

· 论著 ·

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 Rocilinostat 的抗真菌活性研究

朱天宝^{1,2}, 涂杰², 盛春泉², 徐德锋¹, 刘娜² (1. 常州大学药学院, 江苏常州 213164; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

【摘要】目的 探索组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂与唑类药物联用对唑类耐药念珠菌的体外协同的抗真菌活性。**方法** 根据棋盘稀释法, 测试 HDAC 抑制剂和唑类药物联用对临床耐药株的协同抗真菌活性, 通过时间-生长曲线实验和细胞毒性实验对化合物 Rocilinostat 的抑菌效果、毒性进行考察。**结果** 化合物 Rocilinostat 与唑类药物联用对多种耐药白念珠菌和光滑念珠菌均表现出优秀的协同抗真菌活性, 并且其在高浓度下与氟康唑联用表现出抑菌效果。此外, 化合物 Rocilinostat 对正常细胞表现出低毒性, 且对白念珠菌 HDAC 具有强烈的抑制活性, 优于对照药伏立诺他。**结论** 化合物 Rocilinostat 作为真菌 HDAC 抑制剂, 具有优秀的体外协同抗真菌活性, 且对真菌细胞具有较好的选择性作用。

【关键词】 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 体外协同抗真菌活性; 耐药; 白念珠菌

【中图分类号】 R978.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2022)01-0044-04

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202103008

Antifungal activity study on HDAC inhibitor Rocilinostat

ZHU Tianbao^{1,2}, TU Jie², SHENG Chunquan², XU Defeng¹, LIU Na² (1. School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】Objective To evaluate the in vitro synergistic antifungal activity of HDAC inhibitors in combination with azole drugs against azoles-resistant *Candida* strains. **Methods** The checkerboard microdilution method was used to evaluate the antifungal activity of the HDAC inhibitors in combination with azole drugs against clinically drug-resistant strains. The fungistatic activity and toxicity of Rocilinostat was determined through time-growth curve assay and cytotoxicity assay. **Results** The compound Rocilinostat combined with azole drugs showed excellent synergistic antifungal activity against a variety of azoles-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. The combination of high concentration Rocilinostat with FLC exhibited fungistatic effects. Very low toxicity was detected with Rocilinostat towards normal cells. Rocilinostat showed better HDAC inhibitory activity than SAHA. **Conclusion** As a fungi HDAC inhibitor, Rocilinostat has excellent in vitro synergistic antifungal activity and no severe toxicity to normal human cells.

【Key words】 HDAC inhibitors; in vitro synergistic antifungal activity; resistant; *Candida albicans*

近年来, 随着肿瘤、器官移植和获得性免疫缺陷综合征(AIDS)等导致的免疫功能低下人群的增加, 侵袭性真菌感染(IFIs)的发病率和病死率逐年上升^[1-2]。念珠菌、隐球菌和曲霉菌是 IFIs 最主要的致病菌, 并且造成的病死率超过 90%^[3]。在念珠菌属中, 白念珠菌(*Candida. albicans*)是院内血液感染最常见的致病菌原体, 其在重症监护病房(ICU)患者中致病率超过 17%, 病死率高达 40%^[4-5]。临床上治疗 IFIs 的抗真菌药物主要包括: 多烯类

(两性霉素 B)、核酸类(5-氟胞嘧啶)、唑类(氟康唑)和棘白菌素类(卡泊芬净)药物(图 1)^[6-7]。然而, 由于临床上出现抗真菌药物严重的耐药性和毒副作用, IFIs 的治疗效果相当有限。因此, 迫切需要研发全新机制的抗真菌药物。

组蛋白乙酰化修饰(包括组蛋白乙酰化和去乙酰化)是表观遗传学研究的重要组成部分。组蛋白去乙酰化酶(HDACs)将组蛋白和其他蛋白上的赖氨酸末端乙酰基去除, 对染色体重塑和基因的表达起着重要作用^[8-9]。目前 HDAC 抑制剂主要集中于抗肿瘤研究方向, 且已有多个上市药物应用于肿瘤的治疗。据研究报道, 真菌中的 HDACs, 如烟曲霉^[10]、白念珠菌^[11-12]、酿酒酵母^[13]和新生隐球菌的 HDACs^[14-15]参与了毒力相关的过程和形态变化。因此, 抑制真菌 HDACs 可能是治疗 IFIs 的有效策略。

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81973175)

【作者简介】 朱天宝, 硕士研究生, Tel: 17851073531, Email: 1005623486@qq.com

【通信作者】 徐德锋, 教授, 研究方向: 新药研发, Tel: (0519) 85281008, Email: markxu@cczu.edu.cn; 刘娜, 副教授, 研究方向: 抗真菌药物研究, Tel: (021)81871230, Email: liuna66@aliyun.com

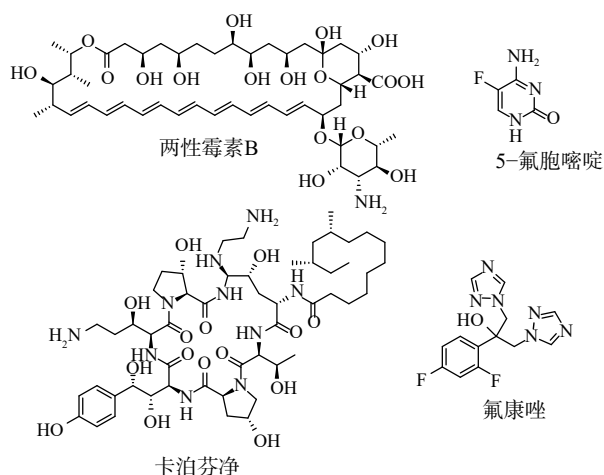


图 1 临床上治疗 IFIs 的抗真菌药物

联合药物治疗是提高临床一线药物疗效并克服真菌耐药性的有效策略之一。真菌的耐药性涉及转录调节,其中染色体重塑和组蛋白修饰起主要作用。HDACs 调节的组蛋白修饰在应激信号通路中起着至关重要的作用,这可能与真菌对各种环境(包括药物)的应激反应有关^[16]。此外,已有研究报道,HDAC 抑制剂与唑类药物联用具有协同增效作用^[17-18]。例如,HDAC 抑制剂 MGCD290 与氟康唑联用具有协同抗多种临床真菌分离株的作用^[19]。

基于此,本研究首先对 8 个市售的 HDAC 抑制剂(图 2)进行体外协同抗真菌活性测试,筛选结果显示化合物 Rocilinostat 与氟康唑联用具有优秀的体外协同抗耐药白念珠菌活性。后续考察其与不同唑类药物联用时对不同念珠菌属的体外协同抗真菌活性,以及对正常细胞的毒性作用,以期为抗真菌药物的研发提供依据。

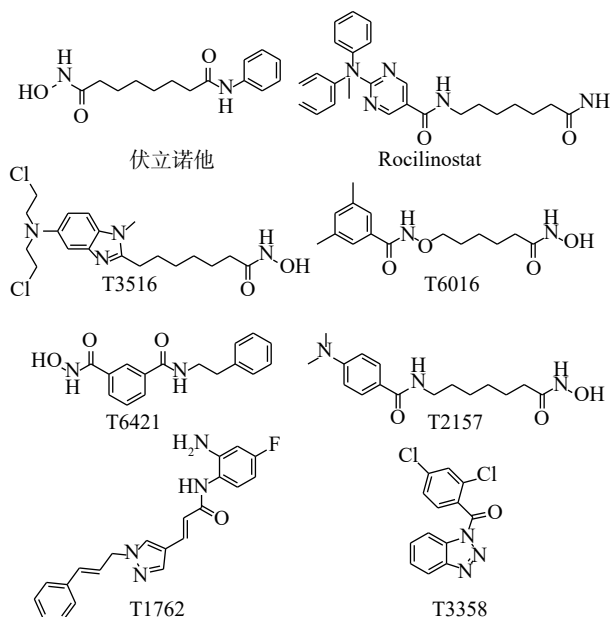


图 2 HDAC 抑制剂的化学结构

1 材料和方法

1.1 实验试剂与菌株

临床分离的 6 株唑类耐药白念珠菌(编号: 9893, 10061, 10060, 9173, 4108 和 0304103), 2 株唑类耐药热带念珠菌(编号: 5008, 10086), 1 株光滑念珠菌(编号: 9073)和 1 株耳道念珠菌(编号: 0029)由海军军医大学附属长征医院提供。菌株活化首先从 -80°C 中挑取菌株冻存液至 YEPD 液体培养基活化 24 h,然后取 $10\ \mu\text{l}$ 菌悬液至 1 ml YEPD 中,并在 30°C 、 $200\ \text{r/min}$ 下培养 16 h 后待用。HUVEC 细胞来源于中国科学院上海细胞库,并在新鲜配置的 DMEM 完全培养基中培养。

YEPD 液体培养基:取 10 g 酵母浸膏、20 g 葡萄糖、20 g 蛋白胨溶解于 1 000 ml 三蒸水中,经高压蒸汽灭菌(121°C , 15 min)后,保存于 4°C 条件下备用。RPMI 1640 培养基:取 10 g RPMI 1640 (Gibco)粉末、34.5 g 吗啡啉丙磺酸、2 g NaHCO_3 、2.7 g NaOH 溶解于 1 000 ml 三蒸水中,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤与灭菌后,置于 4°C 条件下保存和备用。DMEM 完全培养基:按照 89% DMEM 基础培养基+10% 胎牛血清+1% 的双抗比例混匀制得,混匀后置于 4°C 条件下保存和备用。PBS 缓冲液:10 × PBS 100 ml 溶解于 900 ml 三蒸水中,经高压蒸汽灭菌(121°C , 15 min)后,置于 4°C 条件下保存和备用。

1.2 仪器

THZ-92A 气浴恒温振荡器(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)、MJ-150-I 霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、LW100T 生物显微镜(北京测维光电技术有限公司)、HDC-15K 高速离心机(上海泰坦科技股份有限公司)、C170 二氧化碳培养箱(BINDER GmbH)、infinite M200 多功能酶标仪(Tecan Austria GmbH)、高压蒸汽灭菌锅、无菌洁净工作台。

1.3 棋盘式微量液基稀释法

本实验参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)公布的 M27-A3 方案中微量液基稀释法进行。首先,收集活化好的真菌细胞,PBS 洗 3 次后用 RPMI 1640 培养基制成浓度为 $1 \times 10^3\ \text{CFU/ml}$ 的菌悬液。按照每孔 $100\ \mu\text{l}$ 接种菌悬液至无菌 96 孔板中,1~9 列加入倍半稀释的 HDAC 抑制剂,A~F 行加入倍半稀释的氟康唑,其中 G 行只加氟康唑,第 10 列只加化合物,第 11 列为不加药的阴性对照组,后将 96 孔板置于 35°C 条件下孵育 48 h。测定每孔在 630 nm 处的吸光度 A,依据

公式: 抑制率(%)=($A_{\text{阳性对照孔}}-A_{\text{化合物孔}}$)/($A_{\text{阳性对照孔}}-A_{\text{阴性对照孔}}$) $\times 100\%$, 计算各孔对应的抑制率。如果某一孔和其左边孔对应的抑制率均大于 80%, 则该孔对应的化合物和 FLC 浓度分别作为 $FIC_{\text{化合物}}$ 和 $FIC_{\text{氟康唑}}$, 利用协同指数公式: $FICI=(FIC_{\text{化合物}}/MIC_{80 \text{ 化合物}})+(FIC_{\text{氟康唑}}/MIC_{80 \text{ 氟康唑}})$, 计算各化合物对应的 FICI。

1.4 时间-生长曲线实验

收集活化好的白念珠菌 0304103 稀释在 RPMI 1640 培养液中, 保持菌浓度为 1×10^5 CFU/ml。取 5 ml 稀释的菌悬液和不同浓度的待测药物加入 50 ml 的离心管中, DMSO 组作为空白对照组和 32 $\mu\text{g/ml}$ FLC 作为阳性对照。随后将 50 ml 的离心管置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养(200 r/min), 在多个时间点吸取不同药物组的真菌混悬液(100 μl)于 96 孔板上, 测量 A_{630} 值并使用 GraphPad Prism 7 作图。

1.5 真菌细胞总 HDAC 酶活性测试实验

收集指数生长期的白念珠菌 0304103 细胞(湿重为 100 mg), 然后用 3 mg snailase、12 μl 2-巯基乙醇和 3 ml snailase 反应缓冲液等新鲜配置的真菌裂解液来处理它们, 以制备真菌原生质体。真菌原生质体分散在 PBS(20 ml)中以获得混悬液, 然后往 96 孔板每孔中加入 100 μl 的混悬液和不同浓度的化合物 Rocilinostat, 并在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下培育 12 h。接着往每个孔中加入 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 HDAC 底物, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 6 h。随后添加 100 μl HDAC 酶促终止溶液并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。最后, 在每个孔中取出 100 μl 培养物添加到黑板中, 用 $E_x=360 \text{ nm}$, $E_m=460 \text{ nm}$ 来监测荧光强度并记录下来用于计算 HDAC 酶的抑制率。

2 结果

2.1 化合物 Rocilinostat 与氟康唑联用具有协同抗真菌活性

表 1 列出了 HDAC 抑制剂单独使用或与氟康唑联合使用的体外抗真菌活性筛选结果。 MIC_{80} 为抑制 80% 真菌细胞生长的最低药物浓度。实验结果表明, 8 个 HDAC 抑制剂单独使用对耐药白念珠菌均无直接的抗真菌活性($MIC_{80}>64 \mu\text{g/ml}$); 而化合物 Rocilinostat($FICI=0.039$)和伏立诺他($FICI=0.125$)与 FLC 联用时均表现出良好的协同抗真菌活性。其中, 化合物 Rocilinostat 的协同活性最佳, 值得进一步研究。

2.2 Rocilinostat 与氟康唑或伏立康唑联用对多种白念珠菌的抗真菌活性

为进一步考察 Rocilinostat 是否具广谱的抗真

表 1 单用 HDAC 抑制剂或者与氟康唑联用对白念珠菌 0304103 的体外抗真菌活性 ($\mu\text{g/ml}$)

抑制剂	抑制剂		氟康唑		FICI
	单用	联用	单用	联用	
伏立诺他	>64	4	>64	4	0.125
Rocilinostat	>64	2	>64	0.5	0.039
T3516	>64	64	>64	64	2
T6016	>64	64	>64	64	2
T6421	>64	32	>64	32	1
T2157	>64	32	>64	32	1
T1726	>64	64	>64	64	2
T3358	>64	32	>64	64	1.5

注: $FICI\leq 0.5$ 表示协同, $FICI> 4$ 表示拮抗; $0.5<FICI<4$ 表示不相关。

菌作用, 挑选 9 株临床分离的念珠菌属菌株进行协同抗真菌活性测试。如表 2 所示, Rocilinostat 与 FLC 联合使用时, 对两株耐 FLC 的白念珠菌(*C. albicans* 9173, $FICI=0.094$; *C. albicans* 4108, $FICI=0.5$)和对 FLC 敏感的光滑念珠菌(*C. glabrata* 9073)表现出协同增效作用, 而对热带念珠菌(*C. tropicalis*)和耳道念珠菌(*C. auris*)没有协同抗真菌活性。当 Rocilinostat 与伏立康唑(VRC)联用时, 对耐 VRC 的白念珠菌(*C. albicans* 10060, $FICI=0.033$)表现出优异的协同抗真菌活性(表 3)。

表 2 Rocilinostat 与氟康唑单用或联用对多种念珠菌菌株的体外抗真菌活性 [MIC_{80} ($\mu\text{g/ml}$)]

菌株	单用		联用		FICI
	Rocilinostat	氟康唑	Rocilinostat	氟康唑	
9893	>64	>64	64	64	2
10061	>64	>64	64	64	2
10060	>64	>64	64	64	2
9173	>64	>64	4	2	0.094
4108	>64	>64	32	32	0.5
10186	>64	>64	64	64	2
5008	>64	>64	64	8	1.125
9073	32	4	32	8	0.375
0029	64	32	>64	32	1

2.3 Rocilinostat 与氟康唑联用有效抑制真菌的生长

为进一步考察化合物 Rocilinostat 的协同抗真菌活性, 我们又开展了时间-生长曲线实验。从图 3 结果可以看出, 高浓度的氟康唑或 Rocilinostat 单独使用对真菌生长无抑制作用, 而 Rocilinostat 与不

表 3 Rocilinostat 与伏立康唑单用或联用对白念珠菌菌株的体外抗真菌活性 [MIC_{80} ($\mu g/ml$)]

菌株	单用		联用		FICI
	Rocilinostat	伏立康唑	Rocilinostat	伏立康唑	
0304103	>64	>64	32	2	0.531
10061	>64	>64	32	0.125	0.502
10060	>64	>64	2	0.125	0.033

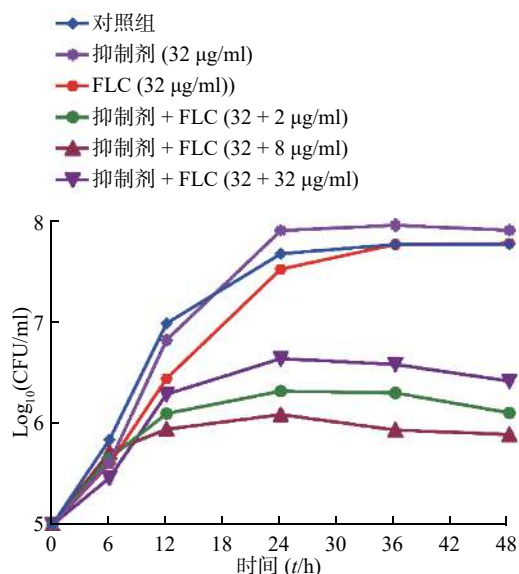


图 3 化合物 Rocilinostat 和氟康唑联用对白念珠菌的生长抑制作用

同浓度的氟康唑联用能够有效抑制真菌的生长,且呈浓度依赖趋势(图 3 中抑制剂为 Rocilinostat)。

2.4 Rocilinostat 对真菌细胞的选择性作用

采用 HUVEC(人脐静脉内皮细胞)对化合物 Rocilinostat 进行细胞毒性的评价。结果如表 4 显示,化合物 Rocilinostat 对正常细胞表现出低毒性, IC_{50} 值为 $52.17 \mu mol/L$ ($22.60 \mu g/ml$), 相当于其发挥协同抗耐药真菌 (*C. albicans* 0304103) 活性 MIC_{80} 值的 44 倍, 表明 Rocilinostat 对真菌细胞具有较强的选择性作用。此外, 我们还测试了化合物 Rocilinostat 对真菌总 HDAC 酶的抑制活性, 结果表明, Rocilinostat 对真菌 HDAC 酶抑制活性 ($IC_{50}=0.41 \mu mol/L$) 优于泛 HDAC 抑制剂伏立诺他 ($IC_{50}=1.03 \mu mol/L$)。

表 4 Rocilinostat 对正常细胞的毒性和真菌总 HDAC 酶活性 IC_{50} ($\mu mol/L$)

化合物	HUVEC	白念珠菌(总HDAC酶)
Rocilinostat	52.17	0.41
伏立诺他	—	1.03

注: “—”表示没有测试。

3 讨论

本研究从市售的 8 个 HDAC 抑制剂中筛选出协同活性最佳的化合物 Rocilinostat。进一步研究发现 Rocilinostat 与氟康唑联用对白念珠菌和光滑念珠菌具有协同增效作用。此外, 化合物 Rocilinostat 与伏立康唑联用对临床分离的耐药白念珠菌株同样具有优秀的抗真菌活性。更值得关注的是, 化合物 Rocilinostat 对正常细胞表现出低毒性, 其对真菌细胞具有很好的选择性。因此, HDAC 抑制剂 Rocilinostat 可以作为一种低毒、有效的唑类抗真菌药物增效剂, 为抗真菌药物的发展提供了新的研究基础。

【参考文献】

- [1] FISHER M C, HAWKINS N J, SANGLARD D, et al. World-wide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security[J]. *Science*, 2018, 360(6390): 739-742.
- [2] BROWN G D, DENNING D W, LEVITZ S M. Tackling human fungal infections[J]. *Science*, 2012, 336(6082): 647.
- [3] PFALLER M A, DIEKEMA D J. Epidemiology of invasive mycoses in North America[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2010, 36(1): 1-53.
- [4] PFALLER M A, DIEKEMA D J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1): 133-163.
- [5] WISPLINGHOFF H, BISCHOFF T, TALLENT S M, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study[J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 39(3): 309-317.
- [6] ODDS F C. Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs[J]. *Rev Iberoam Micol*, 2005, 22(4): 229-237.
- [7] ODDS F C, BROWN A J P, GOW N A R. Antifungal agents: mechanisms of action[J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11(6): 272-279.
- [8] KIM J, LEE J E, LEE J S. Histone deacetylase-mediated morphological transition in *Candida albicans*[J]. *J Microbiol*, 2015, 53(12): 805-811.
- [9] CUI L, MIAO J, FURUYA T, et al. Histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene expression during in vitro *Plasmodium falciparum* development[J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(7): 1200-1210.
- [10] LEE I, OH J H, SHWAB E K, et al. HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production[J]. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46(10): 782-790.
- [11] LOHSE M B, JOHNSON A D. Temporal anatomy of an epigenetic switch in cell programming: the white-opaque transition of *C. albicans*[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 78(2): 331-343.

(下转第 65 页)

- [2] MEHTA P, BHAYANI D. Impact of space environment on stability of medicines: challenges and prospects[J]. *J Pharm Bio-med Anal*, 2017, 136: 111-119.
- [3] HODKINSON P D, ANDERTON R A, POSSELT B N, et al. An overview of space medicine[J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(suppl_1): i143-i153.
- [4] SCATTON B, CLAUSTRE Y, CUDENNEC A, et al. Amisulpride: from animal pharmacology to therapeutic action[J]. *Int Clin Psychopharmacol*, 1997, 12(Suppl 2): S29-S36.
- [5] DEPOORTERE H, ZIVKOVIC B, LLOYD K G, et al. Zolpidem, a novel nonbenzodiazepine hypnotic. I. Neuropharmacological and behavioral effects[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986, 237(2): 649-658.
- [6] CHANCELLOR J C, SCOTT G B I, SUTTON J P. Space radiation: the number one risk to astronaut health beyond low earth orbit[J]. *Life (Basel)*, 2014, 4(3): 491-510.
- [7] 中华人民共和国卫生部. ^{60}Co 辐照中药灭菌剂量标准(卫药发[1997]第38号文件)[S]. 1997.
- [8] United States Pharmacopeial Convention Inc[S] New York: The United States Pharmacopeial Convention Press, 2019: 292.
- [9] 王亚洁, 孟祥军, 李娜然, 等. 分光光度法测定酒石酸唑吡坦片剂含量[J]. *沈阳医学院学报*, 2001, 3(4): 225-227.
- [10] 韩忠丽, 方克忠, 朱姚亮. HPLC法测定酒石酸唑吡坦口腔崩解片的含量[J]. *齐鲁药事*, 2009, 28(2): 86-87.
- [11] 封宇飞, 雷静, 刘志鹤, 等. 毛细管区带电泳法测定酒石酸唑吡坦片的含量及降解产物[J]. *中国医院药学杂志*, 2003, 23(2): 75-77.
- [12] 王守箐. 内标HPLC法测定酒石酸唑吡坦及其片剂的含量[J]. *化学工程师*, 2005, 19(7): 19-20.
- [13] INABA K, OIE T, OTAKE H, et al. Evaluation of dissolution profile between original and generic products of zolpidem tartrate by microdialysis-HPLC[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2019, 67(2): 120-124.
- [收稿日期] 2021-10-11 [修回日期] 2022-01-04
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 47 页)

- [12] HNISZ D, SCHWARZMÜLLER T, KUCHLER K. Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*[J]. *Mol Microbiol*, 2009, 74(1): 1-15.
- [13] ROBBINS N, LEACH M D, COWEN L E. Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(4): 878-888.
- [14] LIU O W, CHUN C D, CHOW E D, et al. Systematic genetic analysis of virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*[J]. *Cell*, 2008, 135(1): 174-188.
- [15] DUMESIC P A, HOMER C M, MORESCO J J, et al. Product binding enforces the genomic specificity of a yeast polycomb repressive complex[J]. *Cell*, 2015, 160(1-2): 204-218.
- [16] 黄海, 王彦, 李莹, 等. 白念珠菌的应激反应与耐药性[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(11): 1239-1243.
- [17] KMETZSCH L. Histone deacetylases: Targets for antifungal drug development[J]. *Virulence*, 2015, 6(6): 535-536.
- [18] SU S, LI X Y, YANG X M, et al. Histone acetylation/deacetylation in *Candida albicans* and their potential as antifungal targets[J]. *Futur Microbiol*, 2020, 15(11): 1075-1090.
- [19] PFALLER M A, MESSER S A, GEORGOPAPADAKOU N, et al. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12): 3797-3804.
- [收稿日期] 2021-03-09 [修回日期] 2021-05-31
[本文编辑] 李睿旻