

鬼箭羽、肉桂抗结核杆菌成分的逆向跟踪分离

张越¹, 夏孟雨¹, 王蕾¹, 赵昕¹, 杨再昌^{1,2,3*}¹贵州大学药学院, 贵阳 550025;²贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014;³南方科技大学 广东省普通高校植物细胞工厂分子设计重点实验室, 深圳 518055

摘要:本研究采用逆向跟踪分离,证实松萝酸、肉桂醛分别是鬼箭羽和肉桂的最强抗结核杆菌成分。对松萝酸、肉桂醛进行结构修饰,得到7个衍生物(化合物1~7),具有较强的抗结核杆菌活性,其中2-(2-benzofuranylmethylene)hydrazinecarbothioamide(**1**)活性最强(MIC = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。通过分子对接、定量PCR、显微成像、杀菌试验,推测化合物**1**的作用机制与结核杆菌干预 β -酮脂酰-ACP合成酶III有关。

关键词:鬼箭羽;肉桂;结核杆菌;逆向跟踪分离;结构修饰

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)6-1038-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.6.017

Determination of anti-*Mycobacterium tuberculosis* components of Caulis Euonymi Alati and Cinnamomi Cortex by reverse bioassay guided isolationZHANG yue¹, XIA Meng-yu¹, WANG Lei¹, ZHAO Xin¹, YANG Zai-chang^{1,2,3*}¹School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;²State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China;³Key Laboratory of Molecular Design for Plant Cell Factory of Guangdong Higher Education Institutes, Institute of Plant and Food Science, Department of Biology, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China

Abstract: In this study, reverse bioassay guided isolation was used to discover the anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) components of Caulis Euonymi Alati and Cinnamomi Cortex. The results indicated that usnic acid and cinnamaldehyde were the strongest anti-*Mycobacterium tuberculosis* components of Caulis Euonymi Alati and Cinnamomi Cortex, respectively. The structure of usnic acid and cinnamaldehyde was modified to obtain 7 derivatives (compounds **1-7**), which have strong anti-Mtb activity. Among them, 2-(2-benzofuranylmethylene) hydrazinecarbothioamide (**1**) showed the strongest activity against Mtb (MIC = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Through molecular docking, quantitative PCR, microscopic imaging, and bactericidal tests, it is speculated that the mechanism of action of compound **1** anti-Mtb is related to the intervention of β -ketoacyl-ACP condensase III of Mtb.

Key words: Caulis Euonymi Alati, Cinnamomi Cortex; *Mycobacterium tuberculosis*; reverse bioassay guided isolation; structural modification

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的慢性传染病。由药物敏感菌株引起的结核,可采用利福平、异烟肼、乙胺丁醇和吡嗪酰胺等一线药物进行治

疗^[1,2],但是耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)和广泛耐药结核病(extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB)出现后,给结核病的治疗带来了困难^[2,4]。由于接种卡介苗产生的保护性有限,因此研发具有新作用机制的抗结核药物是控制结核病流行的主要手段。

天然产物是新型候选药物分子最重要的来源之一^[5]。近百年来,已经从天然产物中发现了大量药物候选分子,植物化学研究人员对药用植物的化学成分进行了大量研究,并建立了多个天然产物或植

收稿日期:2021-12-03 接受日期:2022-03-23

基金项目:国家自然科学基金(82060635, 81760629);贵州省社会发展科技攻关项目(SY字[2013]3058号);“国家重点实验室开放课题”及“黔科合平台人才”([2017]5101);广东省普通高校植物细胞工厂分子设计重点实验室开放项目(KLMDPCF202102)

* 通信作者 Tel:86-851-86848659; E-mail: yangzaichangzm@163.com

物化学成分数据库,比如中国天然产物化学成分数据库(Chinese Natural Product Database, CNPD)较全面地收集了中草药化学成分信息,共收录化学成分1万余种,涉及中草药4500余种^[6]。

近年来我们对200多种中草药提取物进行抗结核杆菌盲筛(blind screening),发现80多种中草药提取物体外抑制结核杆菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值小于2 mg/mL。中草药的成分复杂,阐明其活性成分往往需要进行反复的成分分离与活性验证工作。为尽快从这些天然药物中发现抗结核杆菌活性分子,我们以天然产物成分数据库为基础,提出了“逆向跟踪分离”的思路,在本实验中,选择其中的鬼箭羽、肉桂作为研究对象,采用逆向跟踪分离的方法开展研究工作:(1)利用中国天然产物化学成分数据库等数据库对鬼箭羽、肉桂的化学成分进行检索;(2)查阅文献,发现鬼箭羽的松萝酸、肉桂的肉桂醛具有抗结核杆菌活性,于是将松萝酸、肉桂醛作为导向分子,将鬼箭羽、肉桂提取物逐级分成含导向分子部分和不含导向分子的部分或组分;(3)体外抗结核杆菌测试,发现鬼箭羽提取物的不同部位或组分存在明显的活性差异,松萝酸含量高的组分,活性强,反之活性弱,因此可以判断,松萝酸是鬼箭羽抗结核杆菌活性分子。用相同方法证明,肉桂醛是肉桂抗结核杆菌活性分子;(4)采用拼合原理,对松萝酸和肉桂醛进行结构修饰,得到活性更强的衍生物。

本文展现了逆向跟踪分离方法在确认中草药活性成分的优势,并为这两味药材的临床应用提供了科学依据,为从中草药中发现抗结核杆菌分子提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鬼箭羽(*Caulis Euonymi Alati*)和肉桂(*Cinnamomi Cortex*)购于贵阳市中药材公司,经贵州大学杨再昌教授鉴定,鬼箭羽为卫矛科植物卫矛(*Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb.)的干燥具翅状物的枝条,肉桂为樟科植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl)的树皮,标本(鬼箭羽021-Ea、肉桂021-Ct)存放于贵州大学药学院天然产物研究室;牛结核分枝杆菌BCG(购自ATCC);松萝酸、肉桂醛购自百灵威公司。

1.2 导向分子的确定

从中国天然产物化学成分数据库(<http://www.pharmdata.ac.cn/cnpconline/>)、ETCM(<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>)和HERB(<http://herb.ac.cn/>)数据库查询鬼箭羽、肉桂的植物

化学研究报告,获得成分信息,通过维普、中国知网和Elsevier等网站,了解鬼箭羽、肉桂的化学成分中哪些具有抗结核杆菌活性,根据所报道的活性数据,分别确定鬼箭羽、肉桂的导向分子,如果一个药材品种有2个以上分子均具有抗结核杆菌活性,则以MIC值最低的分子视为导向分子。

查询结果及文献检索表明,鬼箭羽约含230种化学成分,归属于去甲倍半萜、倍半萜、二萜、三萜、黄酮、苯丙烷、木脂素、类固醇、生物碱等化合物,其中槲皮素抗结核杆菌的MIC值为160 μg/mL,松萝酸抗结核杆菌的MIC值为12.25 μg/mL,为此确定松萝酸作为鬼箭羽逆向跟踪分离的导向分子^[9,10]。

肉桂约含近百种化合物,归属于挥发油类、黄酮类、萜类、生物碱、酚酸类、香豆素类等化合物。在肉桂的成分中,肉桂酸、肉桂醛均被报道具有抗结核杆菌活性,肉桂醛抗结核杆菌作用最强(MIC = 10 μg/mL),因此将肉桂醛作为肉桂逆向跟踪分离的导向分子。

1.3 提取与分离

鬼箭羽干燥枝条1 kg,粉碎成粗粉,用75%乙醇提取3次,每次2 h,合并提取液,减压浓缩,回收溶剂后得乙醇浸膏180 g,再用蒸馏水提取,得水浸膏60 g。留样后取部分乙醇浸膏加适量蒸馏水溶解,分别用石油醚、乙酸乙酯依次反复萃取,得石油醚浸膏12 g,乙酸乙酯浸膏19 g,剩余水相浸膏80 g。将乙酸乙酯浸膏经硅胶柱色谱分离,以石油醚-乙酸乙酯(10:1、5:1、2:1、1:1、0:1)为洗脱剂进行梯度洗脱,采用薄层色谱合并相同组分,得到5个组分(Fr1~Fr5)。水提物经活性测试,比乙醇提取物低,故不再萃取。

肉桂干燥树皮1 kg,提取、萃取方法同鬼箭羽。得石油醚浸膏15 g,乙酸乙酯浸膏21 g,剩余水相浸膏86 g。活性测试时,肉桂的乙醇提取物活性比水提物强,故水提物不再萃取,乙醇提取物的石油醚、乙酸乙酯萃取物又以石油醚的活性更强,故将石油醚浸膏经硅胶柱色谱进一步分段,得到3个组分(Fr1~Fr3)。

1.4 提取物抗结核杆菌活性测定

1.4.1 Middle brook 7H9 培养基的制备

精确称量Middle brook 7H9培养基4.7 g,加入1 L蒸馏水、2 mL甘油,搅拌使混合均匀,分装于150 mm × 150 mm的试管中,每管体积为2 mL。

1.4.2 样本溶液的制备

将样本用二甲基亚砜(DMSO)配制成 1 mg/mL 的母液,采用 Middle brook 7H9 制备成系列浓度的样本管,不同浓度样本溶液平行做三管,阳性对照组为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的异烟肼,阴性对照组为不加药的 Middle brook 7H9 培养液。

1.4.3 活性测试

将制备好的含药试管置于 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌锅灭菌 45 min,冷却备用。细菌悬液用灭菌 7H9 培养液研磨、配置,调整菌液浓度,其浊度与麦氏比浊管 1 号(大约 10^8 CFU/mL)相同。将 20 μL 菌悬液分别接种于各试管后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 7 天。随后加入 15 μL 0.01% 刃天青染色液,摇匀后重新放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中,培养期间每半小时进行观察记录,当发现阴性对照组变红,观察并记录实验结果。最低抑菌浓度为溶液保持蓝色的最小浓度。

1.5 结构修饰

氨基硫脲具有抗结核杆菌活性,为获得活性更强的化合物,以松萝酸的结构母核苯并呋喃和不同取代基的肉桂醛类化合物为起始原料(见图 1),得到 7 个不同席夫碱类化合物(见图 2)。单体化合物的化学结构通过 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 鉴别。

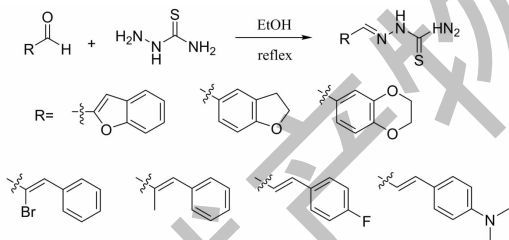


图 1 化合物 1~7 的合成路线与结构

Fig. 1 Synthetic routes and structures of compounds 1-7

1.5.1 2-(2-Benzofuranylmethylene) hydrazinecarbothioamide (1)

将 2-苯并呋喃甲醛(0.22 g, 1 eq)和氨基硫脲(0.091 g, 1 eq)在含有催化量盐酸的 12 mL 乙醇中的混合物中回流 4 h,室温冷却析出固体^[14]。沉淀用乙醇洗涤、抽滤得到白色粉末 0.23 g。收率为 69.68%。ESI-MS: m/z 220.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{OS}$, 220.1); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.98(1H, s), 7.64(1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.51(1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.37(1H, t, $J = 7.8$ Hz), 7.26(1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.20(1H, s); ^{13}C NMR (100

MHz, CD_3OD) δ : 155.5 (s), 151.1 (s), 132.8 (s), 129.8 (s), 128.1 (s), 125.9 (s), 123.2 (s), 121.5 (s), 110.8 (s), 109.7 (s)。以上数据与文献^[14]报道的数据基本一致,故将化合物鉴定为 2-(2-benzofuranylmethylene) hydrazinecarbothioamide。

1.5.2 2-[(2,3-Dihydro-5-benzofuranyl) methylene] hydrazinecarbothioamide (2)

2,3-二氢苯并[b]呋喃-5-甲醛(0.296 g, 1 eq)和氨基硫脲(0.182 g, 1 eq)为原料,按照化合物 1 的合成方法,得到白色粉末 0.306 g,收率为 69.22%。ESI-MS: m/z 222.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OS}$, 222.1); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.90(1H, s), 7.69(1H, s), 7.43(1H, d, $J = 9.7$ Hz), 6.75(1H, d, $J = 8.3$ Hz), 4.59(2H, t, $J = 8.7$ Hz), 3.23(2H, t, $J = 8.7$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz) δ : 162.4 (s), 144.0 (s), 128.6 (s), 128.3 (s), 126.7 (s), 123.3 (s), 108.8 (s), 80.1 (s), 71.2 (s), 28.5 (s)。以上数据与文献^[15]报道的数据基本一致,故将化合物鉴定为 2-[(2,3-dihydro-5-benzofuranyl) methylene] hydrazinecarbothioamide。

1.5.3 2-[(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl) methylene] hydrazinecarbothioamide (3)

将 1,4-苯并二恶烷-6-甲醛(0.328 g, 1 eq)和氨基硫脲(0.182 g, 1 eq)在乙醇溶液中回流 6 h。通过 TLC 监测反应完成。过滤反应混合物。产物硅胶色谱柱分离(石油醚:乙酸乙酯 = 5:1)得到淡黄色结晶性粉末 0.338 g,收率为 71.29%。ESI-MS: m/z 236.3 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$, 236.1); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.85(1H, s), 7.27(1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.19(1H, dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz), 6.85(1H, d, $J = 8.4$ Hz), 4.26(4H, d, $J = 2.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 145.9 (s), 143.9 (s), 143.6 (s), 128.2 (s), 127.4 (s), 120.9 (s), 117.1 (s), 115.4 (s), 64.5 (s), 64.1 (s)。以上数据与文献^[16]报道的数据基本一致,故将化合物鉴定为 2-[(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl) methylene] hydrazinecarbothioamide。

1.5.4 2-(2-Bromo-3-phenyl-2-propen-1-ylidene) hydrazinecarbothioamide (4)

在搅拌条件下,将氨基硫脲(0.091 g)的乙醇溶液滴加到 α -溴代肉桂醛(0.225 g, 1 eq)的乙醇溶液中。混合物在 80 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌约 6 h。室温冷却后沉淀析出,在玻璃过滤器上滤出并用少量乙醇洗涤,干燥得

0.221 g, 收率为 77.8%。ESI-MS: m/z 284.3 [M + H]⁺ (calcd for C₁₀H₁₁BrN₃S, 284.0); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.72 (1H, s), 8.41 (1H, s), 7.93 (1H, s), 7.86 (2H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.67 (1H, s), 7.50 ~ 7.37 (4H, m); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 178.7 (s), 142.7 (s), 137.7 (s), 135.0 (s), 130.2 (s), 129.8 (s), 128.9 (s), 119.2 (s)。以上数据与文献^[17]报道的数据基本一致, 故将化合物鉴定为 2-(2-Bromo-3-phenyl-2-propen-1-ylidene) hydrazinecarbothioamide。

1.5.5 2-(2-Methyl-3-phenyl-2-propen-1-ylidene) hydrazinecarbothioamide (5)

α-甲基肉桂醛 (0.32 g, 1 eq) 和氨基硫脲 (0.091 g, 1 eq) 为原料, 按照化合物 4 的合成方法, 得到白色针晶 0.307 g, 收率为 70.09%。ESI-MS: m/z 220.3 [M + H]⁺ (calcd for C₁₁H₁₄N₃S, 220.1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.35 (1H, s), 8.15 (1H, s), 7.87 (1H, s), 7.67 (1H, s), 7.47 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.40 (2H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.31 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 6.77 (1H, s), 2.1 (3H, s); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 178.1 (s), 148.4 (s), 137.1 (s), 136.8 (s), 134.7 (s), 129.7 (s), 128.9 (s), 128.1 (s), 13.22 (s)。化合物 4 中 H 的化学位移 7.50 ~ 7.37 归属于苯环氢, 7 号位和 9 号位 H 的化学位移分别为 7.86/7.93。化合物 5 由于甲基的给电子效应导致 7 号位和 9 号位 H 的化学位移向高场, 分别为 6.77/7.31。化合物 5 中甲基 H 的化学位移为 2.1。故将化合物 5 鉴定为 2-(2-methyl-3-phenyl-2-propen-1-ylidene) hydrazinecarbothioamide。

1.5.6 2-[3-(4-Fluorophenyl)-2-propen-1-ylidene] hydrazinecarbothioamide (6)

4-氟肉桂醛 (0.328 g, 1 eq) 和氨基硫脲 (0.091 g, 1 eq) 为原料, 按照化合物 4 的合成方法, 得到黄色结晶性粉末 0.324 g, 收率为 72.64%。ESI-MS: m/z 224.4 [M + H]⁺ (calcd for C₁₀H₁₁FN₃S, 224.1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.40 (1H, s), 8.18 (1H, s), 7.89 (1H, d, *J* = 9.3 Hz), 7.69 ~ 7.53 (1H, m), 7.22 (2H, t, *J* = 8.9 Hz), 7.03 (1H, d, *J* = 16.1 Hz), 6.82 (1H, dd, *J* = 16.1, 9.3 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 178.2 (s), 145.1 (s), 138.1 (s), 132.9 (s), 129.5 (s), 125.4 (s), 116.4 (s), 116.19 (s)。以上数据与文献^[18]报道的数据基本一致, 故将化合物鉴定为 2-[3-(4-fluorophenyl)-2-propen-1-ylidene] hydrazinecarbothioamide。

1.5.7 2-[3-[4-(Dimethylamino)phenyl]-2-propen-1-ylidene] hydrazinecarbothioamide (7)

4-二甲基氨基肉桂醛 (0.175 g, 1 eq) 和氨基硫脲 (0.091 g, 1 eq) 为原料, 按照化合物 4 的合成方法, 得到黄色粉末 0.181 g, 收率为 72.98%。ESI-MS: m/z 249.4 [M + H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₇N₄S, 249.1); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.24 (1H, s), 8.05 (1H, s), 7.85 (1H, d, *J* = 9.4 Hz), 7.49 (1H, s), 7.38 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 15.9 Hz), 6.70 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.61 (1H, dd, *J* = 16.0, 9.4 Hz), 2.94 (1H, s); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 177.6 (s), 151.2 (s), 146.4 (s), 140.3 (s), 128.8 (s), 124.1 (s), 120.2 (s), 112.5 (s), 40.3 (s)。以上数据与文献^[19]报道的数据基本一致, 故将化合物鉴定为 2-[3-[4-(Dimethylamino)phenyl]-2-propen-1-ylidene] hydrazinecarbothioamide。

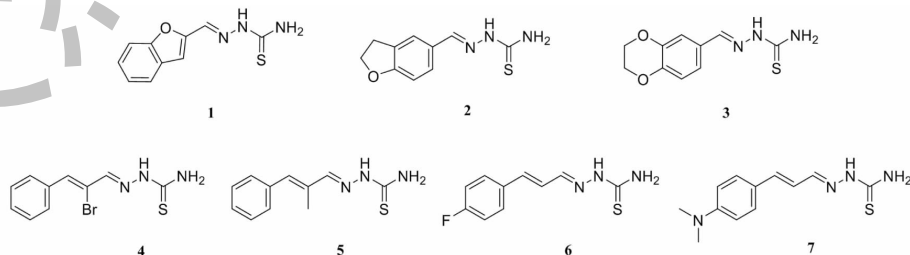


图 2 化合物 1~7 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of compound 1-7

1.6 化合物 1 与 FabH 分子对接

七个化合物中, 以化合物 1 的活性最强, 为了初

步判断化合物 1 的作用靶点, 我们将 PDB 蛋白数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中结核杆菌的 KatG、

FabH、FadD13、pcaA、dapB 等 20 个蛋白进行盲对接,显示化合物 1 与 FabH 的亲合力最高。

为进一步探索化合物 1 与蛋白 FabH(PDB 编号为 2QO1)之间的相互作用,使用 Accelrys 公司的 Discovery Studio 2019 软件进行分子对接,以 Ligands Minimize 功能对分子的三维结构进行能量最小化,得到优势构象配体;以 FabH 的晶体结构作为分子对接的受体。从蛋白质和水分子中去除配体,运用 Receptor-ligand Interactions 模块中的 Dock Ligand (LibDock) 功能进行对接。对接完成后,根据评分结果选取最高打分值,分析配体与 FabH 活性位点关键氨基酸残基的相互作用模式,评价单体与受体之间的相互作用强弱。

1.7 RT-PCR 检测化合物 1 对 *FabH* 基因转录的影响

将结核分枝杆菌加入含不同浓度化合物 1(1、2、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 7H9 培养基中,阴性对照组为不含药的培养物。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 天后离心除去上清液,保留沉淀提取 RNA。引物序列为文献中引物^[20],引物和探针由上海生工生物工程股份有限公司合成。

按 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (B511321)说明书提取总 RNA,用微量分光光度计检测 RNA 浓度。使用逆转录试剂盒从总 RNA 生成 cDNA。为评估不同样本中 mRNA 的表达水平,使用 StepOnePlus[®] Real-Time PCR 仪器进行实时 qRT-PCR。实时 PCR 扩增的结果表示为阈值循环(cycle threshold, C_T)。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法以 16S RNA 作为管家基因计算 mRNA 表达水平的相对倍数差异^[21]。

1.8 化合物 1 的时间-杀菌曲线测定

将菌液加入化合物 1(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 7H9 培养基中后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h。分别在 1、4、16、24、72 h 取样 10 μL ,稀释 100 倍后,取 100 μL 采用平板计数法测定培养菌落数。以时间为横坐标,菌落数为纵坐标绘制时间-杀菌曲线。实验重复 3 次,采用 Origin Pro 2021 软件对实验结果进行统计分析并作图。

1.9 化合物 1 对结核杆菌形态的干预

将结核杆菌分别接入化合物 1(0.5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 7H9 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养 3 天。将培养后的菌液滴在载玻片上,90 $^{\circ}\text{C}$ 加热固定 10 min。根据抗酸染色法,依次使用石碳酸复红溶液、酸-醇(5% HCl 的乙醇溶液)和亚甲蓝进行染色处理。自然风干后使用光学显微镜观察。

1.10 细胞毒性测试

通过体外标准 MTT 试验评估目标化合物对 Vero 细胞的抗增殖活性,异烟肼作为阳性对照。本实验使用 Vero 细胞,以每孔 1.0×10^5 个细胞的密度接种于 96 孔板进行预培养。在用不同浓度的目标化合物处理后,细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中生长 24 h。随后,在每个孔中以 5 mg/mL (在 PBS 中为 5 mg/mL)加入新鲜的 MTT,并将板温育 4 h。将每个孔中的甲臞晶体溶解在 100 μL DMSO 中,并在 540 nm 处进行吸光度测量^[22]。化合物平行测试 3 次并重复两次。

2 实验结果

2.1 鬼箭羽、肉桂提取物的抗结核活性

以松萝酸为导向分子指示鬼箭羽逆向跟踪分离的过程如图 3 所示。鬼箭羽乙醇提取物抑制结核杆菌的 MIC 值为 1 mg/mL ,水提物的 MIC 值大于 1 mg/mL ,可见鬼箭羽抗结核杆菌的活性成分主要存在于乙醇提取物中,检测发现乙醇提取物有松萝酸,而水提物无松萝酸,可见松萝酸可以作为后续跟踪分离的导向分子。

用石油醚和乙酸乙酯对鬼箭羽乙醇提取物进行萃取并检测活性,乙酸乙酯萃取物的 MIC 值为 0.5 mg/mL ,其余部位均大于 1 mg/mL ,检测发现松萝酸主要存在于乙酸乙酯萃取物中。随后将乙酸乙酯萃取物用硅胶柱色谱分离,得到 5 个组分(Fr1 ~ Fr5),以松萝酸做对照,从薄层色谱示意图(图 4)看出,Fr1、Fr4、Fr5 组分不含松萝酸,Fr2、Fr3 含松萝酸。各组活性测试结果为:Fr2、Fr3 的 MIC 值为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,Fr1、Fr4、Fr5 均为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。可见含有松萝酸组分的抑菌活性最强,证实松萝酸是鬼箭羽抗结核杆菌活性最强的分子。

以肉桂醛为导向分子指示肉桂逆向跟踪分离的过程如图 5 所示。肉桂乙醇提取物抑制结核杆菌的 MIC 值为 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$,水提物的 MIC 值大于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,检测发现乙醇提取物有大量肉桂醛,而水提物仅有少量肉桂醛,可见肉桂醛可以作为后续跟踪分离的导向分子。

肉桂乙醇提取物分别用石油醚和乙酸乙酯萃取并进行体外活性测试。石油醚萃取物 MIC 值为 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其余部位均 $\geq 200 \mu\text{g}/\text{mL}$,可见石油醚萃取物是肉桂抗结核杆菌的有效部位。将石油醚萃取物经硅胶柱分离,得到 3 个组分(Fr1 ~ Fr3),从薄层色谱示意图(图 6)看出,Fr1 中含有肉桂醛,Fr2、Fr3

组分中不含肉桂醛。含肉桂醛的 Fr1 组分的 MIC 为 $20 \mu\text{g/mL}$, 不含肉桂醛的 Fr2、Fr3 组分的 $\text{MIC} \geq 80 \mu\text{g/mL}$, 可见肉桂醛是肉桂抗结核杆菌活性最强的分子。

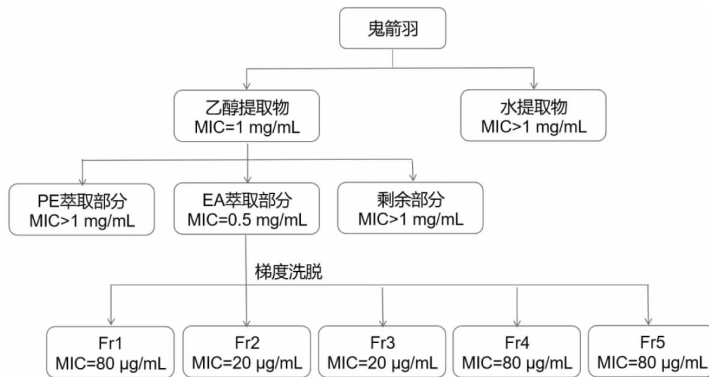


图 3 松萝酸指示鬼箭羽的萃取分离及体外活性测试结果

Fig. 3 Extraction, separation and *in vitro* activity test results of *Caulis Euonymi Alati* indicated by usnic acid

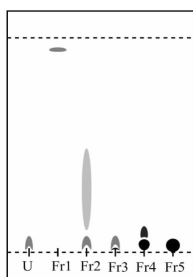
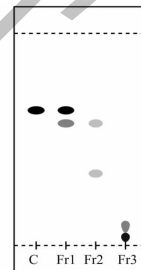


图 4 以松萝酸作指示分子对鬼箭羽乙酸酯部分的 TLC 分析

Fig. 4 TLC analysis of the ethyl acetate fractions of *Caulis Euonymi Alati* with usnic acid as indicator molecule

注:图中 U 为松萝酸对照品。Note: U in the figure is the usnic acid reference substance.



mL。七个合成的化合物中,除化合物 3 外,均具有

图 6 以肉桂醛作指示分子对肉桂石油醚部分的 TLC 分析

Fig. 6 TLC analysis of the petroleum ether fractions of *Cinnamomi Cortex* with cinnamaldehyde as indicator molecule

注:图中 C 为肉桂醛对照品 Note: C in the figure is the cinnamaldehyde reference substance.

表 1 化合物 1~7 的抗结核杆菌活性

Table 1 Anti-mycobacterial activity of compounds 1-7

化合物 Compound	最小抑菌浓度 MIC ($\mu\text{g/mL}$)
氨基硫脲 Thiosemicarbazone	16
苯并呋喃类、肉桂醛类反应原料 Benzofuran and cinnamaldehyde reaction raw materials	>40
松萝酸 Usnic acid	12
肉桂醛 Cinnamaldehyde	8
1	1
2	2
3	>4
4	2
5	2
6	2
7	2
异烟肼 Isoniazid	0.25

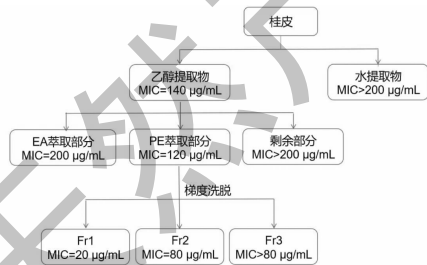


图 5 肉桂醛指示肉桂的萃取分离及体外活性测试结果

Fig. 5 Extraction, separation and *in vitro* activity test results of *Cinnamomi Cortex* indicated by cinnamaldehyde.

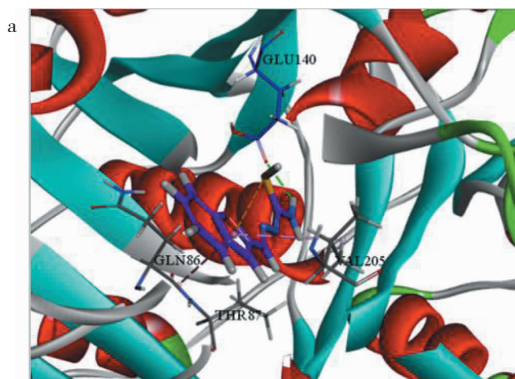
2.2 化合物 1~7 体外抑菌活性实验结果

化合物 1~7 的体外活性测试结果见表 1。反应原料中的氨基硫脲抑制结核杆菌的 MIC 值为 $16 \mu\text{g/mL}$, 其余反应原料的 MIC 值均大于 $40 \mu\text{g/mL}$, 导向分子松萝酸、肉桂醛的 MIC 值分别为 12 、 $8 \mu\text{g/}$

较强的抗结核杆菌活性,其中化合物 **1** 的抗菌作用最强($MIC = 1 \mu\text{g}/\text{mL}$),明显优于导向分子,可见对导向分子进行结构修饰后,其衍生物的活性增强。总体上看,苯并咪唑类与氨基硫脲的衍生物具有进一步做修饰研究的前景。

2.3 分子对接结果

从化合物 **1** 与受体蛋白 FabH 对接后的二维图



如图所示,化合物 **1** 能够与 *FabH* 很好地结合。化合物 **1** 与 *FabH* 的氨基酸残基 GLU140 形成氢键,与 GLN86 形成 Amide- π 相互作用,与 VAL205 形成 π -Alkyl 疏水结合作用(图 7),打分结果为 102.468。这些作用力增加了分子与蛋白的结合,推测受体蛋白 *FabH* 可能是化合物 **1** 的作用靶点。

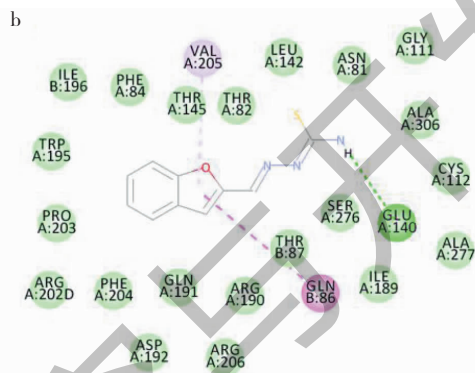


图 7 分子对接结果

Fig. 7 Result of molecular docking

注:7a:化合物 **1** 与 *FabH* 的相互作用三维图;7b:化合物 **1** 与 *FabH* 的相互作用二维图。Note:7a:Three-dimensional image of interactions between compound **1** and *FabH*;7b:Two-dimensional image of interactions between compound **1** and *FabH*.

2.4 基因相对定量结果

如图 8 所示,与阴性对照组相比,化合物 **1** 处理组($1, 2 \mu\text{g}/\text{mL}$)中结核杆菌的 *FabH* 基因表达量显著下调。*FabH* 基因编码 β -酮脂酰-*ACP* 合成酶 III,这是结核杆菌合成长链脂肪酸的关键酶^[23],结核杆菌细胞壁含有大量的分枝菌酸,长链脂肪酸是分枝菌酸的结构主体,抑制 β -酮脂酰-*ACP* 合成酶 III 将导致长链脂肪酸合成受阻,使结核杆菌不能正常形成细胞壁。化合物 **1** 在 $MIC (1 \mu\text{g}/\text{mL})$ 浓度时下调

FabH 基因表达,当化合物 **1** 的浓度达到 $2MIC$ 值($2 \mu\text{g}/\text{mL}$)时,*FabH* 基因表达进一步下调,表明化合物 **1** 能够关闭 β -酮脂酰-*ACP* 合成酶 III 的结构基因。但用 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的化合物 **1** 处理结核杆菌后,*FabH* 的表达量与阴性对照组接近,没有发生显著变化,我们推测化合物 **1** 浓度达到 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对结核杆菌产生了较强的致死性杀灭作用,结核杆菌来不及下调 *FabH* 表达即丧失了基因转录的能力,因此其 *FabH* 的转录水平停留在与阴性对照组的水平上。后面的杀菌曲线实验证实了这一点。

2.5 时间杀菌曲线

用 $4MIC (4 \mu\text{g}/\text{mL})$ 浓度的化合物 **1** 处理结核杆菌,分别在加药后 1、4、16、24 h 后测定结核杆菌活菌数(图 9),作用 4 h 后,活菌数开始下降,16 h 后,活菌数减少大约一半,24 h 后,活菌数保持在较低水平,72 h 后未检测到活菌。可见化合物 **1** 对结核杆菌具有强大的致死性杀灭作用。

2.6 化合物 **1** 对结核杆菌形态学的影响

图 10a 显示的是阴性对照结核杆菌形态,结构完整,形态短小呈棒状、轮廓清晰完整且略微弯曲。图 10b 为使用 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 化合物 **1** 处理后的菌体形态,结核杆菌变得更长更直(红色箭头所示),或者

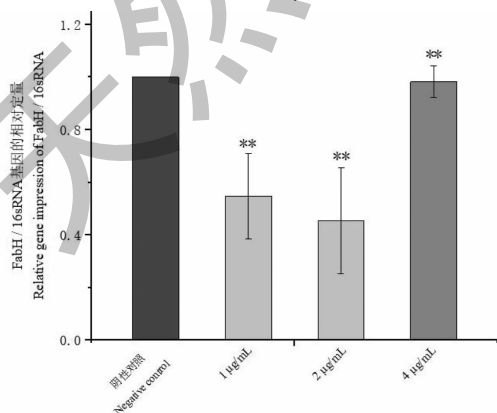


图 8 化合物 **1** 干预后 *FabH* 基因的表达变化

Fig. 8 Expression changes of *FabH* gene after the intervention of the compound **1**

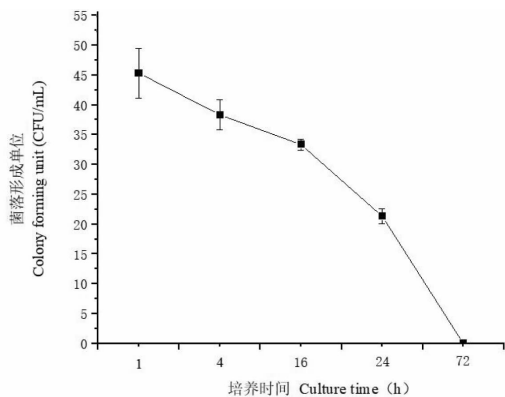


图9 化合物 1 (4 µg/mL) 杀菌曲线

Fig. 9 Time-killing curve of compound 1 (4 µg/mL)

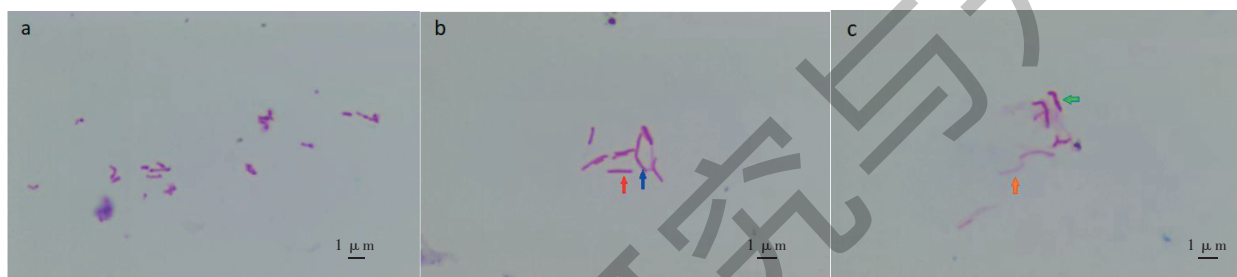


图 10 结核杆菌的形态变化图片

Fig. 10 Morphological changes of Mtb.

注: a: 结核杆菌阴性对照组; b: 使用 0.5 µg/mL 化合物 1 处理后; c: 使用 1 µg/mL 化合物 1 处理后。Note: a: Negative control of Mtb; b: Mtb treated with 0.5 µg/mL of compound 1; c: Mtb treated with 1 µg/mL of compound 1.

研发时,选择指数大于 10 的化合物被认为是安全的,可以进入动物实验程序^[24]。化合物 1 的选择指数远远大于 10,因此判断化合物 1 对哺乳动物细胞无毒。

3 讨论与结论

文献报道,鬼箭羽的松萝酸、肉桂的肉桂醛具有抗结核杆菌活性,那么它们是否分别是这两种药材中最强的抗结核杆菌活性分子呢?这是我们十分关心的问题。在本实验中,我们提出逆向跟踪分离思路,采用松萝酸作为导向分子从鬼箭羽中跟踪分离抗结核杆菌成分,采用肉桂醛作为导向分子从肉桂中跟踪分离抗结核杆菌成分,结果表明鬼箭羽的抗结核杆菌成分中,没有比松萝酸更强的成分存在,而肉桂醛是肉桂中抗结核杆菌活性最强的分子。可见逆向跟踪分离方法,在探索中草药活性成分尤其是抗菌活性成分方面具有节省时间、人力、资金的优势,当然这种方法有赖于强大的天然产物成分数据库作为基础。

对松萝酸、肉桂醛类似物进行结构修饰,得到的衍生物具有更强的抗结核杆菌活性,其中化合物 1

变得更弯曲、更长(蓝色箭头所示)。提高化合物 1 的浓度(1 µg/mL),如图 10c 所示,可见菌体变粗、膨大(绿色箭头所示),有的菌体着色性差(橙色箭头所示),是结核杆菌细胞壁被破坏的标志。实验结果提示,经化合物 1 处理后,结核杆菌的形态发生明显变化,与化合物 1 破坏细胞壁结构有关。

2.7 细胞毒性测试结果

使用 MTT 法评估化合物 1 对哺乳动物细胞的毒性。结果表明,化合物 1 半数中毒量为 84.1 (1.3 µg/mL, MIC = 1 µg/mL)。所以化合物 1 的选择指数(selection index, SI)等于半数中毒量除以最小抑菌浓度为 84。其选择指数虽然低于异烟肼,但在药物

的 MIC 值达到 1 µg/mL,对哺乳动物细胞安全无毒,可作为抗结核杆菌先导物进行下一步的结构优化。

为了探讨化合物 1 可能存在的作用机制,采用盲筛的方法,将化合物 1 与 20 个结核杆菌的蛋白进行分子对接,提示化合物 1 与结核杆菌的 β-酮脂酰-ACP 合成酶 III (FabH) 具有较强的亲和力,于是测定了化合物 1 对结核杆菌 FabH 基因表达的影响,在亚抑菌和抑菌浓度下,结核杆菌 β-酮脂酰-ACP 合成酶 III 的结构基因可被化合物 1 关闭,导致表达下调。β-酮脂酰-ACP 合成酶 III 是结核杆菌合成细胞壁长链脂肪酸的关键酶,一旦被抑制,将使结核杆菌形态发生变化,进一步导致细胞壁结构破坏,引起菌体膨大、崩解。通过显微镜图像,可以看到,结核杆菌被化合物 1 干预后,菌体形态发生明显变化,提示化合物 1 使结核杆菌细胞壁遭到破坏。细胞壁破坏对结核杆菌生命力的影响是致死性的,通过测定杀菌曲线,我们发现,化合物 1 (4 µg/mL) 在 72 h 内杀死了培养体系中的所有结核杆菌。因此,我们推测化合物 1 抗结核杆菌机制与干预 β-酮脂酰-ACP 合成酶 III 有关,由于本实验未能提供化合物 1 与靶点结合

的确切证据,因此化合物 **1** 的作用机制还有待进一步研究。

东汉古籍“肘后备急方”首次提出用鬼箭羽治鬼注、尸注,古代把结核病称为癆、鬼注、尸注等,肉桂也有用于结核治疗的记载,本实验证实鬼箭羽、肉桂具有抗结核杆菌活性,为这两味中药治疗结核病提供了有价值的线索。

参考文献

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2020 [R]. Geneva: World Health Organization, 2020.
- Yang ZC, Deng W, Song SM, et al. Isolation of component with resuscitating activity on dormant *Mycobacterium tuberculosis* from *Fissistigma cavaleriei* and investigation on its mechanism [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 769-779.
- Scarim CB, de Farias RL, de Godoy Netto AV, et al. Recent advances in drug discovery against *Mycobacterium tuberculosis*: Metal-based complexes [J]. Eur. J. Med. Chem, 2021, 214: 113166.
- Brigden G. Manica Balasegaram [J]. Bull World Health Org, 2014, 92: 68-74.
- Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, et al. New anti-tuberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14: 327-340.
- Nguyen-Vo TH, Nguyen L, Do N, et al. Plant metabolite databases: from herbal medicines to modern drug discovery [J]. J Chem Inf Model, 2019, 60: 1101-1110.
- Zhao HB, Wang MZ, Cap QL. Compound *Euonymus alatus* Injection in treating 155 cases of lymphatic tuberculosis [J]. J Changchun Univ Chi Med (长春中医药大学学报), 1987 (3): 28.
- Su RK, Wang JK, Deng LJ. Clinical observation on Chaihu Guizhi Ganjiang Decoction in treatment of pulmonary tuberculosis [J]. Acta Chin Med (中医学报), 2018, 33: 1208-1212.
- Ingólfssdóttir K, Chung GAC, Skúlason VG, et al. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 6(2): 141-144.
- Cocchietto M, Skert N, Nimis P, et al. A review on usnic acid, an interesting natural compound [J]. Naturwissenschaften, 2002, 89(4): 137-146.
- Mota APP, Campelo TA, Frota CC. Evaluation of the antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil and trans-cinnamaldehyde against resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Bioscience J, 2019, 35(1): 296-306.
- Hernández P, Rojas R, Gilman RH, et al. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates [J]. Eur J Med. Chem., 2013, 59: 64-74.
- Ren JF, Meng JZ, Zhao Y, Wang JX. Design, synthesis and anti tuberculosis activity of novel acylhydrazone Schiff bases [J]. Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术), 2017, 12(3): 201-206.
- Maillard LT, Bertout S, Quinonéro O, et al. Synthesis and anti- *Candida* activity of novel 2-hydrazino-1,3-thiazole derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23: 1803-1807.
- Islam M, Khan A, Shehzad M T, et al. Synthesis and characterization of new thiosemicarbazones, as potent urease inhibitors: *In vitro* and *in silico* studies [J]. Bioorg chem, 2019, 87: 155-162.
- Cai P, Xiong Y, Yao Y, et al. Synthesis, screening and biological activity of potent thiosemicarbazone compounds as a tyrosinase inhibitor [J]. New J Chem, 2019, 43: 14102-14111.
- Shahsavani E, Khalaji AD, Feizi N, et al. A low-cost, environment-friendly and solvent-free route for synthesis of AgBr nanoparticles [J]. Superlattices Microst, 2015, 82: 18-25.
- Sroor FM, Khatab T K, Basyouni WM, et al. Synthesis and molecular docking studies of some new thiosemicarbazone derivatives as HCV polymerase inhibitors [J]. Synth Commun, 2019, 49: 1444-1456.
- Hirai T, Shimomura T, Nishikawa Y. Effect of thiosemicarbazones on the multiplication of tobacco mosaic virus [J]. Nature, 1958, 181(4605): 352-353.
- Scarsdale JN, Kazanina G, He X, et al. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 20516-20522.
- Yang R, He Y, Chen S, et al. Elevated expression of WWP2 in human lung adenocarcinoma and its effect on migration and invasion [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 479(2): 146-151.
- Yin W, Zhang Y, Cui HX, et al. Design, synthesis and evaluation of novel 5-phenylthiophene derivatives as potent fungicidal of *Candida albicans* and anti-fungal reagents of fluconazole-resistant fungi [J]. Eur J Med Chem, 2021, 225: 113740.
- Alhamadsheh MM, Musayev F, Komissarov AA, et al. Alkyl-CoA disulfides as inhibitors and mechanistic probes for FabH enzymes [J]. Chem Biol, 2007, 14: 513-524.
- Peña-Morán OA, Villarreal ML, Álvarez-Berber L, et al. Cytotoxicity, post-treatment recovery, and selectivity analysis of naturally occurring podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on breast cancer cell lines [J]. Molecules, 2016, 21(8): 1013.