

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.27.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 27-0035-04

新型恶唑烷酮化合物对耐药性结核分枝杆菌抗菌作用的探讨

化莉¹, 赵亚静², 朱贵荣²

(1. 北京大学国际医院 呼吸与危重症医学科, 北京 102206; 2. 解放军第 309 医院 呼吸科, 北京 100091)

摘要: 目的 测定新型恶唑烷酮化合物对临床分离的广泛耐药结核分枝杆菌的抗菌活性。**方法** 采用 7H10 培养基进行体外菌落培养及最小抑菌浓度测定。采用 BALB/c 小鼠攻毒结核分枝杆菌模型测定化合物的抗菌活性。**结果** 新型恶唑烷酮化合物 sy142 在体外检测和动物模型中的抗结核活性均优于 linezolid, sy144 与 linezolid 活性相当。Sy142 与 sy144 对多重耐药结核分枝杆菌和广泛耐药结核分枝杆菌具有强效的抗菌作用。**结论** sy142 和 sy144 抗结核活性强, 可作为新型恶唑烷酮抗菌剂研发的先导化合物。

关键词: 结核分枝杆菌; 广泛耐药; 恶唑烷酮; 抗菌活性

中图分类号: R52

文献标识码: A

Efficacy of novel Oxazolidinone analogues against MDR mycobacterial tuberculosis

Li Hua¹, Ya-jing Zhao², Gui-rong Zhu²

(1. Department of Respiratory Medicine, Peking University International Hospital, Beijing 102206, China; 2. Department of Respiratory Medicine, The 309TH Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing, 100091, China)

Abstract: Objective To test the efficacy of novel Oxazolidinone analogues against multi-drug resistant (MDR) mycobacterial tuberculosis. **Methods** Tube dilution method and Middlebrook 7H10 agar media were utilized to determine the anti-bacterial activities of Oxazolidinones analogues. *In vivo* activities of these compounds were evaluated with BALB/c mouse model of mycobacterial tuberculosis infection. **Results** Sy142 indicated improved anti-bacterial efficacy both *in vitro* and *in vivo* when compared with Linezolid, and sy144 manifested similar activities compared with Linezolid. Both sy142 and sy144 demonstrated promising efficacy of anti-bacterial activities against MDR Mycobacterial tuberculosis. **Conclusions** Sy142 and sy144 exerts satisfactory anti-MDR mycobacterial tuberculosis efficacy and is acceptable for further structural modifications.

Keywords: tuberculosis; extensively drug resistance; Oxazolidinone; antimicrobial activity

近年来, 临床结核分枝杆菌的耐药率不断增加^[1-2]。恶唑烷酮类化合物是新型抗菌剂, 利奈唑胺 (linezolid) 是唯一被批准应用于临床的恶唑烷酮类药物^[3]。然而, linezolid 用药会引起神经、视力及血液等毒副作用, 因此医药学界一直致力于发现活性更高、

毒性更弱的新型恶唑烷酮化合物^[4]。本文针对临床分离的多重耐药及广泛耐药结核分枝杆菌, 通过体外和动物模型两种不同层面评价新型恶唑烷酮及 linezolid 的抗菌活性。

收稿日期: 2017-06-02

1 材料与方 法

1.1 菌株和试剂

选取 2012 年 1 月 -2016 年 1 月 309 医院收治肺结核患者。17 株多重耐药结核分枝杆菌 (multi-drug resistance tuberculosis, MDR-TB) 和 10 株广泛耐药结核分枝杆菌 (extensive drug resistance tuberculosis, XDR-TB)。以标准菌株 H37RV 作为质控菌株 (购自中国药品生物制品研究所)。Linezolid 及新型恶唑烷酮化合物 (sy-40、sy-41、sy-142、sy-144) 均由中国药科大学制药学院合成。

1.2 结核分枝杆菌培养和药物活性检测

1.2.1 结核分枝杆菌分离培养 采用米氏琼脂培养基, 其制备见相关报道。痰标本用 2% NaOH 液化, 作用 20 min 后, 以无菌吸管取 0.2 ml 分别接种于斜面上, 置 37℃ 温箱内培养, 每周观察。

1.2.2 药物活性检测 Linezolid 及新型恶唑烷酮化合物以倍比稀释配置 0.125 ~ 32.000 $\mu\text{g/ml}$ 。将上述配好的药物溶液按相应比例加入到含有 OADC 营养添加剂 (油酸、牛血清蛋白、右旋糖苷及过氧化氢酶) 的 Middlebrook 7H10 琼脂培养基中。刮取约 10 mg 生长物, 研磨均匀后, 用蒸馏水稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$, 各取 0.1 ml 接种于含药斜面 and 对照斜面, 置于 36℃ 温箱培养 21 d, 测定其最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。利用测定最低抑菌浓度 (MIC) 以上各试验管培养物, 分别吸取 0.1 ml, 移种在不含药物的培养基上, 经孵育培养 21 d, 菌落数 <5 个的药物浓度为最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC)。

1.2.3 动物模型活体抗结核活性测试 将 0.2 ml 含有 5×10^6 个活菌的 H37Rv 及临床分离株 (MDR 和 XDR-TB) 菌悬液通过尾静脉注射的方式感染 BALB/c 小鼠。将测试化合物溶于磷酸盐缓冲液中, 配成 50 mg/ml 的溶液。以胃灌方式每天给药 1 次, 恶唑烷酮的灌胃药物浓度为 100 mg/kg, 利福平 (rifampicin, RFP) 的灌胃浓度是 10 mg/kg。每组 8 只小鼠, 不给药的小鼠作阴性对照。持续给药 1 个月后, 解剖小鼠, 取肺组织进行 HE 染色, 并测定全肺的结核分枝杆菌活菌计数。实验动物室注册批文: SYXK (军) 2012-0016。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料多组比较使用方差齐性检验, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

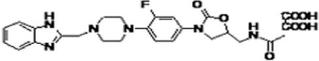
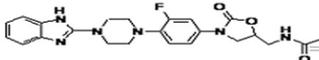
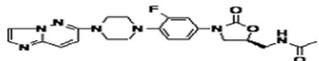
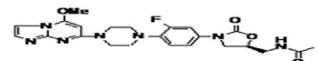
2.1 Linezolid 及新型化合物对结核分枝杆菌抗菌活性分析

Linezolid 及新型化合物体外抗结核 MIC 值见表 1。对 17 例 MDR-TB 及 10 例 XDR-TB, 化合物 sy142、sy144 及 linezolid 都体现出较低的 MIC 值。对于 sy142, 只有 1 例 MDR-TB 的 MIC 值为 ≥ 4 mg/L, 而 XDR-TB 的 MIC 值均在 2 mg/L 及以下。从 MIC 分布上分析, sy142 对 MDR-TB 及 XDR-TB 的体外抗菌效果要略优于 linezolid, 而 sy144 的活性与 linezolid 处在同一水平。Linezolid 及新型化合物体外抗结核 MBC 值见表 2。对于临床菌株, MBC 的分布状况与 MIC 分

表 1 Linezolid 及新型化合物体外 MIC 检测

化合物	结构	H37Rv 的 MIC/ MAC/ (mg/L)	MDR 结核菌 MIC 分布 / ($\mu\text{g/ml}$)			XDR 结核菌 MIC 分布 / ($\mu\text{g/ml}$)		
			≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	2	≥ 4
sy-40		2	2	12	3	1	4	5
sy-41		4	0	0	17	0	2	8
sy-142		0.5	11	5	1	7	3	0
sy-144		0.5	8	4	5	4	4	2
linezolid		0.5	8	8	1	4	4	2

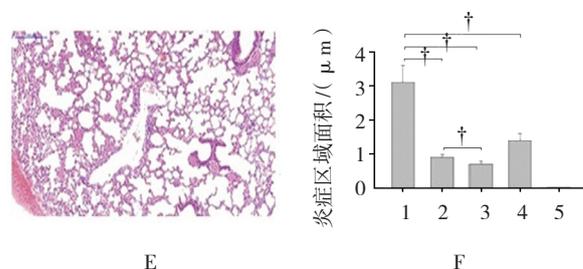
表 2 Linezolid 及新型化合物体外 MBC 检测

化合物	结构	H37Rv 的 MBC/(mg/L)	MDR 结核菌 MBC 分布 / (μg/ml)			XDR 结核菌 MBC 分布 / (μg/ml)		
			≤ 2	4	≥ 4	≤ 2	4	≥ 4
sy-40		4	5	9	3	3	5	2
sy-41		8	0	0	17	0	0	10
sy-142		2	13	4	0	7	3	0
sy-144		2	10	4	3	4	4	2
linezolid		2	10	4	3	5	3	2

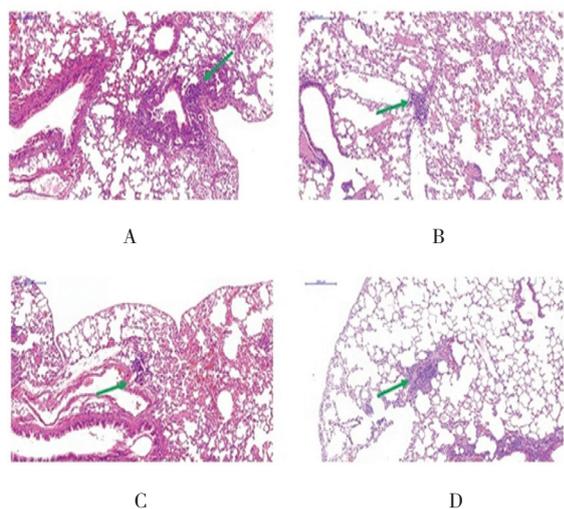
布类似, sy142 的效果同样略优于 linezolid。

2.2 linezolid 及新型恶唑烷酮化合物对小鼠体内结核分枝杆菌抗菌活性分析

选取 sy142、sy144 及 linezolid 进行小鼠体内抗结核治疗并分析比较其优劣差异。将 BALB/c 小鼠进行结核分枝杆菌攻毒感染 1 周后, 对其进行 linezolid、sy142、sy144 化合物灌胃治疗。1 个月后, 将小鼠进行解剖取肺, 行 HE 染色抗酸染色及全肺菌落计数。HE 染色后, 蓝色细胞聚集区域为炎症区域, 这部分区域面积越大表示炎症反应越高。结果显示, 未治疗对照组肺部出现大量的炎症细胞 (见附图 A), 说明感染成功。Linezolid、sy142 及 sy144 治疗组中的炎性细胞区域少于对照组, 而 sy142 治疗组的炎症区域面积较 Linezolid 治疗组的炎症区域面积小, 结果差异有统计学意义 (见附图 B~D, F)。而未感染的阴性对照组, 并未出现明显的炎症细胞区域 (见附图 E)。同



附图 不同化合物治疗结核感染小鼠染色分析 (HE × 10 倍)
A: 结核感染组; B: 结核感染 linezolid 治疗组; C: 结核感染 sy142 治疗组; D: 结核感染 sy144 治疗组; E: 未感染组; F: 不同组别的炎症区域面积分析。1: MTB; 2: MTB+LZD; 3: MTB+sy142; 4: MTB+sy144; 5: Control。箭头为炎症细胞区域。† 两者比较, $P < 0.05$



时, 肺部菌落计数结果显示, linezolid、sy142、sy144 及 RFP 治疗对 H37Rv ($F = 11.34, P = 0.000$), MDR ($F =$

表 3 linezolid、sy142、sy144 及 RFP 动物体内抗结核活性差异比较

指标	肺菌落计数 Log10/ (CFU)		
	H37Rv	MDR	XDR
Control	5.79 ± 0.03	5.23 ± 0.56	5.54 ± 0.12
Sy142	1.34 ± 0.04 ¹⁾²⁾	1.26 ± 0.04 ¹⁾²⁾	1.88 ± 0.05 ¹⁾²⁾
Sy144	2.41 ± 0.12 ¹⁾	2.08 ± 0.09 ¹⁾	2.32 ± 0.09 ¹⁾
Linezolid	2.01 ± 0.07 ¹⁾	1.86 ± 0.34 ¹⁾	2.27 ± 0.10 ¹⁾
RFP	1.27 ± 0.11 ¹⁾	5.45 ± 0.86	5.74 ± 0.24
F 值	11.343	14.584	8.826
P 值	0.000	0.000	0.000

1) 与 Control 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 linezolid 治疗组比较, $P < 0.05$ 。CFU: Colony-Forming Unit

14.58, $P=0.000$)、XDR ($F=8.82$, $P=0.000$) 菌株治疗差异有统计学意义。进一步两两比较显示, sy142 治疗组菌落计数低于 linezolid 治疗组及 sy144 治疗组, 结果差异有统计学意义。利福平 (RFP) 对标准菌株 H37Rv 具有明显的活性, 但对 MDR 及 XDR-TB 均不具有明显活性 (见表 3)。

3 讨论

恶唑烷酮类化合物是新型的抗生素, 对革兰阳性球菌、结核分枝杆菌等都具有良好的活性。在应用初期针对 MDR 及 XDR-TB 取得较好的治疗效果。Linezolid 长期使用会产生很强的副作用, 如神经毒性休克及血小板减少症等。由于抗结核治疗周期往往需要半年以上, 因此 linezolid 的毒副作用制约其在抗结核领域的应用。因此, 很多药物化学家致力于开发研制毒副作用更低、抗菌谱更广、活性更强的新型二代恶唑烷酮类新药^[5]。

目前在研的二代恶唑烷酮类化合物包括 AZD-2563^[6]、RANBEZOLID^[7]、DA7867 等^[8]。不同的新型制剂都具有某些自己独到的优势和不足。AZD-2563 由 AstraZeneca 公司研发并已经进入一期临床研究。其活性较 linezolid 有所提高, 并且能够产生长期持久的效果。但由于未知原因, 临床研究被中断, 而临床研究数据并未被公布。Ranbezolid 活性是 linezolid 的 2 倍, 在体内也具有良好的药代动力学和安全性, 但曾有文章报道, 含有硝基咪唑基团的化合物可被体内酶类催化, 将硝基转化为亚硝基自由基中间体, 从而产生细胞毒性, 因此 Ranbezolid 也于一期临床研究后被中断。

在小鼠感染模型中, linezolid, sy142 和 sy144 可以杀灭肺部感染结核分枝杆菌。sy142 无论在控制炎症区域面积和直接抑菌作用均强于 linezolid, 这初步预证了 sy142 在活体条件下的抗结核活性前景。但具

体是否能成为新一类上市药物, 还需要药代动力学、安全性、稳定性等大量数据支持。与 linezolid 的结构比较发现, 4 哌嗪基被 N-杂环取代会提高抗结核活性。所以后续的基于该点的结构改造也至关重要。笔者的发现很有可能成为研发抗广泛耐药结核新药的先导化合物。

参 考 文 献:

- [1] CHEN L, LI N, LIU Z, et al. Genetic diversity and drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis isolates from Zunyi, one of the highest-incidence-rate areas in China[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(3): 1043-1047.
- [2] SCHNIPPEL K, FIRNHABER C, BERHANU R, et al. Adverse drug reactions during drug-resistant TB treatment in high HIV prevalence settings: a systematic review and meta-analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(7): 1871-1879.
- [3] SINGLA R, CAMINERO J A, JAISWAL A, et al. Linezolid: an effective, safe and cheap drug for patients failing multidrug-resistant tuberculosis treatment in India[J]. European Respiratory Journal, 2012, 39(4): 956-962.
- [4] ZAMANI F, PYNE S G, HYLAND C J T. Oxazolidinones and 2, 5-Dihydrofurans via Zinc-catalyzed regioselective allenylation reactions of L- α -amino aldehydes[J]. Journal of Organic Chemistry, 2017, 82(13): 6819-6830.
- [5] SRIVASTAVA A, KSHETRIMAYUM S, GUPTA S K, et al. Linezolid-induced optic neuropathy in XDR pulmonary TB: A case series[J]. Indian Journal of Tuberculosis, 2017, 64(2): 129-133.
- [6] JONES R N, ANDEREGG T R, DESHPANDE L M, et al. Synthesis of oxazolidinones/polyurethanes from aziridines and CO₂[J]. Current Catalysis, 2012, 1(2): 107-124.
- [7] MICHALSKA K, GRUBA E, BOCIAN W, et al. Enantioselective recognition of radezolid by cyclodextrin modified capillary electrokinetic chromatography and electronic circular dichroism[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2017(139): 98.
- [8] ELEXSON N, AFSAH-HEJRI L, RUKAYADI Y, et al. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant Vibrio parahaemolyticus, isolates[J]. Food Control, 2014, 35(1): 378-385.

(王荣兵 编辑)