

## 研究论文

# 苯噻唑力复霉素作用机理的初步研究

徐克意\* 王浴生

(四川医学院药理学教研室, 成都)

**提要** 本文报告苯噻唑力复霉素对细菌生物大分子合成及超微结构的影响。该药可明显抑制<sup>3</sup>H-尿嘧啶核苷掺入金黄色葡萄球菌 209 p 和大肠杆菌 2281 的 RNA; 对<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入细菌蛋白质仅有轻微抑制; 对<sup>3</sup>H-胸嘧啶核苷掺入细菌 DNA 无抑制作用。说明其作用机理主要是抑制细菌 RNA 合成。掺入试验还表明金黄色葡萄球菌对苯噻唑力复霉素有比大肠杆菌更高的敏感性。10 倍于 MIC 浓度的苯噻唑力复霉素能使上述两种细菌超微结构明显改变。胞质失去完整结构, 出现空泡, 核糖体消失, 但胞壁仍保存。

**关键词** 苯噻唑力复霉素; 金黄色葡萄球菌 209 p; 大肠杆菌 2281; RNA 合成; 超微结构

苯噻唑力复霉素是一种新的力复霉素衍生物, 化学名为 3-(3-甲基苯噻唑亚胺-亚胺甲基)力复霉素 SV, 化学结构与利福平相似(见图 1)。

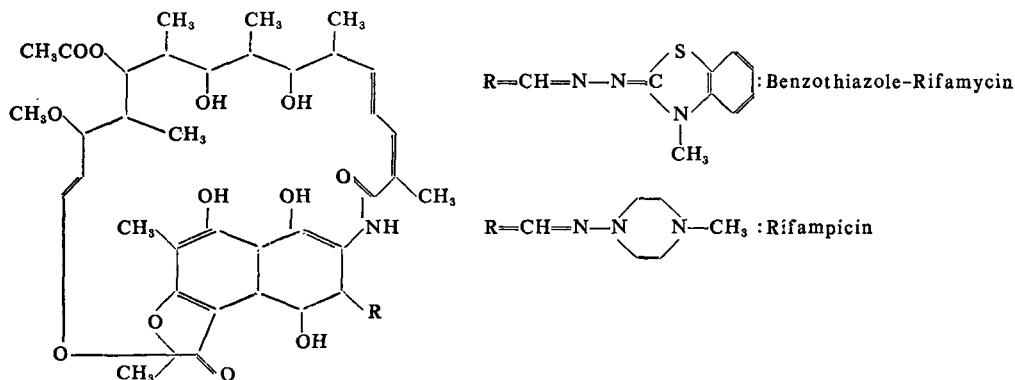


Fig 1. Structures of benzothiazole-rifamycin and rifampicin

对苯噻唑力复霉素的药理与毒性等已有较系统的研究<sup>(1)</sup>。体外试验表明, 该药对金黄色葡萄球菌、结核杆菌有高效, 对常用抗生素和其它力复霉素耐药的金色葡萄球菌的活性比利福平强 30 倍左右。付晓沧等<sup>(2)</sup>的研究表明, 苯噻唑力复霉素对分枝杆菌的活性比利福平高 10 倍。该药试用于临床治疗结核和麻风已获得很好疗效。此外, 该药毒性小, 生产工艺基本成熟。作为我国创新的药, 关于它作用机理的研究还无报导。本文报告苯噻唑力复霉素对金黄色葡萄球菌 209 P 和大肠杆菌 2281 生物大分子合成及超微结构的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1. 主要药品及试剂 苯噻唑力复霉素 四川抗菌素工业研究所提供; [<sup>3</sup>H]-尿嘧啶核苷

本文于 1983 年 10 月 31 日收到

\* 现工作单位 上海第二军医大学

(27 ci/mM)、 $[^3\text{H}]$ -胸嘧啶核苷(37 ci/mM)、 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸(125 ci/mM) 北京原子能研究所; 2,5-二苯基噁唑(PPO) 上海试剂一厂; 1,4-双(5-苯基噁唑基-2)-苯(POPOP) 上海试剂总厂; 乙二醇乙醚化学纯, 北京化工厂; 三氯醋酸 分析纯, 上海试剂厂。

**2. 细菌和生长条件** 金色葡萄球菌 209 p, 世界卫生组织提供的标准菌株; 大肠杆菌 2281, 四川生物制品研究所提供。两菌均用普通营养肉汤(1%蛋白胨, 1%牛肉膏, 0.5% NaCl, pH7.4)培养。苯噻唑力复霉素对金色葡萄球菌 209 p 的 MIC 为  $0.05 \mu\text{g/ml}$ , 苯噻唑力复霉素对大肠杆菌 2281 的 MIC 为  $100 \mu\text{g/ml}$ 。

**3. 放射性前体掺入细菌的测定**<sup>(3,4)</sup> 细菌培养到对数生长期后加入同位素前体, 继续在  $37^\circ\text{C}$  培养。按规定时间取菌液 1 ml (双份) 与 2 ml 10% 三氯醋酸混合中止反应。负压下用国产玻纤滤纸抽滤收集菌体。然后用生理盐水、无水乙醇及 5% 三氯醋酸依次冲洗、脱色、固定。将滤纸片置  $60^\circ\text{C}$  烘箱干燥后放入闪烁杯中测其放射性。

**4. 电镜标本的制作**<sup>(5)</sup> 对数生长期菌液加入苯噻唑力复霉素培养 4 h 后, 用 3000 r/min 离心 15 min。菌块用无菌肉汤冲洗 2 次并立即用 2% 多聚甲醛—2.5% 戊二醛混合液作预固定 24 h。然后, 用 1% 四氧化锇作后固定。经 50%, 75%, 90%, 100% 的丙酮逐级脱水后, 用环氧树脂包埋, 制备超薄切片。切片用醋酸铀、枸橼酸铅染色。最后, 在日本 JEM-7 型电镜下观察、拍照。

## 实验及结果

### (一) 苯噻唑力复霉素对细菌大分子合成的影响

**1. 苯噻唑力复霉素对  $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷、 $[^3\text{H}]$ -胸嘧啶核苷、 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸 掺入金色葡萄球菌 209 P 的影响** 取无菌试管 6 支, 分为 3 组, 每组 2 支。于各管中均加入对数生长期的金色葡萄球菌 209 P 菌液 9.9 ml。然后于每组甲管中加入 0.1 ml 苯噻唑力复霉素 (溶于 DMF), 使最终药物浓度为  $0.5 \mu\text{g/ml}$ , 乙管加 0.1 ml DMF 作对照。同时, 于 3 组试管中分别加入 3 种不同的同位素前体, 前体最终浓度均为  $1 \mu\text{Ci/ml}$ 。震荡混匀后, 继续在  $37^\circ\text{C}$  培养。按规定时间取样 (每次 1 ml, 双份) 测定放射性。实验重复 3 次, 结果如图 2。

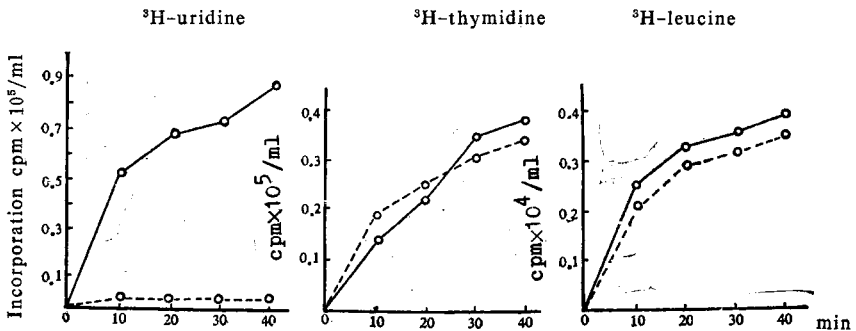


Fig 2. Effect of benzothiazole-rifamycin on incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine,  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -leucine in *S. aureus* 209P

- Without benzothiazole-rifamycin
- With benzothiazole-rifamycin  $0.5 \mu\text{g/ml}$

从图 2 可见, 苯噻唑力复霉素在  $0.5 \mu\text{g/ml}$  时, 迅速而显著地抑制  $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷掺入金色葡萄球菌 209 P; 而对  $[^3\text{H}]$ -亮氨酸掺入的抑制作用较慢而弱; 对  $[^3\text{H}]$ -胸嘧啶核苷的掺入无明显抑制作用。

## 2. 不同浓度的苯噻唑力复霉素对 $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷掺入金色葡萄球菌 209 P 的影响

取对数生长期金葡菌 209 P 加入 4 支无菌试管, 每管 9.9 ml。第一管加 0.1 ml DMF 作对照, 第 2, 3, 4 管分别加入 0.1 ml 不同浓度的苯噻唑力复霉素, 使药物最终浓度分别为 0.005, 0.05, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。同时于各管均加入 $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷 10  $\mu\text{Ci}$ 。震荡混匀后继续在 37°C 培养。按规定时间取菌液 1 ml (双份) 测其放射性。试验进行 3 次, 结果如图 3。

从上图可见,  $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷迅速掺入对照管的金色葡萄球菌 209 P。当苯噻唑力复霉素浓度为 0.005  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (1/10 MIC) 时, 加入药物后 40 min  $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷的掺入仅抑制 6.78%; 当苯噻唑力复霉素浓度为 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (等于 MIC) 时,  $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷的掺入抑制 38.14%; 当苯噻唑力复霉素浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (10 倍于 MIC) 时,  $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷掺入的抑制达 92.24%。

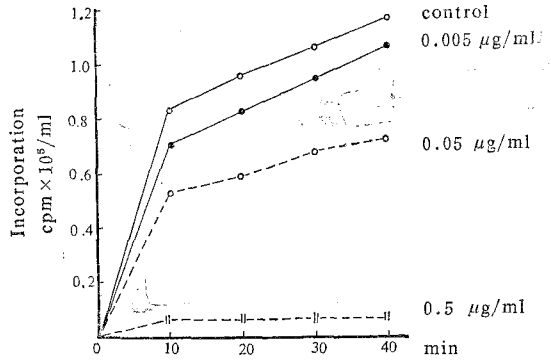


Fig 3. Effect of concentration of benzothiazole-rifamycin on incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine in *S. aureus* 209P

## 3. 苯噻唑力复霉素对 $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷、 $[^3\text{H}]$ -胸嘧啶核苷、 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸掺入大肠杆菌 2281 的影响

取对数生长期的大肠杆菌 2281 加入 6 支消毒大试管, 每管 9.9 ml。将 6 管菌液分为 3 组, 每组 2 管 (甲、乙管)。每组甲管加 0.1 ml 苯噻唑力复霉素 (溶于 DMF), 最终药物浓度均为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (等于 MIC), 乙管均加 0.1 ml DMF 作对照。同时, 于 3 组试管分别加入 3 种不同的同位素前体, 前体浓度均为 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 。震荡混匀后继续在 37°C 培养。按规定时间取菌液 1 ml (双份) 测定放射性。试验进行 3 次, 结果如图 4。

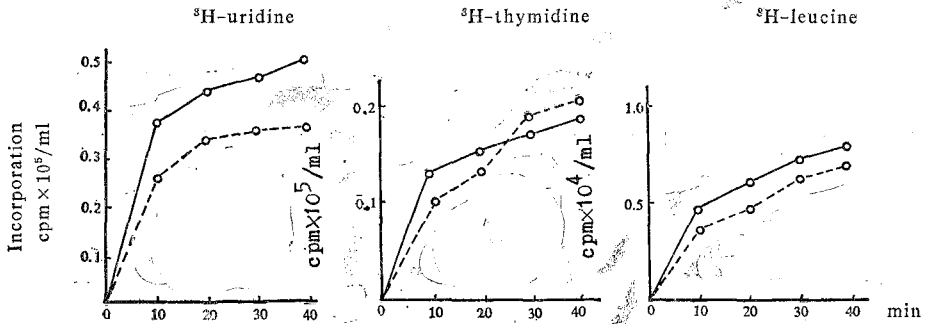


Fig 4. Effect of benzothiazole-rifamycin on incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine,  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -leucine in *E. coli* 2281

—○— Without benzothiazole-rifamycin  
- - - □ - - With benzothiazole-rifamycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

从图 4 可见, 苯噻唑力复霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 加入后 40 min,  $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷的掺入明显抑制。对 $[^3\text{H}]$ -亮氨酸的掺入仅有轻微抑制作用; 对 $[^3\text{H}]$ -胸嘧啶核苷的掺入无明显抑制作用。

4. 不同浓度的苯噻唑力复霉素对 $[^3\text{H}]$ -尿嘧啶核苷掺入大肠杆菌 2281 的影响 取对数生长期的大肠杆菌 2281 加入 4 只无菌试管, 每管 9.9 ml。第 1 管加 0.1 ml DMF 作对照, 第 2, 3, 4 管分别加入不同浓度的苯噻唑力复霉素 0.1 ml, 使药物最终浓度分别为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$

(1/2 MIC), 100  $\mu\text{g/ml}$  (等于 MIC), 200  $\mu\text{g/ml}$  (2 MIC)。同时, 于各管均加入 $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷 10  $\mu\text{Ci}$ 。震荡混匀后继续在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养。按规定时间取菌液 1 ml (双份) 测其放射性。试验重复 3 次, 结果见图 5。

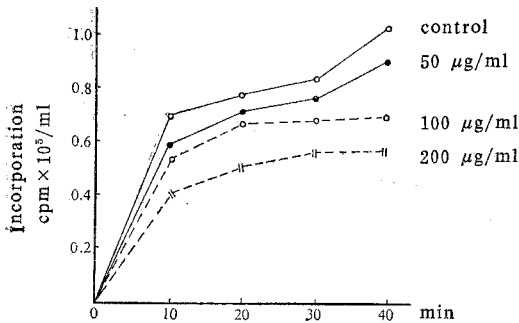


Fig 5. Effect of the concentration of benzothiazole-rifamycin on incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine in *E. coli* 2281

从图 5 可见,  $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷迅速掺入对照管的大肠杆菌 2281。当加入菌液的药物浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$  时, 40 min 后 $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷的掺入抑制 12.62%; 当药物浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$  时,  $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷的掺入抑制 32.04%; 当药物浓度为 200  $\mu\text{g/ml}$  时,  $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷的掺入抑制为 45.63%。

## (二) 苯噻唑力复霉素对细菌超微结构的影响

1. 正常 (未用药处理) 的金色葡萄球菌 209 P 和大肠杆菌 2281 的电镜结构, 如图 6,

7 所示。

从图 6, 7 可见, 未用苯噻唑力复霉素处理过的正常金色葡萄球菌 209 P 和大肠杆菌 2281 结构清晰, 胞质丰满, 菌体粗大, 胞质内充满核糖体, 电子密度高。

2. 苯噻唑力复霉素 (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 处理 4 h 后的金色葡萄球菌 209 P 的电镜结构, 如图 8 所示。

金色葡萄球菌 209 P 经苯噻唑力复霉素 0.5  $\mu\text{g/ml}$  (10 MIC) 处理 4 h 后, 超微结构发生明显改变。胞质失去完整性, 核糖体从胞质消失, 胞质出现空泡, 电子密度降低, 中隔加宽。质膜和胞壁仍完整。

3. 苯噻唑力复霉素 (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) 处理 4 h 后的大肠杆菌 2281 的电镜结构, 如图 9 所示。

大肠杆菌 2281 经苯噻唑力复霉素 1000  $\mu\text{g/ml}$  (10 MIC) 处理 4 h 后, 超微结构也发生明显改变, 其改变与金色葡萄球菌 209 P 相似。胞质出现空泡化, 核糖体消失。质膜和胞壁仍基本正常。

## 讨 论

本文用同位素前体物质掺入活体细菌的研究表明, 苯噻唑力复霉素对 $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷掺入金色葡萄球菌 209 P 和大肠杆菌 2281 均有快速而明显的抑制作用, 前者对药物更敏感。此结果说明该药作用机理与其它力复霉素相同, 主要是抑制细菌 RNA 的合成。苯噻唑力复霉素抑制 $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷掺入细菌的强度随药物浓度增加而加强。药物浓度低于细菌的 MIC 时, 抑制 $[\text{H}^3]$ -尿嘧啶核苷掺入细菌的作用微弱。 $[\text{H}^3]$ -胸嘧啶核苷和 $[\text{H}^3]$ -亮氨酸的掺入实验表明, 苯噻唑力复霉素对细菌 DNA 合成无影响; 对蛋白质合成有较弱的抑制作用, 这可能是由于该药抑制细菌 RNA 合成后致使 mRNA、tRNA 缺乏间接引起蛋白质的合成障碍。

苯噻唑力复霉素能抑制细菌 RNA 的合成, 使核糖体合成失去原料, 引起核糖体合成障碍。因此苯噻唑力复霉素处理后的细菌超微结构明显改变, 即胞质中核糖体消失, 出现空泡。

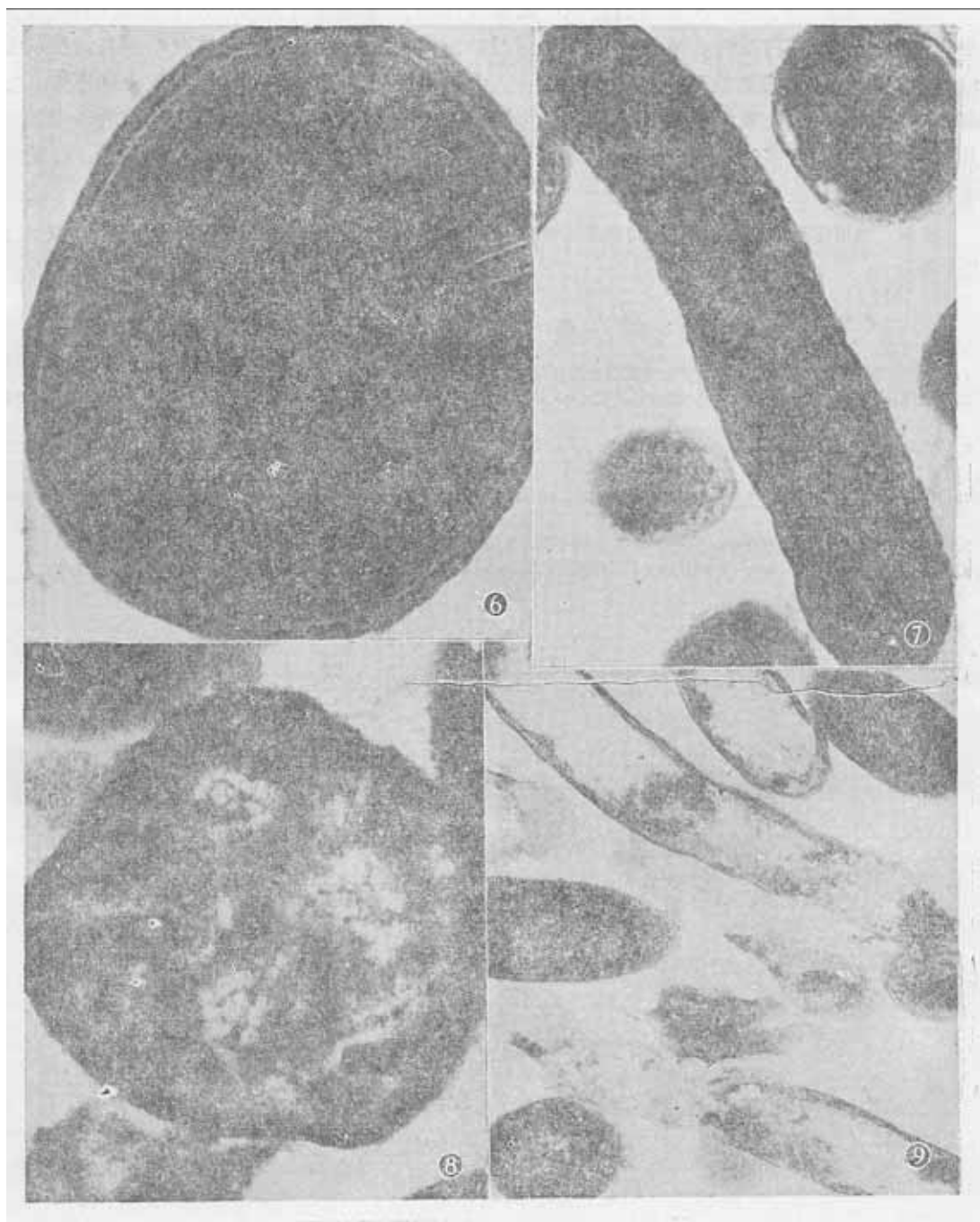


Fig 6. The ultramicroscopic structure of untreated *S. aureus* 209P (original magnification:  $\times 63,000$ )

Fig 7. The ultramicroscopic structure of untreated *E. coli* 2281 (original magnification:  $\times 22,000$ )

Fig 8. The ultramicroscopic structure of *S. aureus* 209P treated with  $0.5 \mu\text{g}$  of benzothiazole-rifamycin per ml for 4 hours (original magnification:  $\times 50,000$ )

Fig 9. The ultramicroscopic structure of *E. coli* 2281 treated with  $1,000 \mu\text{g}$  of benzothiazole-rifamycin per ml for 4 hours (original magnification:  $\times 15,100$ )

另外, mRNA、tRNA 在蛋白合成中起重要作用。苯噻唑力复霉素由于抑制 RNA 合成也间接抑制细菌蛋白质的合成, 由此也可引起核糖体合成障碍, 胞质中核糖体消失, 出现空泡。苯噻唑力复霉素虽然对金色葡萄球菌有很大抗菌作用, 但它与青霉素类抗生素不同, 它对组成胞壁的主要物质粘肽的合成无抑制作用。因此, 苯噻唑力复霉素处理细菌后的电镜照片上, 细菌胞壁基本完整。这些结果与 Konno 等<sup>(6)</sup> 用利福平处理结核分枝杆菌 H<sub>37</sub>R<sub>1</sub> 后的电镜结果相似。

致谢 四川抗菌素工业研究所陈肖庆所长提供试验样品, 本院电镜室李光蓉讲师和彭晓东同志技术上给予帮助

### 参 考 文 献

1. 阎邦首等: N-甲基苯噻唑力复霉素抗结核作用的研究. 抗生素 7:164, 1982
2. Fu Xiao-chang, et al: Biochemical study of R-75-1, a new semi-synthetic rifamycin. *J Antibiot* 34: 713, 1981
3. White R J, et al: Mechanism of action of rifamycin on mycobacterium semegmatis. *J Bact* 108:737, 1971
4. Nagate T, et al: Mode of action of a new nalidixic acid derivative, AB 206. *Antimicrob Agents Chemother* 17:763, 1980
5. 王浴生等: 药理实验方法学, 第一版, 第 1,090 页, 人民卫生出版社, 北京, 1982
6. Konno K, et al: Mode of action of rifampin on mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 107:1006, 1973

## A PRIMARY STUDY ON THE MECHANISM OF ACTION OF BENZOTHIAZOLE-RIFAMYCIN

XU Ke-Yi and WANG Yu-Sheng

(Department of Pharmacology, Sichuan Medical College, Chengdu)

**ABSTRACT** The effect of benzothiazole-rifamycin on macromolecular synthesis and ultramicroscopic structure of *S. aureus* 209P and *E. coli* 2281 was reported. In both *S. aureus* 209P and *E. coli* 2281, incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine into RNA was strongly inhibited by benzothiazole-rifamycin. Incorporation of  $^3\text{H}$ -leucine was inhibited slightly, but  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation was not inhibited. From these results, it was inferred that benzothiazole-rifamycin primarily inhibited RNA synthesis. A weak inhibition of bacterial protein synthesis by benzothiazole-rifamycin may be accounted for by secondary effects as a consequence of the inhibition of RNA synthesis, but bacterial DNA synthesis was not inhibited by benzothiazole-rifamycin. Cultures of *S. aureus* were exposed to 0.005, 0.05 and 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of benzothiazole-rifamycin, the inhibition of  $^3\text{H}$ -uridine incorporation was 6.78%, 38.14% and 92.24% in 40 minutes. Cultures of *E. coli* were exposed to 50, 100 and 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of benzothiazole-rifamycin, the inhibition of  $^3\text{H}$ -uridine incorporation was 12.62%, 32.04% and 45.36%.

Both *S. aureus* 209P and *E. coli* 2281 were treated with benzothiazole-Rifamycin. Marked change of ultramicroscopic structure was noted in the cytoplasm which lost compact structure and vacuole appeared, while ribosomes were lost. But the cell wall was preserved.

**Key words** Benzothiazole-rifamycin; *S. aureus* 209P; *E. coli* 2281; Macromolecular synthesis; Ultramicroscopic structure