

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.22.006
文章编号: 1005-8982 (2023) 22-0032-05

实验研究·论著

普托马尼对利福平依赖结核菌感染小鼠的作用及其机制研究*

蒲冬梅¹, 倪慧敏²

(1. 成都中医药大学附属医院 药剂科, 四川 成都 610072; 2. 鹰潭市余江区人民医院 药剂科, 江西 鹰潭 335000)

摘要: 目的 探究普托马尼(PA-824)对利福平(RFP)依赖结核菌感染小鼠的作用及其机制研究。**方法** 将32只SD雄性小鼠随机分为RFP治疗组、PA-824治疗组、联合治疗组和对照组, 每组8只。所有小鼠以结核分枝杆菌RFP依赖株攻毒, 复制RFP依赖结核病小鼠模型, RFP治疗组给予65 mg/(kg·d)RFP, PA-824治疗组给予25 mg/(kg·d)PA-824, 联合治疗组给予上述2种药物, 对照组予以等量生理盐水灌胃。治疗6周后观察小鼠脾、肺组织重量, 脏器致病指数, 脾、肺组织荷菌量及肺组织病理学变化。**结果** 与对照组比较, RFP治疗组的肺重量、脾重量、脾菌量、肺菌量均升高($P < 0.05$), PA-824治疗组和联合治疗组的肺重量、脾重量、脏器致病指数评分、脾菌量、肺菌量均降低($P < 0.05$); 与联合治疗组比较, RFP治疗组和PA-824治疗组的肺重量、脾重量、脏器致病指数评分、脾菌量、肺菌量均升高($P < 0.05$); 与RFP治疗组比较, PA-824治疗组的肺重量、脾重量、脏器致病指数评分、脾菌量、肺菌量均降低($P < 0.05$)。**结论** PA-824在抑制MTB对RFP依赖性的同时, 对RFP依赖结核菌感染小鼠具有较好的抑制作用, 同时对改善病变范围与病变程度均有一定的效果。

关键词: 利福平依赖; 普托马尼; 结核菌; 小鼠

中图分类号: R521

文献标识码: A

Effect of pretomanid on rifampicin-dependent Mycobacterium tuberculosis infection in mice and its mechanism*

Pu Dong-mei¹, Ni Hui-min²

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Department of Pharmacy, Yujiang District People's Hospital, Yingtan, Jiangxi 335000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of pretomanid (PA-824) on rifampicin (RFP)-dependent Mycobacterium tuberculosis infection in mice and its mechanism. **Methods** Thirty-two male SD mice were randomly divided into RFP treatment group, PA-824 treatment group, combination treatment group and control group, with 8 mice in each group. All mice were challenged with RFP-dependent strains of Mycobacterium tuberculosis to establish an RFP-dependent tuberculosis mouse model. The RFP treatment group was given 65 mg/(kg·d) of RFP, the PA-824 treatment group was given 25 mg/(kg·d) of PA-824, and the combination treatment group was given both the drugs in the above doses. The mice in the control group were given the same amount of normal saline by gavage. After 6 weeks of treatment, the weights of lung and spleen tissues, the organ severity score, the bacterial load of the lung and spleen tissues and the pathological results of lung tissues were observed. **Results**

收稿日期: 2023-03-20

* 基金项目: 四川省科技计划项目(No:2020JDRC0115)

[通信作者] 倪慧敏, E-mail: 996922590@qq.com; Tel: 18970189910

Compared with the control group, the weights and the bacterial load of lung and spleen were all higher in the RFP treatment group, while the weights of lung and spleen, the organ severity score, and the bacterial load of the lung and spleen in the PA-824 treatment group and the combination treatment group were lower ($P < 0.05$). Compared with the combination treatment group, the weights of lung and spleen, the organ severity score, and the bacterial load of the lung and spleen in the RFP treatment group and the PA-824 treatment group were increased ($P < 0.05$). Compared with the RFP treatment group, the weights of lung and spleen, the organ severity score, and the bacterial load of the lung and spleen in the PA-824 treatment group were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** PA-824 not only mitigates the RFP dependence for controlling *Mycobacterium tuberculosis*, but itself also exhibits a great inhibitory effect on RFP-dependent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. Meanwhile, it may reduce the extent and severity of the lesions in some way.

Keywords: rifampicin dependence; pretomanid; *Mycobacterium tuberculosis*; mouse

结核病是由抗结核分枝杆菌 (*mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的慢性传染疾病, 主要侵犯肺, 近年来发病率逐年升高^[1]。随着菌株的不断变异、耐药, 结核菌逐渐出现了依赖现象, 主要表现为在某种药物特定的浓度范围内, 结核杆菌生长更快, 对该药物具有一定的依赖作用^[2-3]。有研究显示, 依赖现象中利福平 (Rifampicin, RFP) 依赖率最高^[4]。目前结核杆菌对临床常用药物产生了不同程度的耐药性或依赖性, 治疗成功率较低, 因此为有效防控结核病, 研发疗效显著、安全性高的新型抗结核药物意义重大^[5]。普托马尼 (Pretomanid, PA-824) 是硝基咪唑类的一种, 对 MTB 有较高的特异性, 对抗结核有自己独特的作用机制^[6-7]。目前国内关于该药物的临床数据较少, 本研究通过复制 RFP 依赖结核菌感染小鼠模型, 探究 PA-824 对 RFP 依赖结核菌的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级、6 ~ 8 周龄 Balb/c 雄性小鼠 32 只, 体重 18 ~ 23 g, 平均 (20 ± 2) g, 购自上海上药第一生化药业有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2021-0005, 实验动物使用许可证号: SYXK (川) 2019-049。结核分枝杆菌 RFP 依赖株购自北京结核病防治所。

1.2 主要试剂与仪器

RFP (国药准字 H13024622, 北京中新药业股份有限公司, 规格: 0.15 g), 普托马尼 (美国 Tb Alliance 公司, 剂量: 0.2 g), 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (安徽雷根生物技术有限公司)。

罗氏培养基 (上海卡迈舒生物科技有限公司)。

轮转式切片机 (型号: S700A, 深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型复制及分组 将结核分枝杆菌 RFP 依赖株于改良罗氏培养基培养 4 周后挑取完整菌落, 充分研磨成匀浆后进行比浊, 制成浓度 1 mg/mL 的菌悬液, 采用滤膜 (孔径 8 μm) 过滤后, 置于 -70 °C 环境下保存, 采用活菌计数法计算 1 mL 菌悬液中的菌数。将菌悬液室温解冻, 进行梯度稀释, 根据菌数配置成 1×10^6 CFU/mL 的溶液, 每只小鼠尾静脉注射 0.2 mL, 复制 RFP 依赖结核病小鼠模型^[8]。

将 32 只小鼠随机分为 4 组: RFP 治疗组、PA-824 治疗组、联合治疗组及对照组, 每组 8 只。RFP 治疗组给予 RFP 65 mg/(kg·d), PA-824 治疗组给予 PA-824 25 mg/(kg·d), 联合治疗组给予 RFP 65 mg/(kg·d) 和 PA-824 25 mg/(kg·d)^[9]。对照组给予等量生理盐水, 每周采取灌胃的方式给药 2 次, 治疗 6 周, 每日观察并记录小鼠的生理状况。

1.3.2 脾、肺组织重量 给药第 43 天, 每组取 4 只小鼠, 称重后处死, 在无菌环境下解剖, 取小鼠肺、脾组织, 用电子天平进行称重, 记录脾、肺组织重量。

1.3.3 脏器致病指数评分 肺、脾称重后, 肉眼观察小鼠脏器病变程度, 采用单盲法根据小鼠脏器致病指数评分标准^[10]。评分细则见表 1。

1.3.4 肺组织 RFP 依赖性 称重后取左肺于研磨器中研磨至匀浆, 进行 10 倍梯度稀释 (1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5}), 每组分别取上述浓度于匡氏培养基在 36.5 °C 环境下培养, 每周观察菌株 RFP 依赖性, 3 周后进行菌落计数。

1.4 HE 染色观察肺组织病理学变化

治疗结束后, 将剩余小鼠全部处死, 在无菌环

表 1 小鼠脏器致病指数评分

严重程度	脾	肺	肝	淋巴结		总分
				注射部位	肺门气管旁	
轻度	35	30	25	10	10	110
中度	20	20	20	10	10	80
重度	10	10	10	10	10	50

境下解剖,取小鼠肺组织,置于 10% 中性甲醛溶液中脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,在显微镜下观察每组小鼠肺组织病理学变化,并估算病变部分在切片中的占比。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用方差分析,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 各组小鼠肺、脾组织重量比较

对照组、联合治疗组、RFP 治疗组、PA-824 治疗组肺、脾组织重量比较,经方差分析,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较,RFP 治疗组肺、脾组织重量升高,PA-824 治疗组和联合治疗组的肺、脾重量降低 ($P < 0.05$);与联合治疗组比较,RFP 治疗组和 PA-824 治疗组的肺、脾组织重量升高 ($P < 0.05$);与 RFP 治疗组比较,PA-824 治疗组的肺、脾组织重量降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 各组小鼠脏器致病指数评分比较

对照组、联合治疗组、RFP 治疗组、PA-824 治疗组脏器致病指数评分分别为 (61.12 ± 15.08)、

表 2 各组小鼠肺、脾组织重量比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	肺组织重量	脾组织重量
对照组	0.284 ± 0.022	0.219 ± 0.033
联合治疗组	0.195 ± 0.047 ^①	0.121 ± 0.025 ^①
RFP 治疗组	0.353 ± 0.035 ^{①②}	0.286 ± 0.035 ^{①②}
PA-824 治疗组	0.241 ± 0.024 ^{①②③}	0.179 ± 0.020 ^{①②③}
F 值	17.612	23.327
P 值	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与联合治疗组比较, $P < 0.05$;③与 RFP 治疗组比较, $P < 0.05$ 。

(26.84 ± 6.26)、(57.06 ± 13.37)、(40.76 ± 10.35)分,经方差分析,差异有统计学意义 ($F=7.189, P=0.005$)。与对照组比较,PA-824 治疗组和联合治疗组脏器致病指数评分降低 ($P < 0.05$);与联合治疗组比较,RFP 治疗组、PA-824 治疗组脏器致病指数评分升高 ($P < 0.05$);与 RFP 治疗组比较,PA-824 治疗组脏器致病指数评分降低 ($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠肺组织菌株 RFP 依赖性比较

对照组、联合治疗组、RFP 治疗组、PA-824 治疗组脾、肺菌量比较,经方差分析,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较,RFP 治疗组脾、肺菌量均增多,PA-824 治疗组和联合治疗组脾、肺菌量均减少 ($P < 0.05$);与联合治疗组比较,RFP 治疗组和 PA-824 治疗组脾、肺菌量均升高 ($P < 0.05$);与 RFP 治疗组比较,PA-824 治疗组脾、肺菌量均减少 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 1。

表 3 各组小鼠肺组织菌株 RFP 依赖性比较

($n=4, \lg \text{CFU}, \bar{x} \pm s$)

组别	脾菌量	肺菌量
对照组	3.19 ± 0.17	4.88 ± 0.27
联合治疗组	2.62 ± 0.17 ^①	4.25 ± 0.14 ^①
RFP 治疗组	4.06 ± 0.45 ^{①②}	6.25 ± 0.44 ^{①②}
PA-824 治疗组	2.87 ± 0.11 ^{①②③}	4.49 ± 0.11 ^{①②③}
F 值	23.184	42.840
P 值	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与联合治疗组比较, $P < 0.05$;③与 RFP 治疗组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组小鼠肺组织病理学变化

对照组小鼠肺组织出现大范围渗出性病变,程度严重,肺泡组织明显遭到破坏,肺泡腔中性粒细胞、蛋白液大量渗出,部分病灶出现局部干酪样坏死,病变范围约为 80%;RFP 治疗组小鼠肺组织同样有大量渗出性病变,局部伴有干酪样坏死,但部分病灶部位为肉芽肿病变,病变范围为 70% ~ 80%。经 PA-824 治疗后,小鼠肺组织部分病变,渗出性病变明显减少,以肉芽肿性病变为主,病变范围为 30% ~ 50%;联合治疗组病理学改变同 PA-824 治疗组,病变范围约为 20%。见图 2。

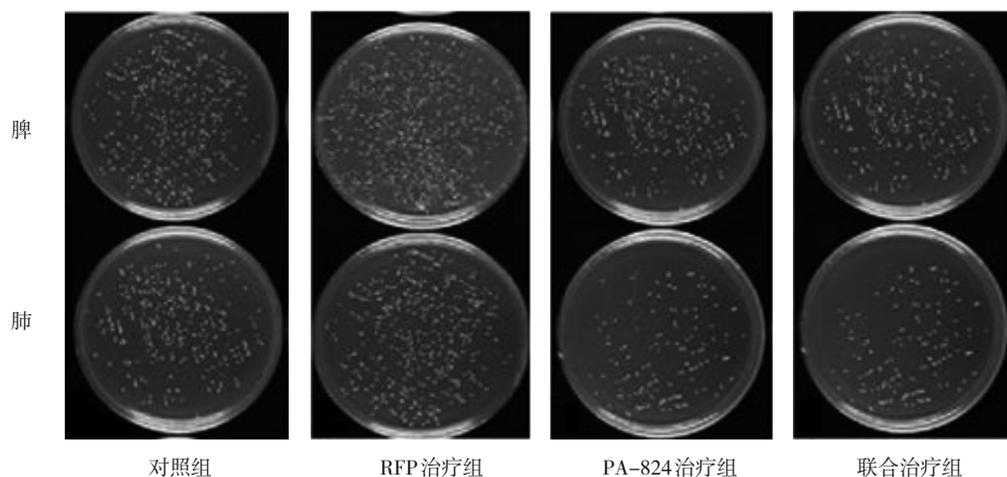


图 1 菌落培养图

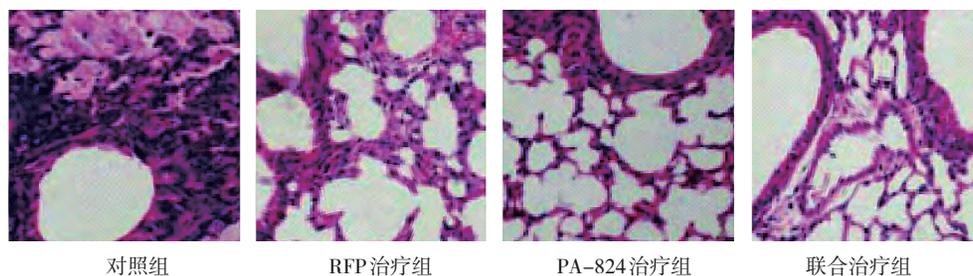


图 2 各组小鼠肺组织病理切片 (HE 染色 × 200)

3 讨论

随着对结核菌的深入了解,多数临床上的结核菌株对 RFP、异烟肼等药物具有一定的依赖性,即在一定浓度范围内更利于结核菌的生长^[11-12]。

PA-824 是一种新型抗结核药物,该药物在国外已得到证实,能够有效抑制 MTB 的活性,同时具有良好的安全性^[13-14]。该药物具有独特的作用机制,抑制甲氧基和酮基分枝菌酸,两者均为 MTB 细胞壁脂质的组成成分,通过抑制 MTB 细胞壁合成,阻断 MTB 繁殖,从而达到抑菌的作用^[15-16]。目前国内关于 PA-824 对 MTB 的抑菌作用研究较少。本研究结果显示,RFP 治疗组脾、肺组织重量、荷菌量明显高于对照组,脏器致病指数低于对照组,表明 RFP 对 MTB 菌株无明显治疗作用,同时有利于 MTB 的生长,显示该菌株对 RFP 有明显的依赖性。本研究结果显示,单独 PA-824 治疗与联合治疗可有效减轻脾、肺组织重量,对小鼠脾、肺荷菌量均有一定的抑制作用,同时能够提高脏器致病指数,说明 PA-824 在抑制 MTB 对 RFP 依赖性的同时,具有较好的抑菌作用,同时能够改善脏器病变程度。但对于 RFP 依

赖性的抑制程度目前尚无明确定论。

结核病的病理变化一般包括坏死性病变、渗出性病变及增生性病变 3 种类型^[17]。增生性病变一般发生于细胞免疫较强、细菌含量较低的情况,出现细胞聚集现象;渗出性病变则发生于病灶恶化或处于炎症早期,出现水肿、白细胞浸润等现象。本研究中小鼠肺组织病理结果显示,对照组与 RFP 治疗组小鼠肺组织病变范围相差较小,同样以渗出性病变为主,局部出现坏死性病变,表明 RFP 对 RFP 依赖结核菌感染的小鼠治疗无效。PA-824 治疗组和联合治疗组的病变组织渗出性病变明显减少,以肉芽肿性病变为主,联合治疗组的病变组织范围略低于 PA-824 治疗组,但对于肺组织病变情况均有很好的改善作用,病变范围明显缩小,病变类型由渗出性病变改善为增生性病变,提示 PA-824 对改善病变范围和病变程度有一定的效果。目前 PA-824 通过有限人群路径已在美国上市^[18]。但该药物仍缺乏临床研究数据,未来需进一步扩大样本量,对 PA-824 的最佳有效浓度、安全性、耐药机制及最佳联合治疗方案进行深入研究。

综上所述,PA-824 在抑制 MTB 对 RFP 依赖性的

同时,对RFP依赖结核菌感染小鼠具有较好的抑菌作用,同时对改善病变范围和病变程度有一定的效果,对RFP依赖结核病的防治具有重要意义。

参 考 文 献 :

- [1] DEAN A S, TOSAS AUGUET O, GLAZIOU P, et al. 25 years of surveillance of drug-resistant tuberculosis: achievements, challenges, and way forward[J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(7): e191-e196.
- [2] LOUKMAN M, OLIVIER B, VINCENT B, et al. Epidemiology of tuberculosis and susceptibility to antituberculosis drugs in Reunion Island[J]. *BMC Infect Dis*, 2023, 23(1): 4.
- [3] 刘丽,张荣浩,杨松.抗结核新药普托马尼治疗耐多药与广泛耐药结核病的研究进展[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2021, 44(4): 387-390.
- [4] ISMAIL N A, OMAR S V, MOULTRIE H, et al. Assessment of epidemiological and genetic characteristics and clinical outcomes of resistance to bedaquiline in patients treated for rifampicin-resistant tuberculosis: a cross-sectional and longitudinal study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(4): 496-506.
- [5] COX H, GOIG G A, SALAAM-DREYER Z, et al. Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicin-resistant tuberculosis in high-burden settings: a retrospective cohort study[J]. *J Clin Microbiol*, 2022, 60(3): e0236221.
- [6] MUDDE S E, UPTON A M, LENAERTS A, et al. Delamanid or pretomanid? A Solomonian judgement! [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2022, 77(4): 880-902.
- [7] CONRADIE F, BAGDASARYAN T R, BORISOV S, et al. Bedaquiline-pretomanid-linezolid regimens for drug-resistant tuberculosis[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(9): 810-823.
- [8] 刘敏,孙钢,刘如意.结核多表位DNA疫苗免疫效果及其对小鼠耐药结核病的疗效观察[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014, 35(3): 311-314.
- [9] BIGELOW K M, TASNEEN R, CHANG Y S, et al. Preserved efficacy and reduced toxicity with intermittent linezolid dosing in combination with bedaquiline and pretomanid in a murine tuberculosis model[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(10): e01178-20.
- [10] 谢惠安.现代结核病学[M].北京:人民卫生出版社,2000: 94-97.
- [11] 张一杨,李莹淑,李金凤,等. SIRT1通过降低NF- κ B p65表达减轻异烟肼致人肝细胞损伤的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(22): 7-12.
- [12] BIGELOW K M, DEITCHMAN A N, LI S Y, et al. Pharmacodynamic correlates of linezolid activity and toxicity in murine models of tuberculosis[J]. *J Infect Dis*, 2021, 223(11): 1855-1864.
- [13] 岳鹏,曹文静,徐鑫,等.抗结核新药普托马尼研究进展[J]. *中国热带医学*, 2021, 21(4): 370-374.
- [14] BERRY C, du CROS P, FIELDING K, et al. TB-PRACTECAL: study protocol for a randomised, controlled, open-label, phase II-III trial to evaluate the safety and efficacy of regimens containing bedaquiline and pretomanid for the treatment of adult patients with pulmonary multidrug-resistant tuberculosis[J]. *Trials*, 2022, 23(1): 484.
- [15] 高磊,杨德志.普托马尼的合成研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2021, 52(4): 463-470.
- [16] IGNATIUS E H, ABDELWAHAB M T, HENDRICKS B, et al. Pretomanid pharmacokinetics in the presence of rifamycins: interim results from a randomized trial among patients with tuberculosis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65(2): e01196-20.
- [17] KOEHLER N, ANDRES S, MERKER M, et al. Pretomanid-resistant tuberculosis[J]. *J Infect*, 2023, 86(5): 520-524.
- [18] DEB U, BISWAS S. Pretomanid: the latest USFDA-approved anti-tuberculosis drug[J]. *Indian J Tuberc*, 2021, 68(2): 287-291.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 蒲冬梅,倪慧敏.普托马尼对利福平依赖结核菌感染小鼠的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(22): 32-36.

Cite this article as: PU D M, NI H M. Effect of pretomanid on rifampicin-dependent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(22): 32-36.