的菌体细胞的荧光强度值作为阳性对照参数,以测定的可能影响结果的各个组分的荧光强度值作为阴性对照参数,包括 7H9 培养基、H37Rv 标准株、H37Rv 标准株 + DCFH-DA(无药物刺激)的阴性对照样品,其中 7H9 培养基、H37Rv 标准株的荧光强度值最低,均  $< 500$ ;而 H37Rv 标准株 + DCFH 的荧光强度值较高,在 800 ~ 1000 之间。而阳性对照样品中, Rosup 荧光强度值过高,不能检测;1 U-Rosup 和 5 U-Rosup 处理的菌体细胞的荧光强度值明显较阴性对照增高,但两者数值差别不明显。各对照孔测

得的具体荧光强度值见表 1。

## 二、不同浓度氯法齐明和吡法齐明刺激 H37Rv 标准株后的菌体细胞活性氧含量测定

不同浓度氯法齐明和吡法齐明刺激 H37Rv 标准株后的菌体细胞荧光强度值随着时间延长而不断增高,20 min 左右趋于稳定,记录试验数据。结果显示,经不同浓度氯法齐明和吡法齐明刺激后,菌体细胞内积累的活性氧含量(即荧光强度值水平)均明显增加,至少是无药物刺激的阴性对照菌株(H37Rv 标准株+DCFH-DA)的 2 倍。各微孔测得的具体荧光强度值见表 2。

在不同浓度氯法齐明处理的菌株中,1 倍 MIC 的氯法齐明处理的菌体细胞荧光强度值最高,2 个微孔不同药物浓度处理样本测定的平均荧光强度值排序为 1 MIC>8 MIC>2 MIC>4 MIC,各样本药物处理浓度和荧光强度值均值间无统一的变化趋势,未进行相关和回归分析。而在各浓度吡法齐明处理的菌株中,菌株测定的荧光强度值与药物浓度之间存在明显的剂量依赖性,2 个微孔不同药物浓度处理样本的荧光强度值均值排序为 8 MIC>4 MIC>2 MIC>1 MIC,浓度随荧光强度值的增高而增高,呈现明显的正相关(Spearman 相关性分析, $r=0.976$ , $P<0.001$ )。

进一步研究发现,不同浓度吡法齐明处理的菌株测得的荧光强度值随着浓度的加倍,荧光强度值增高的数值基本一致,故对吡法齐明浓度和荧光强

度值做线性回归分析。首先以处理用吡法齐明的浓度为  $X$ ,测得的荧光强度值为  $Y$  做散点图,并作线性拟合趋势线,如图 1 可见各点基本在一条直线上,统计分析求得线性趋势拟合方程为  $Y=2539.130X+1848.130$ ,判定系数  $R^2=0.979$ 。回归方程检验结果显示  $F=92.576$ , $P=0.011$ ,回归模型有统计学意义。

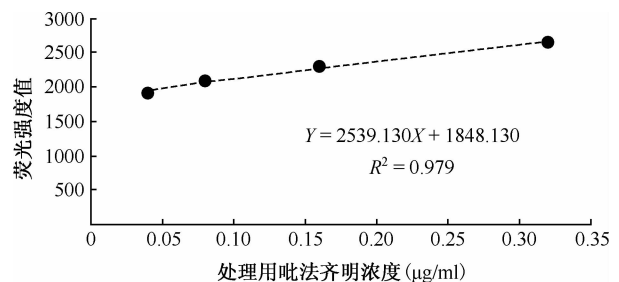


图 1 吡法齐明处理浓度与荧光强度值的线性回归拟合曲线

## 三、MTB 的过氧化氢酶活性测定

以 H37Rv 标准株和 13385 临床分离株作为敏感对照,对 8 株氯法齐明耐药菌株的过氧化氢酶活性进行测定。结果显示,H37Rv 标准株与 13385 临床分离株的过氧化氢酶活性分别为  $0.54 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$  和  $0.41 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ,均值为  $0.48 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ;而 8 株氯法齐明耐药菌株的过氧化氢酶活性范围在  $0.68 \sim 1.08 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ ,均值为  $0.87 \text{ U}/10^4 \text{ cell}$ (表 3),明显高于 13385 菌株和 H37Rv 标准株将近 2 倍。

表 1 阴阳性对照试剂测定的活性氧荧光强度值

| 编号 | 阴性对照  |       |               | 阳性对照     |          |          |
|----|-------|-------|---------------|----------|----------|----------|
|    | 7H9   | H37Rv | H37Rv+DCFH-DA | 1U-Rosup | 5U-Rosup | Rosup    |
| 1  | 354   | 459   | 925           | 3571     | 3479     | Overflow |
| 2  | 365   | 448   | 832           | 3677     | 3433     | Overflow |
| 均值 | 359.5 | 453.5 | 878.5         | 3624.0   | 3456.0   |          |

注 编号 1、2 为测定的 2 个平行孔;1 U-Rosup 为菌体经 1 个单位 Rosup 处理,5 U-Rosup 为菌体经 5 个单位 Rosup 处理;Overflow 为测定值过高

表 2 不同浓度氯法齐明和吡法齐明刺激菌体细胞后的活性氧含量测定结果

| 药物浓度  | 氯法齐明刺激荧光强度值 |      |        | 吡法齐明刺激荧光强度值 |      |        |
|-------|-------------|------|--------|-------------|------|--------|
|       | 编号 1        | 编号 2 | 均值     | 编号 1        | 编号 2 | 均值     |
| 1 MIC | 6660        | 6677 | 6668.5 | 1972        | 1820 | 1896.0 |
| 2 MIC | 2444        | 2700 | 2572.0 | 2090        | 2081 | 2085.5 |
| 4 MIC | 1666        | 2364 | 2015.0 | 2256        | 2338 | 2297.0 |
| 8 MIC | 2908        | 2595 | 2751.5 | 2440        | 2835 | 2637.5 |

表 3 各菌株过氧化氢酶活性测定结果

| 菌株编号 | 菌株    | A1   | A2   | $\Delta A$ | CAT 活性(U/10 <sup>4</sup> cell) | 氯法齐明耐药 | 吡法齐明耐药 |
|------|-------|------|------|------------|--------------------------------|--------|--------|
| 1    | H37Rv | 2.51 | 2.11 | 0.40       | 0.54                           | 否      | 否      |
| 2    | 13385 | 2.45 | 2.15 | 0.30       | 0.41                           | 否      | 否      |
| 3    | 11492 | 2.98 | 2.34 | 0.64       | 0.87                           | 是      | 是      |
| 4    | 12657 | 2.67 | 2.07 | 0.60       | 0.81                           | 是      | 是      |
| 5    | 13480 | 2.71 | 2.21 | 0.50       | 0.68                           | 是      | 否      |
| 6    | 13908 | 2.90 | 2.20 | 0.70       | 0.95                           | 是      | 否      |
| 7    | 14470 | 2.88 | 2.25 | 0.63       | 0.85                           | 是      | 是      |
| 8    | 14907 | 2.95 | 2.15 | 0.80       | 1.08                           | 是      | 是      |
| 9    | 15171 | 2.71 | 2.01 | 0.70       | 0.95                           | 是      | 否      |
| 10   | 17851 | 2.71 | 2.12 | 0.59       | 0.80                           | 是      | 是      |

注 A1:初始吸光度值;A2:药物作用 1 min 后的吸光度值; $\Delta A=A1-A2$ ;CAT:过氧化氢酶

对 5 株吡法齐明敏感菌株(H37Rv 标准株、13385 临床分离株、8 株氯法齐明耐药菌株中 3 株对吡法齐明敏感)与 5 株耐药菌株的测定结果显示,吡法齐明敏感菌株的过氧化氢酶活性范围在 0.41~0.95 U/10<sup>4</sup> cell,均值为 0.71 U/10<sup>4</sup> cell,且过氧化氢酶活性高低不等、范围较广;而吡法齐明耐药菌株的过氧化氢酶活性范围在 0.80~1.08 U/10<sup>4</sup> cell,均值为 0.88 U/10<sup>4</sup> cell(表 3),均高于吡法齐明敏感菌株,但与氯法齐明耐药菌株均值相近。

## 讨 论

氯法齐明合成已超过 60 年时间,在其合成伊始,就因其良好的体外抗结核活性引起了临床的广泛重视,但对其作用机制的研究仅局限于数种假说<sup>[7-10]</sup>,其中对“氯法齐明通过在菌体内发生氧化还原反应并不断累积活性氧(主要为过氧化氢和过氧化物)而发挥抗菌活性”的假说认可度最高。现有研究认为,氯法齐明主要作用在细菌呼吸链和离子转运蛋白上,如 Barry 等<sup>[6]</sup>提出了氯法齐明可能通过活性氧起作用,而 Yano 等<sup>[7]</sup>做了进一步阐述,认为氯法齐明是一种前体药物,可以在 II 型 NADH 醌氧化还原酶(NADH-quinone oxidoreductase type 2, NDH-2)的作用下被 NADH 还原为活性形式,再和 O<sub>2</sub> 自发氧化反应并释放活性氧,当胞内的活性氧浓度积累至 1.0 mmol/L 左右后即开始发挥杀菌作用。进一步的研究还发现,缺氧环境中培养的细菌更容易产生氯法齐明耐药性,提示氯法齐明抗结核作用的发挥离不开一系列的氧化还原反应<sup>[8]</sup>。也有研究认为,K<sup>+</sup>转运体是氯法齐明的主要作用靶

点,磷脂酶 A2 是 K<sup>+</sup>转运体抑制剂,氯法齐明可以通过增加磷脂酶 A2 的活性和减少 K<sup>+</sup>的吸收来抑制细菌 K<sup>+</sup>转运体和细菌腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的产生而发挥抗菌作用<sup>[9]</sup>。另外,也有研究发现氯法齐明可以增加巨噬细胞和单核巨噬细胞胞内半胱天冬酶-3 的表达,进一步诱导巨噬细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

本研究通过测定氯法齐明和吡法齐明作用 MTB 前后菌体细胞内活性氧含量水平,以及对氯法齐明和吡法齐明敏感或耐药的菌株中过氧化氢酶的活性水平,对吡法齐明的作用机制进行初步研究,分析吡法齐明是否具有与氯法齐明相类似的作用机制,即是否通过在 MTB 胞内积累活性氧来发挥杀菌作用。本研究使用的活性氧检测试剂盒是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。该试剂盒的应用基于以下原理:DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,在其进入细胞后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 而生成有荧光的 DCF。因此检测 DCF 的荧光强度值就可以知道细胞内活性氧的水平。

在 MTB 活性氧测定中,本研究发现 MTB 在经氯法齐明和吡法齐明处理 24 h 后菌体内均积累了至少 2 倍原有活性氧含量的水平,提示活性氧在氯法齐明和吡法齐明抑制 MTB 的过程中起到了重要作用,两药可能有着相似的作用机制;但有研究表明,相对于氯法齐明,吡法齐明对 MTB 临床敏感株和耐药株的体外实验均表现出更强的抑制作用<sup>[3]</sup>,在动物模型中也表现出更强的疗效<sup>[3, 11]</sup>,即服用吡

法齐明的小鼠肺组织中的检测菌量仅为服用同样剂量氯法齐明小鼠的 1% 左右<sup>[3]</sup>,说明吡法齐明的治疗效果高于氯法齐明;而且,药代动力学研究也进一步表明,当动物体内吡法齐明的血药浓度在 3~30 mg/kg 范围时,其血药浓度与生物利用度呈线性动力学过程,且动物性别可明显影响血药浓度达峰时间和峰浓度以及生物利用度<sup>[12]</sup>。同时,也观察到几个值得注意的现象:一是在各浓度氯法齐明处理的 MTB 菌株中,经 1 倍 MIC 浓度氯法齐明处理的菌体细胞活性氧含量水平最高,而经 2 倍、4 倍和 8 倍 MIC 浓度氯法齐明处理各组菌株的活性氧水平相差不大,且均明显低于 1 倍 MIC 浓度氯法齐明处理的活性氧含量水平,可能与 1 倍 MIC 浓度的氯法齐明对 MTB 的抑制效果低于其他处理浓度,保留了较高比例菌体细胞的活性,使 24 h 的孵育过程中有更多的 MTB 生长复制并加载了探针,导致 1 倍 MIC 浓度氯法齐明处理的菌体细胞活性氧水平明显高于其他处理浓度。而在吡法齐明处理的各菌株中,可能由于实验中以相对较高的浓度(0.04  $\mu\text{g/ml}$ )作为吡法齐明的 1 倍 MIC,导致其药物活性较氯法齐明更强,表现为菌株测定的荧光强度值与药物浓度之间存在明显的剂量依赖性,Spearman 相关性分析呈正相关,即各浓度药物处理样本的平均荧光强度值排序为 8 MIC>4 MIC>2 MIC>1 MIC,这一结果说明 MTB 接触的吡法齐明的浓度越高,菌体内积累的活性氧含量水平越高,提示菌体内活性氧的生成与吡法齐明的含量有直接关系,与上述文献一致。二是进一步经线性回归分析显示,吡法齐明处理菌株的荧光强度值与处理用吡法齐明的浓度间呈线性正相关,从另一角度证明了吡法齐明浓度越高荧光强度值越高,这一现象不仅支持了吡法齐明抗菌作用的发挥与菌体内积累的活性氧含量水平有关,同时也提示了菌体内吡法齐明的浓度可以随着菌体外加入的吡法齐明浓度的提高而提高,考虑可能与吡法齐明进入细胞内不会受到菌体细胞壁和细胞膜的阻碍有关,而氯法齐明的给药浓度与测定的荧光强度值并没有表现出正相关的原因很可能与氯法齐明不能完全进入菌体内有关,2 倍 MIC 浓度的氯法齐明即达到了进入菌体细胞的饱和浓度,因而表现出 2 倍、4 倍和 8 倍氯法齐明处理后测得的荧光强度值相差不大。

过氧化氢酶广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,是最主要的过氧化氢清除酶,在活性氧清除系统中具有重要作用。有研究发现,过氧化物酶

是各种微生物细胞抵抗活性氧胁迫的最主要方式,特别是芽孢杆菌属的微生物,可以将过氧化氢和超氧阴离子转变成无毒的水<sup>[13]</sup>。早在 1957 年,Barry 等<sup>[6]</sup>就提出氯法齐明形成的活性氧中主要为超氧化物和过氧化氢,提示若菌株中过氧化氢酶活性增高,则氯法齐明合成的活性氧的量必然会受到影响。但 1992 年 Van Rensburg 等<sup>[14]</sup>通过对革兰阳性菌的研究发现,菌株是否对氯法齐明耐药与过氧化氢酶状态无关,认为氯法齐明不是通过形成过氧化氢发挥抗菌作用,这与 Barry 等<sup>[6]</sup>和 Yano 等<sup>[7]</sup>提出的假设是不一致的;但是,需要注意的是该研究仅以不包括 MTB 在内的另 3 种革兰阳性菌为研究对象,且具体数据表明这 3 种革兰阳性菌在从有氧环境换为无氧环境后,其对氯法齐明的 MIC 均有降低,这一现象应当仅能提示革兰阳性菌在无氧环境下更容易被氯法齐明抑制,而不能认为氯法齐明的耐药表型与过氧化氢酶状态无关。

在过氧化氢酶检测过程中发现,可纳入的对氯法齐明和(或)吡法齐明耐药的菌株仅 8 株,且其中有 5 株对吡法齐明耐药,提示两药的耐药率都很低,且吡法齐明的耐药率低于氯法齐明。另外,测定的 8 株氯法齐明耐药菌株的过氧化氢酶活性均较 13385 菌株及 H37Rv 标准株更高,提示氯法齐明耐药菌株对过氧化氢的分解作用更强,导致氯法齐明作用后的菌体内过氧化氢含量和活性氧总水平相对更低;同时也从代谢产物的角度上支持了氯法齐明是通过合成活性氧发挥抗菌活性作用的假说,并以临床标本的检测结果做了验证,而这一假说此前的研究仅局限于实验室模型菌株;而且,这一假说还可以用来解释前期研究中一些待讨论的现象。Ammerman 等<sup>[15]</sup>测试了多种浓度氯法齐明的体内外抗菌活性后,发现各种浓度的氯法齐明在第 1 周内均未表现出明显的抗菌活性,而在第 2 周则可以观察到氯法齐明的抗菌活性随药物浓度或剂量的增高而增强,但浓度或剂量的提高并未使氯法齐明抗菌活性的出现时间提前,呈现出活性延迟现象,推测可能原因如下:一是,氯法齐明首先需要使富含脂质的细菌细胞壁饱和后才能作用到菌体内;二是,破坏电化学  $\text{H}^+$  梯度的质子动力势,阻碍其合成 ATP 需要一定的时间;三是,在观察到抗菌活性之前需要消耗菌体内所存储的能量。如果从“氯法齐明需要通过胞内累积活性氧而起作用”这一假说来推测,这一现象可能提示提高氯法齐明的浓度或剂量仅能加快氯法齐明在组织中的累积而不能加快氯法齐明或活

性氧在 MTB 菌胞内的累积。

联合分析吡法齐明的活性氧水平和过氧化氢酶活性测定结果提示,在用吡法齐明处理菌体细胞后,菌体内活性氧水平增高,且测定值与氯法齐明处理后的活性氧水平相近,提示吡法齐明可以通过菌体内活性氧的累积发挥杀菌活性,可能有类似氯法齐明的作用机制。但是,过氧化氢酶活性测定结果显示 MTB 胞内过氧化氢酶活性与 MTB 对吡法齐明的耐药表型无关,显示过氧化氢酶活性增高的菌株不一定对吡法齐明耐药,可能提示氯法齐明耐药范围较吡法齐明更广泛,也可能提示吡法齐明的作用和耐药机制与氯法齐明类似但不完全相同;例如,吡法齐明在处理菌体后,若菌体中主要累积的活性氧为超氧化物,则菌体内过氧化氢酶活性增高不会表现为与吡法齐明耐药表型一致。

本研究首次对吡法齐明的作用机制进行了探讨,发现吡法齐明的作用机制可能与氯法齐明一致,即抗菌作用的发挥与菌体内活性氧的累积水平相关。同时,本研究也存在一些不足,一是由于氯法齐明和吡法齐明的耐药率相对较低,本研究仅应用了对氯法齐明和吡法齐明均敏感的 13385 菌株和 H37Rv 标准株,以及 8 株对氯法齐明或吡法齐明耐药的菌株对吡法齐明的抗结核作用机制进行了初步研究,对结论的支持不足,后续还需要选取更多的临床耐药菌株进行实验以进一步验证结果;二是吡法齐明通过在菌体内积累活性氧以实现抗结核作用的具体作用途径尚不清楚,仍需要进一步的研究确证。

#### 参 考 文 献

- [1] 张叶,陆宇. 亚胺吩嗪类药物抗结核作用研究进展. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42 (2): 118-121.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health Organization, 2016.
- [3] Lu Y, Zheng M, Wang B, et al. Clofazimine analogs with efficacy against experimental tuberculosis and reduced potential for accumulation. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55 (11): 5185-5193.
- [4] Zhang D, Lu Y, Liu K, et al. Identification of less lipophilic riminophenazine derivatives for the treatment of drug-resistant tuberculosis. J Med Chem, 2012, 55(19): 8409-8417.
- [5] Xu J, Wang B, Fu L, et al. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of the Riminophenazine TBI-166 against *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(5). pii: e02155-18.
- [6] Barry VC, Belton JG, Conalty ML, et al. A new series of phenazines (rimino-compounds) with high antituberculosis activity. Nature, 1957, 179 (4568): 1013-1015.
- [7] Yano T, Kassovska-Bratinova S, Teh JS, et al. Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH: quinone oxidoreductase: a pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species. J Biol Chem, 2011, 286 (12): 10276-10287.
- [8] Cholo MC, Steel HC, Fourie PB, et al. Clofazimine: current status and future prospects. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(2): 290-298.
- [9] Cholo MC, Boshoff HI, Steel HC, et al. Effects of clofazimine on potassium uptake by a Trk-deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(1): 79-84.
- [10] Fukutomi Y, Maeda Y, Makino M. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(9): 4000-4005.
- [11] Zhang Y, Zhu H, Fu L, et al. Identifying Regimens Containing TBI-166, a New Drug Candidate against *Mycobacterium tuberculosis In Vitro* and *In Vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(7): pii: e02496-18.
- [12] 李聘,盛莉,赵曼曼,等. 新型抗结核化合物 TBI-166 在比格犬体内的生物利用度. 国际药学研究杂志, 2015, 42(2): 194-198, 205.
- [13] Jackett PS, Aber VR, Lowrie DB. Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen microbiol, 1978, 104(1): 37-45.
- [14] Van Rensburg CE, Jooné GK, O'sullivan JF, et al. Antimicrobial activities of clofazimine and B669 are mediated by lysophospholipids. Antimicrob Agents Chemother, 1992, 36(12): 2729-2735.
- [15] Ammerman NC, Swanson RV, Tapley A, et al. Clofazimine has delayed antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* both *in vitro* and *in vivo*. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(2): 455-461.

(收稿日期:2019-07-31)

(本文编辑:孟莉 薛爱华)