

· 论 著 ·

14 种抗结核药物在巨噬细胞内的抗结核活性评价

陈曦 刘忠泉 王彬 朱慧 付雷 李媛媛 陆宇

【摘要】 目的 测定 14 种抗结核药物在巨噬细胞内的抗结核活性,并评价体外巨噬细胞内抗结核活性测定对新药筛选的作用。**方法** 采用结核分枝杆菌标准株 H37Rv 感染 J774.1 巨噬细胞,建立体外巨噬细胞感染模型。分别检测利福平、异烟肼、左氧氟沙星、吡嗪酰胺、贝达喹啉、氯苯吩嗪、利奈唑胺、硝基咪唑类药物 PA-824、氯苯吩嗪的衍生物 TBI-166、利奈唑胺的同类药物 OTB-658,以及苯并噻嗪类药物 PBTZ-169 和 BTZ-043、TZY-5-84、NTB-3119H 作用后的巨噬细胞中的细菌载量,评价抗结核药物的胞内活性;并采用微孔培养显色法(MABA 法)测定上述药物的体外最低抑菌浓度。从中选取利福平、异烟肼、左氧氟沙星、贝达喹啉、氯苯吩嗪、利奈唑胺、TBI-166、PBTZ-169 分别作用 J774.1 巨噬细胞 3 h,利用高效液相色谱-质谱/质谱联用技术测定细胞内药物浓度。**结果** 细胞培养基中药物浓度为 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,异烟肼、PBTZ-169、贝达喹啉、BTZ-043、NTB-3119H、TZY-5-84 和 PA-824 降低巨噬细胞内结核分枝杆菌 1.60、1.33、1.31、1.25、1.13、1.01 和 1.00 lg(CFU/ml)(CFU:菌落形成单位),胞内活性最强的是异烟肼和 PBTZ-169,其次是贝达喹啉;但吡嗪酰胺、利奈唑胺、TBI-166 和 OTB-658 仅降低巨噬细胞内结核分枝杆菌 0.65、0.55、0.33 和 0.31 lg(CFU/ml)。经体外 90%最低抑菌浓度(MIC_{90})和胞内活性比较,发现利奈唑胺和 OTB-658 虽然具有良好的体外抗菌活性(MIC_{90} 分别为 0.25 和 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$),但是二者在细胞培养基中浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时仅降低巨噬细胞内结核分枝杆菌 0.77 和 0.50 lg(CFU/ml)。在培养基中药物浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,PBTZ-169、贝达喹啉、氯苯吩嗪、利福平、TBI-166、异烟肼、左氧氟沙星和利奈唑胺在巨噬细胞内的浓度为 1.42、2.11、4.93、1.65、0.50、0.27、1.13 和 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$,胞内药物浓度是其 MIC_{90} (分别为 0.0005、0.03、0.12、0.05、0.04、0.05、0.25、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 2840.00、70.33、41.08、33.00、12.50、5.40、4.52 和 1.28 倍。**结论** 各药物进入巨噬细胞的能力并不相同,巨噬细胞内抗菌活性的差异提示细胞内药物浓度及与 MIC_{90} 的关系是细胞内活性的决定因素。

【关键词】 抗结核药; 巨噬细胞; 微生物敏感性试验; 色谱法,高压液相; 串联质谱法; 评价研究

Evaluation of antituberculosis activities of 14 antituberculosis drugs in macrophage CHEN Xi, LIU Zhong-quan, WANG Bin, ZHU Hui, FU Lei, LI Yuan-yuan, LU Yu. Beijing Key Laboratory of Drug-resistant Tuberculosis Research, Department of Pharmacology, 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 determine the activities of 14 drugs against *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages, and to evaluate the effect of detection the anti-tuberculosis activity in macrophages on screening of new drugs. **Methods** J774.1 macrophages were infected with *Mycobacterium tuberculosis* standard strain H37Rv to establish an in vitro macrophage infection model. Rifampicin, isoniazid, levofloxacin, pyrazinamide, bedaquiline, clofazimine, linezolid, PA-824, TBI-166, OTB-658, PBTZ-169, BTZ-043, TZY-5-84 and NTB-3119H were detected respectively to evaluate the intracellular activity. The minimal inhibitory concentration (MIC_{90}) of the above drugs was determined by MABA method. In addition, rifampicin, isoniazid, levofloxacin, bedaquiline, clofazimine, linezolid, TBI-166 and PBTZ-169 were selected to treat on J774.1 macrophages for 3 h respectively, and the concentrations of these drugs in the macrophages were determined by high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. **Results** Isoniazid, PBTZ-169, bedaquiline, BTZ-043, NTB-3119H, TZY-5-84 and PA-824 reduced *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages by 1.60, 1.33, 1.31,



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.1000-6621.2019.09.014

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

通信作者:陆宇,Email: luyu4876@hotmail.com

注:陈曦与刘忠泉对本研究有同等贡献,为并列第一作者

1.25, 1.13, 1.01 and 1.00 lg (CFU/ml) (CFU, colony-forming unit) at a concentration of 0.50 $\mu\text{g/ml}$, isoniazid and PBTZ-169 were the most active in the cell, followed by bedaquiline. However, pyrazinamide, linezolid, TBI-166 and OTB-658 only reduced *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages by 0.65, 0.55, 0.33 and 0.31 lg (CFU/ml). Comparing the minimal inhibitory concentration (MIC_{90}) with intracellular activity, linezolid and OTB-658 had good antibacterial activity in vitro (MIC_{90} is 0.25 and 0.05 $\mu\text{g/ml}$ respectively), but at the linezolid and OTB-658 concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$, they only reduced 0.77 and 0.50 lg (CFU/ml) in macrophages. In addition, at the concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ in cell culture medium, the concentrations of PBTZ-169, bedaquiline, clofazimine, rifampicin, TBI-166, isoniazid, levofloxacin and linezolid in macrophages were 1.42, 2.11, 4.93, 1.65, 0.50, 0.27, 1.13 and 0.32 $\mu\text{g/ml}$. The intracellular drug concentrations were 2840.00, 70.33, 41.08, 33.00, 12.50, 5.40, 4.52, and 1.28 times that of its MIC_{90} (0.0005, 0.03, 0.12, 0.05, 0.04, 0.05, 0.25, 0.25 $\mu\text{g/ml}$, respectively). **Conclusion** The ability of each drug to enter macrophages is not the same. The difference of antibacterial activity in macrophages suggests that the concentration of drugs in cells and the relationship with MIC_{90} are the determining factors of intracellular activity.

【Key words】 Antitubercular agents; Macrophages; Microbial sensitivity tests; Chromatography, high pressure liquid; Tandem mass spectrometry; Evaluation studies

结核分枝杆菌是一种细胞内寄生菌,可在巨噬细胞内存活并繁殖,凭借在巨噬细胞内生长的特性逃逸机体免疫防御作用。治疗结核分枝杆菌感染的关键是选用具有良好抗菌活性并且能在巨噬细胞内达到有效抑菌浓度的药物。因此,在评估一种药物对结核分枝杆菌是否有效时,不仅要评估其细胞外抗菌活性,也要评估其细胞内抗菌活性。为提高耐药结核病治疗的有效性,围绕新的药物靶点开发新型抗结核药物已成为当务之急。体外药效学评价是抗结核新药研发的第一步,也是关键步骤;其中抗结核药物细胞内抗菌活性是进行体外药效学评价的重要指标之一。本研究针对目前开发的新型抗结核药物,以及临床上应用的抗结核药物进行了巨噬细胞内抗菌活性比较,并且对抗结核药物的胞内浓度进行了分析,评价体外巨噬细胞内抗结核活性测定对新药筛选的作用。

材料和方法

一、仪器与材料

1. 仪器:高效液相色谱-质谱工作站(UPLC-MS/MS)分析系统,由 Agilent1290 高效液相色谱仪和 Agilent6460 质谱检测器组成,安捷伦科技有限公司,美国)、Thermo Fisher 低温离心机(赛默飞世尔科技有限公司,美国)、METTLER-TOLEDO 电子分析天平(梅特勒-托利多集团公司,瑞士)、Milipore 超纯水机(默克密理博科技有限公司,美国)、二级生物安全柜(艺思高科技有限公司,新加坡)、二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技有限公司,美国)、Tecan Infinite 200 酶标仪(帝肯集团公司,瑞士)。

2. 试剂与材料:0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM 细胞培养基(Gibco 生命科技有限公司,美

国)、Middlebrook 7H9 (BD 生物科技有限公司,美国)、1×磷酸盐缓冲液(PBS)、生理盐水、0.1% SDS 裂解液、Middlebrook 7H10 (BD 生物科技有限公司,美国)、OADC 增菌液(BD 生物科技有限公司,美国)、色谱纯甲醇、色谱纯乙腈、超纯水。

3. 实验药物:利福平(RFP, Sigma, BCBP4553V)、异烟肼(INH, Sigma, MKBV9495V)、左氧氟沙星(Lfx, Sigma, BCBF7004V)、吡嗪酰胺(PZA, Sigma, 031M1778V)、贝达喹啉(TMC207, 上海瀚香生物科技有限公司, 843663-66-1)、硝基咪唑类药物 PA-824 (Sigma, 187235-37-6)、利奈唑胺(LZD, 中国医学科学院药物研究所)、氯苯吩嗪(CFZ, 上海瀚香生物科技有限公司, 2030-63-9)、苯并噻唑酮类药物 PBTZ-169 和 BTZ-043(中国医学科学院药物研究所)、利奈唑胺同类药物 OTB-658(中国医学科学院药物研究所)、氯苯吩嗪衍生物 TBI-166(中国医学科学院药物研究所)、TZY-5-84(中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所)、NTB-3119H(中国医学科学院药物研究所)。

4. 细胞与菌株:J774.1 巨噬细胞(购自北京协和细胞资源中心)、结核分枝杆菌 H37Rv 标准株(ATCC 27294, 北京市结核病胸部肿瘤研究所药物研究室冻存)。

二、实验方法

本研究于 2018 年 9 月至 2019 年 3 月测定了 14 种抗结核药物的最低抑菌浓度和巨噬细胞内抗结核活性;并测定了其中 8 种抗结核药物在巨噬细胞内的药物浓度。

(一)最低抑菌浓度测定

采用微孔培养显色法(MABA 法)测定 90%最低抑菌浓度(MIC_{90})。

(1) 结核分枝杆菌单菌落悬液制备: 结核分枝杆菌 H37Rv 接种于含 10% OADC、0.05% 吐温-80 的 7H9 液体培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养 2~3 周至对数生长期, 8 μm 滤膜过滤细菌悬液, 获得单菌悬液, 菌液经 10 倍稀释后接种于 7H10 固体培养基, 4 周后进行菌落计数, 确定单菌悬液的浓度 (CFU/ml) (CFU: 菌落形成单位)。(2) 药物的制备及菌液接种: 取无菌 96 孔培养板, 第 1 排前 6 孔加入 200 μl 7H9 培养基, 设为阴性对照孔, 后 6 孔加入 100 μl 7H9 培养基和等体积的单菌落悬液, 设为阳性对照孔; 除第 1 排外, 其余各排第 1 列分别加入含有实验药物 (RFP、INH、Lfx、PZA、TMC207、CFZ、LZD、PA-824、TBI-166、OTB-658、PBTZ-169、BTZ-043、TZY-5-84、NTB-3119H) 的 7H9 培养基 200 μl, 剩余各孔分别加入 100 μl 7H9 培养基, 从第 1 列吸取 100 μl 含药培养基加入第 2 列, 依次连续倍比稀释至最后一列。然后在除阴性对照孔之外的各孔中加入制备好的单菌落悬液 100 μl, 使每孔中最终培养容积均为 200 μl, 菌液终浓度为 4 × 10⁵ CFU/ml。(3) 孵育条件: 37 °C 培养 7 d。(4) 加入显色试剂: 在已培养 7 d 的 96 孔培养板中, 每孔加入 Alamar Blue 20 μl, 20% 吐温-80 12.5 μl, 混合均匀 (避光操作)。37 °C 继续培养 24 h。(5) 结果判读: 应用酶标仪测定吸光度值, 并计算 MIC₉₀。

(二) 巨噬细胞内抗结核药物活性测定

(1) J774.1 单核巨噬细胞的制备: 在 75 cm² 细胞培养皿中用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 待细胞生长至占培养皿面积的 80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶 2 ml 室温消化 1 min, 弃去胰酶后加入 5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 吹打贴壁巨噬细胞, 制成细胞悬液; 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞浓度至 4 × 10⁵ 个/ml, 在 24 孔细胞培养板中每孔加入 1 ml 细胞悬液, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 16 h, 贴壁细胞用于结核分枝杆菌的感染。(2) 结核分枝杆菌感染巨噬细胞: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基将结核分枝杆菌冻存菌液稀释为 2 × 10⁶ CFU/ml 的细菌悬液。向孵育贴壁巨噬细胞的 24 孔细胞培养板中加入 1 ml/孔的细菌悬液, 即感染复数为 5 : 1; 37 °C 孵育 3 h, 吸弃含菌培养基, 用无菌 1 × PBS 洗涤 2 次, 以除去胞外结核分枝杆菌。(3) 实验药物的制备及处理细胞: 精密称取 14 种抗结核药物 RFP、INH、Lfx、PZA、TMC207、CFZ、LZD、PA-824、TBI-166、OTB-658、PBTZ-169、BTZ-043、TZY-5-84、NTB-

3119H, 用二甲基亚砜 (DMSO) 或超纯水溶解并定容为 1 mg/ml。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基分别稀释待测药物, 终浓度设为 5、2 和 0.50 μg/ml。向含有已感染结核分枝杆菌的贴壁巨噬细胞的 24 孔培养板中加入新鲜配制的含有不同浓度实验药物的培养基, 2 ml/孔, 37 °C 孵育 72 h。并设不经药物处理的阴性对照孔, 所有试验孔均设复孔。(4) 巨噬细胞的裂解及细胞内结核分枝杆菌计数: 药物处理贴壁巨噬细胞 72 h 后, 吸弃含药培养基, 向 24 孔细胞培养板各孔中加入 200 μl 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 37 °C 静置 5 min 以裂解细胞, 随后各孔中加入 800 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 中和裂解, 裂解液混匀后用生理盐水进行 10 倍系列稀释。分别取 100 μl 不同浓度的稀释液接种到 7H10 固体培养板上, 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养 3~4 周, 进行菌落计数。

(三) 巨噬细胞内抗结核药物浓度测定

(1) J774.1 单核巨噬细胞的制备: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整巨噬细胞浓度至 1 × 10⁶ 个/ml, 在直径 9 cm 细胞培养皿中加入 10 ml 细胞悬液, 使细胞数量为 1 × 10⁷ 个/培养皿, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 16 h, 吸弃培养基, 贴壁细胞用于药物处理及检测实验药物的细胞内浓度。(2) 药物的制备与处理巨噬细胞: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基分别稀释待测的 8 种抗结核药物 RFP、INH、Lfx、TMC207、CFZ、LZD、TBI-166、PBTZ-169, 终浓度分别为 20、10 和 5 μg/ml。向孵育贴壁细胞的培养皿中加入 10 ml 各浓度的含药培养基, 药物处理细胞 3 h 后, 弃去含药培养基, 加入 1 × PBS 洗涤 1 次, 以去除细胞外药物。所有试验均设不经药物处理的阴性对照, 脂溶性药物 RFP、TMC207、CFZ 和抗结核新化合物 TBI-166、PBTZ-169 测定试验中设置药物处理的 0 h 对照。(3) 收集细胞及待测样品: 向药物处理后的细胞培养皿中加入 2 ml 的 0.25% 胰蛋白酶, 消化 20 s; 随后加入 3 ml 新鲜培养基中和胰酶, 吹打贴壁细胞使其悬浮, 收集细胞悬液, 4 °C 100 × g 离心 5 min, 弃去培养基, 每份细胞样品加入 1 ml 去离子水, 重悬细胞后 4 °C 放置 1 h, 经镜下观察确认细胞完全裂解。细胞裂解液 4 °C 2000 × g 离心 10 min, 留取沉淀加入 1 ml 去离子水混匀, 同时留取上清液。不经含药培养基孵育的细胞阴性对照样品收集方法同上。(4) 高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法测定药物浓度: 巨噬细胞内药物浓度测定方法见文献

[1-2]。取未经药物处理的空白细胞裂解液分别稀释实验药物标准品,分别制备标准曲线。各取上一步中收集的离心沉淀悬液和上清液样品 200 μ l 加入等体积的乙腈,充分混匀,4 $^{\circ}$ C 13 800 $\times g$ 离心 10 min,收集上清进行质谱分析。色谱条件:根据实验药物选择甲醇-甲酸铵水溶液(含 5 mmol/L 甲醇和 0.1% 甲酸;85 : 15, v/v)或乙腈-甲酸铵水溶液(含 5 mmol/L 乙腈和 0.1% 甲酸;8 : 92, v/v)为流动相,色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱[2.1 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μ m(柱子直径 2.1 mm, 长度 100 mm, 柱子中硅胶填料粒径 3.5 μ m)],流率为 0.2 ml/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:3 μ l;质谱条件:质谱采用电喷雾离子源(ESI),扫描方式为正离子模式,选择多反应离子监测(MRM)方式扫描。

三、统计学处理

CFU 计数转换为 lg(CFU/ml),应用 SPSS 23.0 软件进行区组资料的多因素方差分析,比较各药物处理组与未经药物处理组间巨噬细胞内结核分枝杆菌的 lg(CFU/ml),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、MIC₉₀测定

药物的胞外 MIC₉₀见表 1。结果显示,胞外抗结核活性最强的药物为苯并噻嗪类的 PBTZ-169 和 BTZ-043,其 MIC₉₀ 分别低至 0.0005 μ g/ml 和

0.002 μ g/ml。抗结核活性最弱的为 PZA,其 MIC₉₀ 高达 200 μ g/ml。

二、巨噬细胞内药物的抗结核活性检测

受试药物在巨噬细胞内的抗结核活性数据见表 1。RFP、INH、Lfx、TMC207、PA-824、CFZ、TBI-166、NTB-3119H、LZD、TZY-5-84、PBTZ-169 和 BTZ-043 呈明显的剂量-效应关系。细胞培养基中药物浓度为 0.50 μ g/ml 时,INH、PBTZ-169、TMC207、BTZ-043、NTB-3119H、TZY-5-84、PA-824 分别降低巨噬细胞内结核分枝杆菌 1.60、1.33、1.31、1.25、1.13、1.01 和 1.00 lg(CFU/ml);细胞培养基中药物浓度为 2 μ g/ml 时,INH、PBTZ-169、TMC207、CFZ、NTB-3119H、BTZ-043、TZY-5-84、Lfx、PA-824 分别降低巨噬细胞内结核分枝杆菌 2.18、1.91、1.65、1.55、1.47、1.44、1.29、1.24 和 1.15 lg(CFU/ml);细胞培养基中药物浓度为 5 μ g/ml 时,PBTZ-169、NTB-3119H、INH、CFZ、TMC207、PA-824、TZY-5-84、BTZ-043、RFP、Lfx 和 TBI-166 分别降低巨噬细胞内结核分枝杆菌 4.78、2.48、2.33、2.09、1.91、1.48、1.48、1.46、1.44、1.37 和 1.34 lg(CFU/ml)。胞内活性最强的为 INH、PBTZ-169 和 TMC207,其中 PBTZ-169 在 5 μ g/ml 时,显示出了完全的杀菌活性;与其他抗结核药物相比,同属一类的 LZD 和 NTB-658 的胞内抗结核活性弱,PZA 的胞内抗结核活性微弱。

表 1 细胞培养基中各种药物在不同浓度时巨噬细胞内单菌悬液的浓度和体外 MIC₉₀ 值

药物	巨噬细胞内单菌悬液的浓度[lg(CFU/ml), $\bar{x} \pm s$][相比阴性对照的 lg(CFU/ml)降低值]				MIC ₉₀ 值 (μ g/ml)
	0 μ g/ml	0.50 μ g/ml	2 μ g/ml	5 μ g/ml	
阴性对照	4.78 $\pm$ 0.13	—	—	—	
RFP	—	4.11 $\pm$ 0.10(0.67)	3.84 $\pm$ 0.09(0.94)	3.34 $\pm$ 0.09(1.44)	0.05
INH	—	3.18 $\pm$ 0.04(1.60)	2.60 $\pm$ 0.00(2.18)	2.45 $\pm$ 0.21(2.33)	0.05
Lfx	—	4.04 $\pm$ 0.06(0.74)	3.54 $\pm$ 0.34(1.24)	3.41 $\pm$ 0.13(1.37)	0.25
PZA	—	4.13 $\pm$ 0.50(0.65)	4.10 $\pm$ 0.02(0.68)	4.05 $\pm$ 0.14(0.73)	>200
CFZ	—	3.90 $\pm$ 0.08(0.88)	3.23 $\pm$ 0.16(1.55)	2.69 $\pm$ 0.55(2.09)	0.12
TBI-166	—	4.45 $\pm$ 0.07(0.33)	3.89 $\pm$ 0.16(0.89)	3.44 $\pm$ 0.21(1.34)	0.04
TMC207	—	3.47 $\pm$ 0.10(1.31)	3.13 $\pm$ 0.07(1.65)	2.87 $\pm$ 0.04(1.91)	0.03
PA-824	—	3.78 $\pm$ 0.25(1.00)	3.63 $\pm$ 0.21(1.15)	3.30 $\pm$ 0.43(1.48)	0.125
LZD	—	4.23 $\pm$ 0.12(0.55)	4.07 $\pm$ 0.16(0.71)	4.01 $\pm$ 0.15(0.77)	0.25
OTB-658	—	4.47 $\pm$ 0.12(0.31)	4.35 $\pm$ 0.07(0.43)	4.28 $\pm$ 0.14(0.50)	0.05
TZY-5-84	—	3.77 $\pm$ 0.10(1.01)	3.49 $\pm$ 0.11(1.29)	3.30 $\pm$ 0.17(1.48)	0.016
NTB-3119H	—	3.65 $\pm$ 0.16(1.13)	3.31 $\pm$ 0.15(1.47)	2.30 $\pm$ 0.00(2.48)	<0.016
PBTZ-169	—	3.45 $\pm$ 0.01(1.33)	2.87 $\pm$ 0.04(1.91)	0.00 $\pm$ 0.00(4.78)	0.0005
BTZ-043	—	3.53 $\pm$ 0.07(1.25)	3.34 $\pm$ 0.12(1.44)	3.32 $\pm$ 0.06(1.46)	0.002

注 5 μ g/ml、2 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0 μ g/ml 为培养孔内细胞培养基中的药物浓度;阴性对照为培养孔内的巨噬细胞在不含药物的同等容积细胞培养基中培养;“—”:无值。lg(CFU/ml)降低值=阴性对照单菌悬液的 lg(CFU/ml)均值(4.78)—培养基中不同药物浓度时巨噬细胞内单菌悬液的 lg(CFU/ml)均值

三、抗结核药物在巨噬细胞内浓度分析

药物在巨噬细胞内的浓度见表 2。为排除脂溶性药物 RFP、TMC207、CFZ 和抗结核新化合物 TBI-166、PBTZ-169 与细胞壁结合对巨噬细胞内药物浓度测定的影响,笔者测定了这些药物和化合物处理细胞 0 h 时细胞裂解液中的药物浓度,并以此为基线。在培养基中药物浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 时, PBTZ-169、TMC207、RFP、CFZ、TBI-166 和 Lfx 在巨噬细胞内的浓度为 0.60、0.80、0.48、0.78、0.17 和 0.37 $\mu\text{g/ml}$, 分别为其 MIC_{90} 值的 1200.00、26.67、9.60、6.50、4.25 和 1.48 倍,且随着培养基内药物浓度的升高二者比值也相应升高。虽然只在培养基含药浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 时测出 INH 的胞内浓度,但其与 MIC_{90} 的比值也高达 5.40 倍;与上述几种药物相比, LZD 的巨噬细胞内浓度与 MIC 的比值只在培养基中药物浓度提高至 20 $\mu\text{g/ml}$ 时才升

高到 1.28 倍,这些结果提示不同的抗结核药物进入巨噬细胞的能力存在较大差异,也表明其进入巨噬细胞的能力即细胞内药物浓度以及与 MIC 的关系是细胞内活性的决定因素。

讨 论

巨噬细胞对于结核分枝杆菌来说,不仅是逃逸宿主免疫效应的避风港,而且也是逃避药物杀伤的屏障。药物若要对巨噬细胞内吞噬的结核分枝杆菌发挥作用,必需经过进入巨噬细胞、溶酶体及结核分枝杆菌细胞膜的过程,因此药物进入巨噬细胞是发挥细胞内抗结核活性所必需的。此外,还与各种药物对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度相关。本研究评价不同作用靶点的 14 种抗结核药物在巨噬细胞内、外的抗结核活性,以说明巨噬细胞内抗结核活性的作用及相关性。

表 2 8 种抗结核药物在巨噬细胞内的浓度

药物	培养基中药物浓度($\mu\text{g/ml}$)	药物处理细胞 3 h 和 0 h 的胞内药物浓度($\mu\text{g/ml}$)			MIC_{90} 值($\mu\text{g/ml}$)	胞内药物浓度/ MIC_{90} 值
		3 h	0 h	3 h-0 h		
RFP	5	0.69	0.21	0.48 ^a	0.05	9.60
	10	1.46	0.41	1.05 ^a		21.00
	20	2.38	0.73	1.65 ^a		33.00
CFZ	5	1.32	0.54	0.78 ^a	0.12	6.50
	10	2.84	0.84	2.00 ^a		16.67
	20	5.88	0.95	4.93 ^a		41.08
TBI-166	5	0.46	0.29	0.17 ^a	0.04	4.25
	10	0.74	0.34	0.40 ^a		10.00
	20	1.50	1.00	0.50 ^a		12.50
PBTZ-169	5	0.60	0.00	0.60 ^a	0.0005	1200.00
	10	1.37	0.12	1.25 ^a		2500.00
	20	1.55	0.13	1.42 ^a		2840.00
TMC207	5	0.95	0.15	0.80 ^a	0.03	26.67
	10	1.81	0.29	1.52 ^a		50.67
	20	2.59	0.48	2.11 ^a		70.33
INH	5	—	—	—	0.05	—
	10	—	—	—		—
	20	0.27 ^a	—	—		5.40
LZD	5	0.03 ^a	—	—	0.25	0.12
	10	0.14 ^a	—	—		0.56
	20	0.32 ^a	—	—		1.28
Lfx	5	0.37 ^a	—	—	0.25	1.48
	10	0.60 ^a	—	—		2.40
	20	1.13 ^a	—	—		4.52

注 “—”:未测出或未检测;3 h-0 h:3 h 与 0 h 的胞内药物浓度差值;胞内药物浓度/ MIC_{90} 值:带^a角标的数值与 MIC_{90} 值的比值

本研究中 MABA 法测得的 MIC₉₀ 结果与文献报道一致^[3-4]。笔者发现 LZD 和 OTB-658 的细胞外抗菌活性(MIC₉₀)与细胞内抗菌活性并不完全一致,其 MIC₉₀ 均较低,但并未表现出良好的胞内抗菌活性。其中 LZD 已应用于临床治疗,其在临床化疗中的优势与其对细菌的灭菌活性相关。上述两种药物的体外 MIC₉₀ 结果和细胞内活性的非对应关系,提示了药物的体外 MIC₉₀ 结果的局限性,也显示细胞内活性测定的重要作用;但二者均为体外活性的评价方法,药物活性评价必须要进行感染动物实验的药效评价,以更准确地评价新药的抗结核活性。但对于 PBTZ-169、BTZ-043、TMC207、PA-824 来说,其胞内、外抗菌活性均表现优异,抗结核活性最佳的 PBTZ-169 与 BTZ-043,二者同属于苯并噻嗪类药物,BTZ-043 的 72 h 内杀菌活性与 INH 相似,细菌代谢的最早阶段即可被其阻止^[5];PBTZ-169 的活性更优于 BTZ-043,在 5 μg/ml 时,表现出完全的胞内杀菌活性,这与文献报道结果一致^[6-7]。分析其原因:(1)PBTZ-169 与 BTZ-043 具有良好的体外抗结核活性,MIC₉₀ 值低;(2)PBTZ-169 与 BTZ-043 均具有进入巨噬细胞的能力并达到了 MIC₉₀ 值以上。吡嗪酰胺在人体中胞内杀菌效果较好,但本研究发现 PZA 在体外的细胞内抗结核活性比较差,这与 Heifets 等^[8]的研究结果类似;因 PZA 需要在酸性环境下才能发挥抗结核活性,因此推测在本研究模型中 PZA 进入巨噬细胞后尚未被吞噬溶酶体摄取,胞质中 pH 条件不是 PZA 发挥杀菌活性的最佳条件。

抗结核药物细胞内药效评价涉及因素较多。郑海琴等^[9]之前的研究显示,感染复数、感染时间和药物作用时间均对胞内抗结核活性有影响;另外,还发现感染菌的活力也会对结果产生影响,因此本研究对上述影响因素进行了进一步的优化。用于结核分枝杆菌感染的巨噬细胞系常选用 RAW264.7 和 J774.1 两种,相比 RAW264.7 细胞,虽然 J774.1 细胞传代后贴壁时间稍长,但是细胞生长状态更易保持稳定且不易向终末细胞分化,因此本研究选用 J774.1 细胞系作为感染模型。

抗结核药物在巨噬细胞模型中的细胞内浓度是评价其活性的重要内容之一。目前,测定细胞内药物浓度的方法主要有高效液相色谱法和液质联用法。本研究采用 HPLC-MS-MS 方法直接测定细胞内药物浓度。Baietto 等^[10]用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS-MS)方法测定了 EMB、INH、RFP 与

PZA 在患者外周血单核细胞(PBMC)内的浓度,与本研究相比,这些药物进入 PBMC 和巨噬细胞内的能力并不相同。

本研究表明,与体外 MIC₉₀ 测定相比较,药物在巨噬细胞内的浓度可以体现出药物进入巨噬细胞的能力,是胞内发挥抗结核活性的重要因素,也是发现新药不同体外活性的一个重要评价内容。在临床治疗药物选择组成方案时,要充分考虑各种药物的抗菌活性与特性,结核分枝杆菌是胞内致病菌,选择能在巨噬细胞内达到有效抑菌浓度的抗菌药物,即选择那些能够有效渗透进入细胞的抗结核药物非常重要。

本研究的局限之处是没有采用多种细胞模型,以及没有纳入更多的抗结核药物。在后续的研究中,随着更多药物的纳入,以及针对各种药物在巨噬细胞内 PK/PD 的研究及细胞器分布,必将丰富及完善巨噬细胞内抗结核药物活性研究的理论,并为开展后续的体内实验及临床应用提供帮助。

参 考 文 献

- [1] 朱慧,刘忠泉,谢莉,等. 应用高效液相色谱-质谱/质谱联用技术检测贝达喹啉血药浓度. 中国防痨杂志, 2018, 40(12): 1319-1324.
- [2] 郭少晨,朱慧,郭超,等. 909 例结核病患者一线抗结核药物血药浓度监测结果分析. 中国防痨杂志, 2018, 40(7): 744-749.
- [3] Islam MM, Hameed HMA, Mugweru J, et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. J Genet Genomics, 2017, 44(1): 21-37.
- [4] Makarov V, Neres J, Hartkoorn RC, et al. The 8-pyrrole-benzothiazinones are noncovalent inhibitors of DprE1 from *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(8): 4446-4452.
- [5] Makarov V, Manina G, Mikusova K, et al. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. Science, 2009, 324(5928): 801-804.
- [6] Hoagland DT, Liu J, Lee RB, et al. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 102: 55-72.
- [7] Piton J, Vocat A, Lupien A, et al. Structure-based drug design and characterization of sulfonyl-piperazine benzothiazinone inhibitors of dprE1 from *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(10): pii: e00681-18.
- [8] Heifets L, Higgins M, Simon B. Pyrazinamide is not active against *Mycobacterium tuberculosis* residing in cultured human monocyte-derived macrophages. Int J Tuberc Lung Dis, 2000, 4(6): 491-495.
- [9] 郑海琴,陆宇,王彬,等. Alamar blue 法检测药物细胞内抗结核活性的研究. 中国抗生素杂志, 2011, 36(6): 468-473.
- [10] Baietto L, Calcagno A, Motta I, et al. A UPLC-MS-MS method for the simultaneous quantification of first-line antituberculars in plasma and in PBMCs. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(9): 2572-2575.

(收稿日期: 2019-06-08)

(本文编辑: 范永德)