

· 论著 ·

吩嗪类衍生物的抗真菌活性研究

邱丽娟^a, 巢雯^a, 石安喆^b, 阎澜^b, 吕权真^b, 姜远英^b (海军军医大学: a. 基础医学院, b. 药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究吩嗪类衍生物的抗真菌活性。方法 利用微量液基稀释法考察吩嗪类衍生物的体外抗真菌活性; 利用棋盘式微量稀释法检测吩嗪类衍生物与氟康唑合用对常见临床耐药菌的抗真菌活性; 在菌丝诱导条件下考察吩嗪衍生物对白念珠菌菌丝形成的抑制效果。结果 吩嗪类衍生物单用对临床常见条件致病真菌白念珠菌没有明显抗真菌活性; 吩嗪衍生物-17 与氟康唑合用有显著抗白念珠菌活性; 吩嗪衍生物-17 与氟康唑合用可以明显抑制白念珠菌菌丝生长。结论 筛选获得了与氟康唑合用具有抗真菌活性的吩嗪类衍生物-17, 为抗真菌药物研发和克服真菌耐药提供了新思路。

[关键词] 吩嗪类化合物; 白念珠菌; 抗真菌活性; 菌丝形成

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)03-0249-06

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202103083

Study on the antifungal activity of phenazine derivatives

QIU Lijuan^a, CHAO Wen^a, SHI Anjie^b, YAN Lan^b, LÜ Quanzhen^b, JIANG Yuanying^b (a. School of Basic Medicine, b. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the antifungal activity of phenazines derivatives. **Methods** The anti-fungal activity of phenazine compounds was evaluated initially with micro-liquid dilution. No significant antifungal activity against *Candida albicans* was found. Then, with the combination of phenazine compounds and fluconazole, the anti-fungal activity against fluconazole-resistant *C. albicans* was detected. **Results** The phenazine-17 had significant antifungal activity when combined with fluconazole through the inhibition of hyphae formation. **Conclusion** This study provides a new idea for the development of antifungal drugs and the solution of antifungal drug resistance.

[Key words] phenazine derivatives; *Candida albicans*; antifungal activity; hyphae formation

近年来,随着免疫抑制剂的广泛使用和介入手术的增多,深部真菌感染的发病率逐年上升。同时,手术患者的增加,住院天数的增长,也使得院内真菌感染成为急需解决的问题。在治疗真菌感染过程中长周期的给药方式和真菌耐药问题造成了政府和住院患者的医疗支出大幅增加,新的抗真菌药物或者协同抗真菌药物研究迫在眉睫。为了克服真菌的耐药性问题,本课题组一直致力于研究药物联用协同抗耐药真菌的效果。据统计,真菌感染中最常见菌属是念珠菌,而在念珠菌中白念珠菌的占比又高达 45%~50%,因此,靶向于白念珠菌的药物研究就显得十分重要^[1-6]。2010 年, Morales 等报道了化合物吩嗪硫酸甲酯具有抗白念珠菌被膜

的活性^[7]。为了进一步获得具有更强抗真菌活性的先导化合物,我们筛选了以吩嗪为骨架的 20 余种吩嗪类衍生物,获得了具有协同氟康唑抗真菌活性的化合物吩嗪衍生物-17,本研究为抗耐药真菌联合用药提供了新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

洁净工作台 (HPeafe-1200LC(A2) 上海力申科学仪器有限公司); 振荡培养箱 (HZ-2111K-B 江苏太仓市实验设备厂); 微量加样器 (Biohit); 小型冷冻离心机 (HitachiCT15RE); 蒸汽灭菌锅 (KG-SX500 KAGOSHIMA SELSAKUSYO, Japan); 多功能酶标仪 (TECAN Infinite M200); 倒置相差显微镜 (Amersham Pharmacia AMG EVOS×1); 紫外分光光度计 (Amersham Biosciences Mltrospec10)。

1.2 材料

白念珠菌标准菌株 SC5314 由美国 Georgetown 大学 William A Fonzi 教授赠送,临床分离的耐药

[基金项目] 上海市青年科技英才扬帆计划资助 (19YF1458800)

[作者简介] 邱丽娟, 硕士研究生, 研究方向: 抗真菌药物药理学, Email: 253867468@qq.com

[通信作者] 姜远英, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗真菌药物药理学, Email: 13761571578@163.com; 吕权真, 讲师, 研究方向: 抗真菌药物药理学, Email: lvquanzhen2011@163.com

白念珠菌 103 和 538 来自海军军医大学附属长海医院皮肤科, 氟康唑(FCZ)由辉瑞公司生产, 吩噻类化合物购自 chemdiv 化合物库, 二甲基亚砜(DMSO)购自博光生物试剂有限公司, 酵母提取物、甘露醇、营养肉汤购自 BD 公司, 蛋白胨、葡萄糖、琼脂均购自上海生工生物技术有限公司, RPMI1640 购自 Gibco 公司。

2 实验方法

2.1 吩噻类衍生物体外抗真菌活性与抗菌谱测定

将保存在 SDA 固体培养皿的 SC5314 单克隆菌株转接到 1 ml YEPD 培养基, 30 °C、200 r/min, 培养过夜, 使真菌菌株处于指数生长平台期。①洗菌: 将活化好的菌株转移到 1.5 ml 离心管中, 用无菌 PBS 缓冲液洗 3 次, 再用 1 ml PBS 重悬。②调节浓度: 用 RPMI1640 稀释菌液 100 倍, 使其浓度为 $(1 \sim 5) \times 10^6$ CFU/ml。再用 RPMI1640 稀释 1000 倍, 使菌终浓度 $(1 \sim 5) \times 10^3$ CFU/ml。③制备药敏实验板: 取一块 96 孔板, 第 1 列加入 100 μ l RPMI 1640 液体培养基做空白对照; 第 2 列加 200 μ l 上述菌液, 第 3 ~ 12 列分别加入 100 μ l 上述菌液, 第 2 列加吩噻类衍生物使其终浓度为 64 μ g/ml, 2 ~ 11 列进行倍比稀释, 使得药物终浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g/ml, 每个药都加 2 个复孔(2 行), 以减少实验误差, 铺好药和菌的 96 孔板用封条封闭, 于 30 °C 恒温培养过夜, 用酶标仪在 $\lambda=630$ nm 测吸光度(A)值, 计算 MIC₈₀ 值。

2.2 吩噻类衍生物协同氟康唑的体外抗真菌活性和抗菌谱的研究

菌株活化、洗菌和调菌浓度同前所述, 取一块 96 孔板, 第 1 列加入 100 μ l RPMI1640/YEPD 培养基做空白对照; 第 12 列加入 100 μ l 上述菌液做阳性对照; 剩余菌液加入适量氟康唑, 使得氟康唑终浓度为 2 μ g/ml, 第 2 列加入该配制好的菌液 200 μ l,

第 3 ~ 11 列加入该配制好的菌液 100 μ l, 第 2 列再加入吩噻类衍生物使其终浓度为 64 μ g/ml, 2 ~ 11 列进行倍比稀释, 使得药物终浓度分别为 64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g/ml, 每种药都加 2 个复孔(2 行), 以减少实验误差, 将铺好药和菌的 96 孔板用封条封闭, 于 30 °C 恒温培养过夜, 用酶标仪在 $\lambda=630$ nm 处测 A 值, 计算最低抑菌浓度(MIC₈₀)和协同指数(FICI)。

除了用上述耐药白念珠菌 103 实验外, 再更换菌株为 538, 重复上述实验步骤进行实验。

2.3 吩噻衍生物-17 与氟康唑合用对白念珠菌菌丝形成能力的影响

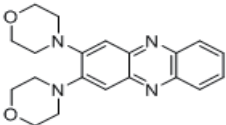
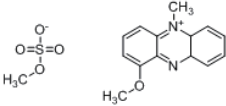
过夜活化的白念珠菌 SC5314 分别用 Spider 培养液和 RPMI1640 培养液稀释 1 000 倍, 分别加药使吩噻衍生物-17 终浓度为 4 μ g/ml、FCZ 的终浓度为 4 μ g/ml 以及吩噻衍生物-17 与 FCZ 的合用(浓度与单药相同), 空白对照加入同体积的 DMSO, 充分混匀, 转移至 12 孔板中, 37 °C, 静置培养 3 h, 倒置显微镜观察菌丝形态。

3 结果与讨论

3.1 吩噻类化合物体外抗真菌活性与抗菌谱的测定

通过对吩噻类 24 种衍生物的体外抗真菌活性研究发现, 吩噻类化合物单用对白念珠菌没有抗真菌活性, 其 MIC₈₀ 均 >128 μ g/ml。在 RPMI1640 培养液中, 采用临床分离的氟康唑耐药白念珠菌 103 和 538(氟康唑单用时, MIC₈₀ >32 μ g/ml), 考察吩噻类化合物协同氟康唑的抗真菌活性。结果显示, 当吩噻类化合物与 2 μ g/ml 的氟康唑合用时, 0.25 ~ 0.5 μ g/ml 的吩噻衍生物-12、0.125 μ g/ml 的吩噻衍生物-17、1 ~ 2 μ g/ml 的吩噻衍生物-18 协同氟康唑后有明显的抗耐药白念珠菌的活性, 结果见表 1。而后我们采用棋盘式微量液基稀释法, 进一步考察了氟康唑和吩噻衍生物-12、吩噻衍生物-

表 1 吩噻类衍生物 (2 μ g/ml) 协同氟康唑对氟康唑耐药白念珠菌 103 MIC₈₀ 值的测定结果

化合物编号	结构	分离株 103 MIC ₈₀ (μ g/ml)	分离株 538 MIC ₈₀ (μ g/ml)
吩噻-1		>16	>16
吩噻-2		8	8

(续表 1)

化合物编号	结构	分离株103MIC ₈₀ (μg/ml)	分离株538MIC ₈₀ (μg/ml)
吩嗪-3		>16	16
吩嗪-4		>16	>16
吩嗪-5		>16	>16
吩嗪-6		8	8
吩嗪-7		>16	>16
吩嗪-8		16	8
吩嗪-9		>16	>16
吩嗪-10		>16	>16
吩嗪-11		16	16
吩嗪-12		0.5	0.25
吩嗪-13		>16	>16

(续表 1)

化合物编号	结构	分离株103MIC ₈₀ (μg/ml)	分离株538MIC ₈₀ (μg/ml)
吩噻-14		>16	>16
吩噻-15		>16	>16
吩噻-16		>16	>16
吩噻-17		0.125	0.125
吩噻-18		2	1
吩噻-19		8	8
吩噻-20		16	8
吩噻-21		16	16
吩噻-22		>16	>16
吩噻-23		>16	>16
吩噻-24		>16	16

17、吩噻衍生物-18 合用时的最低浓度,结果显示吩噻衍生物-17 与氟康唑协同抗白念珠菌效果最强, 0.0625 μg/ml 的吩噻衍生物-17 与 1 μg/ml 的氟

康唑即可完全抑制耐药白念珠菌的生长,协同指数 FICI<0.5, 说明与氟康唑具有明显的协同作用(表 2)。

表 2 吩噻类衍生物与氟康唑单用及合用对氟康唑耐药白念珠菌 538 的 MIC₈₀ 值和 FICI 值的测定结果

化合物编号	单用[MIC ₈₀ (μg/ml)]		合用[MIC ₈₀ (μg/ml)]		FICI	协同方式
	吩噻类衍生物	氟康唑	吩噻类衍生物	氟康唑		
吩噻类衍生物-12	>64	>32	0.25	1.0	0.034	协同
吩噻类衍生物-17	>64	>32	0.0625	1.0	0.032	协同
吩噻类衍生物-18	>64	>32	0.5	2.0	0.070	协同

3.2 吩噻类衍生物-17 与氟康唑合用抑制白念珠菌菌丝形成

为了进一步考察吩噻类衍生物-17 的体外抗菌活性,我们考察了其对菌丝生长的抑制作用。结果

表明,在 RPMI1640 诱导菌丝形成的过程中,吩噻衍生物-17 与氟康唑合用对菌丝的生长抑制不明显,但在 Spider 培养基中,两药合用对菌丝的形成有明显抑制作用(图 1)。

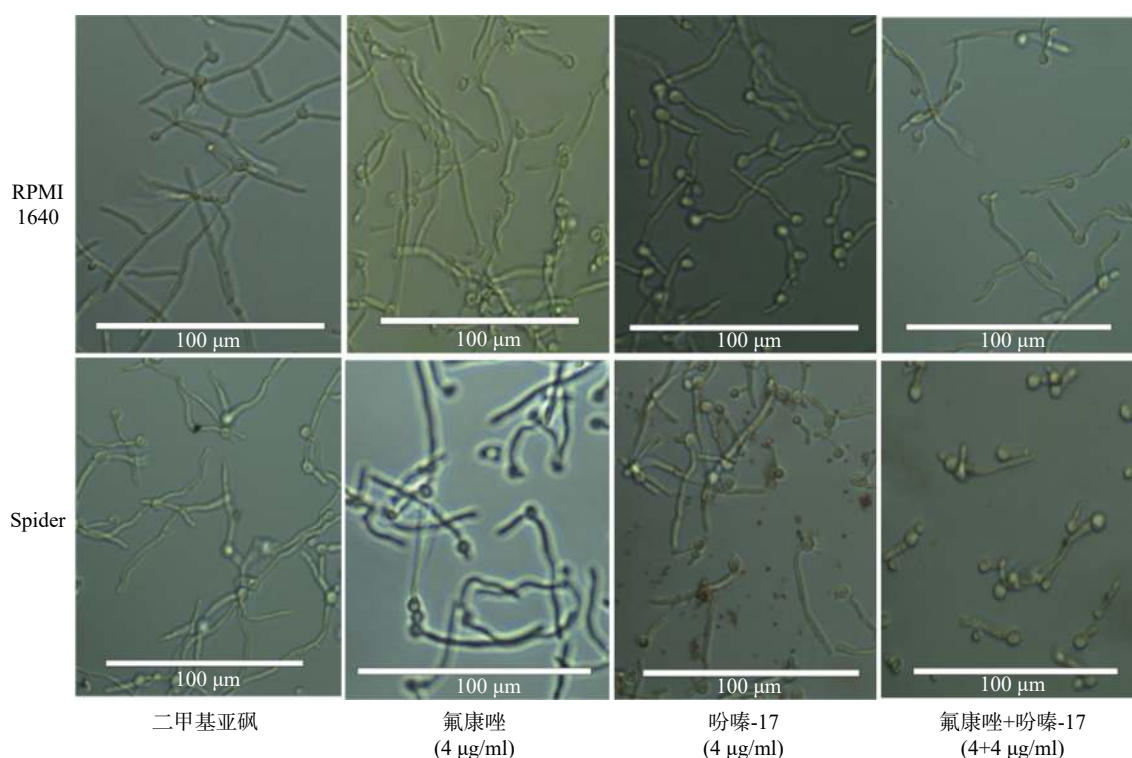


图 1 吩噻类衍生物-17 抑制白念珠菌的菌丝形成

注:白念珠菌在 37 ℃ 的 RPMI 1640 或 Spider 培养基中诱导 3 h,氟康唑和吩噻衍生物-17 加入的浓度均为 4 μg/ml。

4 讨论

近年来,随着免疫抑制剂的广泛用、手术介入和免疫缺陷患者的增多,系统性真菌感染的发病率逐年攀升。但抗真菌药物的研发进展缓慢,现有的几类抗真菌药物在长期使用后也逐渐出现了耐药性。为克服临床真菌感染的问题,研发新的抗真菌药物意义重大。本课题组长期致力于协同抗耐药真菌研究,期望筛选获得具有协同抗耐药真菌活性的化合物,进而达到降低给药剂量,提高抗菌能力的目的,为临床抗真菌治疗提供新的策略。本研究前期通过体外筛选吩噻类化合物的抗真菌活性,发现吩噻类化合物单药使用时没有抗真菌活性,但是

吩噻衍生物-12、-17、-18 与氟康唑合用有显著的协同抗真菌活性,这一研究结果有望为抗真菌药物研发提供新的思路。该研究尚未探讨吩噻类衍生物的协同抗耐药真菌机制,后续仍需进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] 廖万清. 深部真菌感染治疗进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2003, 19(6): 597-600.
- [2] FRIDKIN SK, JARVIS WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections[J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9(4): 499-511.
- [3] PFALLER MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission[J]. Clin Infect Dis, 1996, 22(Suppl 2): S89-S94.
- [4] LEE JS, JUNG WK, JEONG MH, et al. Sanguinarine induces ap-

optosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway[J]. *Int J Toxicol*, 2012, 31(1): 70-77.

- [5] SANDAI D, TABANA YM, OUWEINI AE, et al. Resistance of *Candida albicans* biofilms to drugs and the host immune system[J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2016, 9(11): e37385.
- [6] HARVEY AL, EDRADA ER, QUINN RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era[J]. *Nat*

Rev Drug Discov, 2015, 14(2): 111-129.

- [7] MORALES DK, JACOBS NJ, RAJAMANI S, et al. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 78(6): 1379-1392.

[收稿日期] 2021-03-26 [修回日期] 2021-05-07

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 231 页)

- [18] 徐熠. 茵陈痛风颗粒的质量控制研究及初步药效学评价[D]. 上海: 上海中医药大学, 2011.
- [19] 李墨娇, 刘杰, 张玉波, 等. 伸筋草的化学成分研究[J]. *中草药*, 2015, 46(1): 33-37.
- [20] 刘杰, 李国强, 吴霞, 等. 连钱草的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(4): 695-698.
- [21] 章林平, 孙倩, 王威, 等. 茵陈有效成分的药理作用及其临床应用的研究进展[J]. *抗感染药学*, 2014, 11(1): 28-31.
- [22] WANG X, HUANG H, MA X P, et al. Anti-inflammatory effects and mechanism of the total flavonoids from *Artemisia scoparia* Waldst. et kit. in vitro and in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 390-403.
- [23] 黄敬群, 宋扬, 赵鹏, 等. 槲皮素对急性痛风性关节炎的抗炎、镇痛实验研究[J]. *海峡药学*, 2013, 25(7): 64-67.
- [24] 李荣华. 痛风康对急性痛风性关节炎的抗炎作用及对TLRs/MyD88通路的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [25] 郭璐, 夏道宗, 骆叶姣, 等. 基于网络药理学探讨土茯苓治疗痛风的作用机制[J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1413-1418.

- [26] BAS E, RECIO M C, GINER R M, et al. Anti-inflammatory activity of 5-O-demethylnobiletin, a polymethoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*[J]. *Planta Med*, 2006, 72(2): 136-142.
- [27] SAKATA C, KAWASAKI T, IWATSUKI Y, et al. Inhibitory effects of ASP6537, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, on thrombosis and neointima formation in rats[J]. *Thromb Res*, 2017, 157: 72-78.
- [28] 李艳华. 四妙君逸软膏对肛肠病术后疼痛模型大鼠血清TNF- α 、IL-6和IL-10影响的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [29] 崔允强. 补肾强骨方治疗膝关节骨性关节炎的疗效及对患者血清TNF- α 、IL-6和IL-10的影响[J]. *黑龙江医药*, 2018, 31(4): 831-833.
- [30] KIM J, LIM J, KANG B Y, et al. Capillarisin augments anti-oxidative and anti-inflammatory responses by activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Neurochem Int*, 2017, 105: 11-20.

[收稿日期] 2020-07-02 [修回日期] 2020-09-03

[本文编辑] 李睿旻