

## 独山瓜馥木促进休眠型结核杆菌复活的成分和作用机制初探

杨再昌\*, 邓伟, 宋善敏, 韩立芬

贵州大学药学院, 贵阳 550025

**摘要:** 采用活性跟踪分离方法, 从独山瓜馥木分离得到能促进休眠型结核杆菌复活的化合物 **1**, 鉴定为  $\beta$ -谷甾醇-9, 12-十六碳二烯酸酯。化合物 **1** 在浓度为 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时开始显示促复活活性, 呈明显的量效关系。异烟肼、乙胺丁醇、利福平和吡嗪酰胺单独用药时, 不能杀死休眠型结核杆菌, 化合物 **1** (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与异烟肼联合用药, 培养 14、21 d 后检测, 休眠型结核杆菌被杀死, 化合物 **1** 可增强利福平对休眠菌的杀灭作用, 但分别与乙胺丁醇和吡嗪酰胺联合时, 均表现为拮抗作用。化合物 **1** 能激活休眠型结核杆菌的 KatG 酶, 使细胞内  $\text{O}_2$  含量升高, 导致休眠型结核杆菌复活。

**关键词:** 独山瓜馥木; 休眠型结核杆菌; 复活; 作用机制

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.013

## Isolation of Component with Resuscitating Activity on Dormant *Mycobacterium Tuberculosis* from *Fissistigma Cavalieriei* and Investigation on its Mechanism

YANG Zai-chang\*, DENG Wei, SONG Shan-min, HAN Li-fen

School of Pharmacy, Guizhou University, Guiyang 550025, China

**Abstract:** Compound **1**, with resuscitating activity on dormant *Mycobacterium tuberculosis*, was isolated from *Fissistigma macavaleriei* root by bioassay-guided method. It was identified as  $\beta$ -sitosterol-9, 12-hexadecadienoate by physical and spectroscopic methods. Compound **1** showed activity to resuscitate dormant *Mycobacterium tuberculosis* into active state in a dose-dependent manner with minimum effective concentration of 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dormant *M. tuberculosis* was insensitive to isoniazid, ethambutol, rifamicin and pyrazinamide in single drug. At the concentration of 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Compound **1** can help isoniazid to kill dormant *M. tuberculosis* after 14 and 21 days of exposure, and increase the killing activity of rifamicin against dormant *M. tuberculosis*. However, among two-drug combinations, compound **1**-ethambutol and compound **1**-pyrazinamide, exhibited antagonistic action on dormant *M. tuberculosis*. Compound **1** can activate the KatG activity of dormant *M. tuberculosis*, which caused the content of  $\text{O}_2$  in dormant *M. tuberculosis* cells at a high level to trigger the resuscitation of dormant *M. tuberculosis*.

**Key words:** *Fissistigma Cavalieriei*; dormant *Mycobacterium tuberculosis*; resuscitating; mechanism

结核仍然是严重危害人类健康的传染病, 据世界卫生组织 2015 年全球结核年报, 2014 年全世界死于结核的约为 150 万人、结核病患者约为 960 万人、全球约三分之一的人群为结核杆菌潜伏感染者<sup>[1]</sup>。潜伏感染者体内的结核杆菌处于代谢水平低、非复制的休眠状态, 称为休眠型结核杆菌 (Dormant *Mycobacterium Tuberculosis*)。当免疫功能下降或感染 HIV 病毒时, 休眠型结核杆菌复活, 开始复

制繁殖, 导致宿主出现活动性结核症状。研究表明骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells) 是休眠型结核杆菌隐藏在人体内的场所之一<sup>[2]</sup>。

休眠型结核杆菌潜伏在人体内, 对现有抗结核药物存在表型耐药。体外研究表明, 耐药的休眠型结核杆菌一旦复活, 又恢复了对抗结核药物的敏感性。缺氧是引起结核杆菌休眠的主要因素, Wayne 等用逐渐降低培养液中氧浓度的方法将结核杆菌诱导进入休眠状态<sup>[3]</sup>, 但是结核杆菌休眠的分子机制并不清楚。

怎样促进结核杆菌复活? Mukamolova 等人发现 Rpf 蛋白 (Resuscitation-promoting factors, Rpf) 能

收稿日期: 2016-12-01 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (NSFC 81460531); 贵州省社会发展科技攻关项目 (SY2013-3058)

\* 通信作者 Tel: 86-851-6848659; E-mail: yangzaichangzm@163.com

有效促进休眠型结核杆菌复苏<sup>[4]</sup>。为了寻找促进结核杆菌复苏的小分子,我们筛选发现独山瓜馥木根的乙醇提取物具有促进结核杆菌复苏的作用<sup>[5]</sup>,通过活性跟踪,从独山瓜馥木分离得到化合物 **1**,具有促进结核杆菌复苏的作用,报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 独山瓜馥木根及提取方法

独山瓜馥木根(贵阳中医学院赵俊华教授鉴定)采自贵州省独山县,切成碎片后自然风干,样本备留于实验室,编号 GZ50。称取 10 kg 样本,用 80% 乙醇热回流提取,共 3 次,每次 1 h,合并滤液,用旋转蒸发器回收乙醇后置 60 °C 水浴蒸干,得乙醇提取物 700 g。

### 1.2 活性跟踪分离

乙醇提取物用 10% 的乙醇水溶液溶解,分别用石油醚、乙酸乙酯萃取,得到石油醚萃取物 120 g、乙酸乙酯萃取物 140 g,萃取后剩下的水相蒸干为萃取后剩余物(434 g)。采用 Wayne 缺氧模型诱导休眠型结核杆菌,样本制成含药 7H11 琼脂试管斜面,采用菌落计数跟踪活性。跟踪结果表明石油醚萃取物具有较明显的促进休眠型结核杆菌复苏的作用。用 200~300 目硅胶装柱,洗脱剂为石油醚和乙酸乙酯(石油醚/乙酸乙酯:7/3),对石油醚萃取物(120 g)进行分离,用 TLC 监测,得到 Fr1、Fr2、Fr3 和 Fr4 组分,活性组分为 Fr3。将 Fr3 继续上柱分离,得到活性成分化合物 **1**(824 mg)。

### 1.3 活性成分促进休眠型结核杆菌复苏的量效关系试验

化合物 **1** 溶解在 7H9 培养基中,浓度分别为 4、8、16、32、64  $\mu\text{g/mL}$ ,每个浓度 10 管,阴性对照为 7H9 培养基(10 管),每管总体积 5 mL。灭菌后加入 OADC 营养液,每管接种等量休眠型结核杆菌菌液(60 d 龄结核杆菌休眠菌液,用灭菌生理盐水清洗后,再用 7H9 培养液稀释成  $10^4\text{CFU/mL}$ ,每管接种量为 100  $\mu\text{L}$ ),置 37 °C 摇摆培养箱中(80 rpm),于培养后 7、14、21 d 每管分别取 100  $\mu\text{L}$  培养物与 100  $\mu\text{L}$  的 7H9 培养液混合,从中取 100  $\mu\text{L}$  均匀接种在 7H11 平板培养基上,再置 37 °C 培养箱中静置培养 30 d,记录每管菌落数。

### 1.4 活性成分与异烟肼、乙胺丁醇、利福平、吡嗪酰胺联合抗休眠型结核杆菌试验

试验分 4 组,(1)联合抗休眠菌组:化合物 **1**(32

$\mu\text{g/mL}$ ) + 异烟肼(24  $\mu\text{g/mL}$ ,INH)、化合物 **1**(32  $\mu\text{g/mL}$ ) + 乙胺丁醇(50  $\mu\text{g/mL}$ ,EMB)、化合物 **1**(32  $\mu\text{g/mL}$ ) + 利福平(50  $\mu\text{g/mL}$ ,RMP)、化合物 **1**(32  $\mu\text{g/mL}$ ) + 吡嗪酰胺(24  $\mu\text{g/mL}$ ,PZA),各 10 管;(2)抗痨药物对照组:异烟肼(24  $\mu\text{g/mL}$ ,INH)、乙胺丁醇(50  $\mu\text{g/mL}$ ,EMB)、利福平(50  $\mu\text{g/mL}$ ,RMP)、吡嗪酰胺(24  $\mu\text{g/mL}$ ,PZA)各 10 管,药物设定的浓度为对复制型结核杆菌的杀菌浓度;(3)化合物 **1** 对照:含化合物 **1**(32  $\mu\text{g/mL}$ )的 7H9 培养液,10 管;(4)阴性对照:7H9 培养液,10 管。每管总体积为 5 mL。各试验组培养基灭菌后,接种休眠型结核杆菌菌液,按上述 1.3 的方法进行,记录每管菌落数。

### 1.5 活性成分对休眠型结核杆菌 KatG 酶的干预试验

按照 Beers 的方法进行<sup>[6]</sup>,紫外可见分光光度计为 Agilent 8453 型,测定波长为 240 nm,环境温度为  $25 \pm 1$  °C。取 60 d 菌龄的休眠菌液,用无菌生理盐水洗涤,再用 7H9 培养液配成  $10^7\text{CFU/mL}$  的菌悬液,分为 2 组:(1)休眠组:7H9 培养液 0.5 mL,休眠菌液 4.5 mL,总体积 5 mL,共 10 管;(2)化合物 **1** 组:含化合物 **1** 的 7H9 培养液 0.5 mL,休眠菌液 4.5 mL,总体积 5 mL,化合物 **1** 的终浓度为 32  $\mu\text{g/mL}$ ,共 10 管。置 37 °C 培养箱中培养 12 h 后,测定每管菌液 KatG 酶的活性。空白池为 1 mL 的 0.05 M PBS 缓冲液(pH 7.0)、2 mL 的菌液,样本池为 2 mL 的菌液、1 mL 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液[用 0.05 M PBS 缓冲液(pH 7.0)配制, $\text{H}_2\text{O}_2$  终浓度为 0.01 M]。加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液后,分别于 30、60、90、120、150 s 测定  $\text{H}_2\text{O}_2$  吸光值(OD),以  $\text{H}_2\text{O}_2$  吸光值的变化表征酶活性。

## 2 实验结果

化合物 **1** 为白色粉末(石油醚) mp. 87~90 °C,ESI-MS  $m/z$ : 671.5 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.34(1H, d,  $J = 4.8$  Hz), 4.62(1H, m), 2.04(1H, m, (CH)<sub>n</sub>), 1.31(br s, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>), 1.04(3H, s), 0.85~0.93(m, (CH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>), 0.68(3H, s, CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR 谱显示有与  $\beta$ -谷甾醇一致的一组碳信号和一组不饱和脂肪酰基碳信号, <sup>13</sup>C NMR(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 36.9(C-1), 31.5(C-2), 73.7(C-3), 42.3(C-4), 139.6(C-5), 122.5(C-6), 31.8(C-7, C-8), 49.9(C-9), 36.1(C-10), 20.9(C-11), 28.2(C-12), 42.3(C-13), 56.6(C-14), 24.2(C-

15), 39.7 (C-16), 56.1 (C-17), 11.8 (C-18), 19.3 (C-19), 36.5 (C-20), 18.7 (C-21), 34.6 (C-22), 26.0 (C-23), 42.2 (C-24), 29.5 (C-25), 19.2 (C-26), 18.7 (C-27), 23.7 (C-28), 11.8 (C-29), 脂肪链部分  $\delta$ : 173.3 (C-1'), 34.6 (C-2'), 24.2 (C-3'), 29.5 (C-4' ~ C-7'), 27.1 (C-8'), 139.6 (C-9', 10'), 27.7 (C-11'), 130.0 (C-12', 13'), 31.4 (C-14'), 22.5 (C-15'), 14.0 (C-16')。以上数据与文献资料的  $\beta$ -谷甾醇、十六碳二烯酸波谱数据一致<sup>[7,8]</sup>。将化合物用氢氧化钠溶液水解, 得到 2 种物质, 以  $\beta$ -谷甾醇和十六碳二烯酸对照, 经薄层色谱检识, 确定化合物 **1** 为  $\beta$ -谷甾醇-9,12-十六碳二烯酸酯。

从图 1 可以看出, 培养 7 d, 化合物 **1** 显示出促进休眠型结核杆菌复苏的作用, 呈明显的量效关系。低浓度 (4, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的化合物 **1** 组与阴性对照缺乏明显差异, 浓度提高到 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 菌落数大幅升高, 表明化合物 **1** 能促进休眠型结核杆菌复苏。培养 14 d 后, 阴性对照组的菌落数缺乏明显变化, 化合物 **1** 在浓度为 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 菌落数提高较为明显。培养 21 d 后, 阴性对照组的菌落数升高, 表明部分休眠菌在有氧条件下能自动复苏。化合物 **1** 浓度提高后, 对休眠型结核杆菌的复苏促进作用主要体现在 7 d 内, 培养至 14 d 后, 进入稳定期, 菌落数不再升高。从图 1 看出, 化合物 **1** 促进休眠型结核杆菌复苏的最小有效浓度为 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最大有效浓度为 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在后续联合抗菌实验中, 化合物 **1** 的浓度均设置为 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

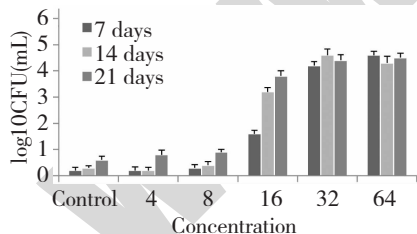


图 1 化合物 **1** 对休眠型结核杆菌复苏的影响

Fig. 1 Resuscitating activity of compound **1** on dormant *M. tuberculosis*

化合物 **1** 与一线抗痨药物的联合抗菌作用见图 2, 可以看出异烟肼 (INH)、乙胺丁醇 (EMB)、利福平 (RMP) 和吡嗪酰胺 (PZA) 按照其对复制型结核杆菌的杀菌浓度单独使用时, 对休眠型结核杆菌无杀菌作用, 化合物 **1** (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 促进休眠菌复苏后, 异烟肼 (24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在 14 d 内对结核杆菌产生

杀灭作用, 未能检出结核杆菌菌落, 可见化合物 **1** 与异烟肼对休眠型结核杆菌存在联合抗菌作用。此外, 化合物 **1** 与利福平也显示出明显的联合抗休眠菌效果。但是化合物 **1** 与乙胺丁醇和吡嗪酰胺未表现出联合抗菌作用, 菌落数在培养 21 d 后反而升高。

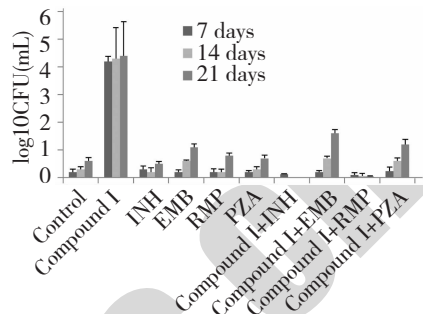


图 2 化合物 **1** (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与异烟肼 (24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , INH)、乙胺丁醇 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , EMB)、利福平 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , RMP) 和吡嗪酰胺 (24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PZA) 联合抗休眠型结核杆菌作用

Fig. 2 Anti-dormant *M. tuberculosis* activity of compound **1** (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) combined with INH (24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), EMB (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), RMP (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and PZA (24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

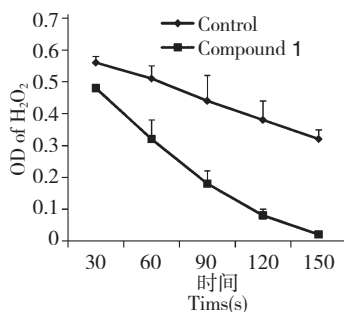


图 3 化合物 **1** (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对休眠型结核杆菌 KatG 酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  水解速率的影响

Fig. 3 Compound **1** (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) activate the KatG activity of dormant *M. tuberculosis* to hydrolysis  $\text{H}_2\text{O}_2$

从图 3 看出, 化合物 **1** 能提高休眠型结核杆菌 KatG 酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  水解的速率, 结核杆菌休眠后, KatG 酶处于低活性状态。

### 3 讨论与结论

结核杆菌休眠后, 对一线抗痨药物形成表型耐药, 长期潜伏在患者体内, 当机体免疫功能降低时, 休眠型结核杆菌复苏, 使患者再次发病<sup>[9]</sup>。历史上

曾经提出过“间断给药”的抗结核思路,即先用抗结核药物一段时间,杀死复制型结核杆菌,然后停药一段时间,让休眠型结核杆菌复苏,再用抗结核药物将复苏的结核杆菌杀死,由于难以确定停药和再次给药的时间点,这种治疗方案最终未付诸实践<sup>[10]</sup>。

通过活性跟踪分离,发现 $\beta$ -谷甾醇-9,12-十六碳二烯酸酯(化合物**1**)是独山瓜馥木促进休眠型结核杆菌复苏的成分,并存在明显的量效关系。在联合抗休眠型结核杆菌的试验中,化合物**1**能明显提高异烟肼杀死休眠型结核杆菌的效果,也能增强利福平对休眠型结核杆菌的杀灭作用,但是与乙胺丁醇、吡嗪酰胺不存在联合作用,反而存在拮抗效应。乙胺丁醇是结核杆菌阿拉伯糖基转移酶的抑制剂<sup>[11]</sup>,我们推测,化合物**1**可能干预了乙胺丁醇与酶靶的亲合力。吡嗪酰胺是一种前药,需转化成吡嗪酸,吡嗪酸进入结核杆菌内蓄积,破坏结核杆菌细胞膜的能量梯度,使结核杆菌因缺乏ATP而死亡<sup>[12]</sup>,而化合物**1**促进休眠型结核杆菌复苏后,结核杆菌具有丰富的ATP储量,故抵消了吡嗪酰胺的能量剥夺效应。化合物**1**与乙胺丁醇、吡嗪酰胺的拮抗作用有待进一步探讨。

引起结核杆菌休眠的因素和机制并不完全清楚。缺氧、营养物质缺乏、所处环境的pH值下降等可导致结核杆菌休眠。研究表明,缺氧会诱导结核杆菌的Rv2623基因过度表达,Rv2623蛋白能干预结核杆菌复制,使结核杆菌休眠<sup>[13]</sup>。我们发现,休眠型结核杆菌的KatG酶活性下降,化合物**1**是KatG酶的激活剂。KatG酶能水解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,生成O<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O,我们推测,休眠型结核杆菌的KatG酶被化合物**1**激活后,细胞内重新获得充足的O<sub>2</sub>,O<sub>2</sub>作为刺激因素,重新启动结核杆菌的DosR调控系统,使Rv2623基因下调<sup>[14]</sup>,抑制休眠型结核杆菌复制的禁锢被解除,休眠型结核杆菌被“唤醒”。

异烟肼也是一个前药,需要结核杆菌的KatG酶进行转化才能发挥杀菌作用,休眠型结核杆菌KatG酶的活性下降,也是休眠菌耐异烟肼的原因之一<sup>[15]</sup>。化合物**1**是KatG酶的激活剂,导致异烟肼的转化得以进行,这可能就是化合物**1**与异烟肼存在协同效应的机制。上述推测尚需大量的工作进一步证实。

上述工作提示,化合物**1**能促进休眠型结核杆菌复苏,使其对异烟肼、利福平重新恢复敏感性,这为消除休眠型持留菌提供了新的思路,下一步拟复制结核杆菌人工感染动物模型验证这一思路。

## 参考文献

- 1 WHO. Global Tuberculosis Report 2015.
- 2 Bikul D, Kashino SS, Pulu I, et al. CD271<sup>+</sup> bone marrow mesenchymal stem cells may provide a niche for dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*, 2013, 5:170ra13.
- 3 Wayne G, Hayes LG. An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun*, 1996, 64:2062-2069.
- 4 Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2002, 46:623-635.
- 5 Yang ZC(杨再昌), Li Q(李镛), Zhang J(张健), et al. Resuscitating activity of *Fissistigma cava leriei* extract on dormant *Mycobacteria*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:1219-1224.
- 6 Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*, 1952, 195:133-140.
- 7 Gong YH(龚运准), Ding LS(丁立生). <sup>13</sup>C NMR Analysis of Natural Products(天然产物核磁共振谱分析). Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2006.
- 8 Feng WS(冯卫生), Wang YZ(王彦志), Zheng XK(郑晓珂). Analysis of Chemical Constituents of Traditional Chinese Medicine(中药化学成分结构解析). Beijing: Science Press, 2008.
- 9 Gomez JE, McKinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis*, 2004, 84:29-44.
- 10 Zhang Y, Yew WW, Barer MR. Targeting persisters for tuberculosis control. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56:2223-2230.
- 11 Ma Z, Lienhardt C, McIlleron H, et al. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*, 2010, 375:2100-2109.
- 12 Zimhony O, Cox JS, Welch JT, et al. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nate Med*, 2000, 6:1043-1047.
- 13 Drumm JE, Mi K, Bilder P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-binding: requirement for establishing chronic persistent infection. *PLoS Pathog*, 2009, 5:e1000460.
- 14 Park HD, Guinn KM, Harrell MI, et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2003, 48:833-843.
- 15 Wolff KA, Nguyen HT, Cartabuke RH, et al. Protein kinase G is required for intrinsic antibiotic resistance in *mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53:3515-3519.