

· 药理学 ·

核素掺入研究布替萘芬对真菌麦角甾醇生物合成的影响

王科兵¹, 张璐璐², 程 滨³, 刘洪涛⁴, 曹永兵², 姜远英² (1. 解放军第169医院药械科, 湖南 衡阳 421001; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 第二军医大学科研部, 上海 200433; 4. 首都医科大学附属北京口腔医院药剂科, 北京 100050)

[摘要] 目的 研究抗真菌药物布替萘芬对真菌麦角甾醇生物合成的影响。方法 通过真菌活细胞[1-¹⁴C]乙酸钠掺入和离细胞液[2-¹⁴C]甲羟戊酸掺入实验, 考察布替萘芬对真菌麦角甾醇生物合成的影响。结果 布替萘芬能使真菌中麦角甾醇的合成减少, 而增加角鲨烯的含量, 两种方法测得布替萘芬对真菌细胞麦角甾醇生物合成的IC₅₀分别为136.19 nmol/L和203.15 nmol/L。结论 布替萘芬为角鲨烯环氧化酶抑制剂, 核素掺入法能定量考察布替萘芬对角鲨烯环氧化酶的抑制活性, 且效果优于薄层色谱扫描法。

[关键词] 布替萘芬; 麦角甾醇; 角鲨烯环氧化酶; 核素掺入; 液体闪烁计数

[中图分类号] R978.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0359-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.011

The effect of butenafine on ergosterol biosynthesis in fungi by measuring incorporation of nuclide

WANG Ke-bing¹, ZHANG Lu-lu², CHENG Bin³, LIU Hong-tao⁴, CAO Yong-bing², JIANG Yuan-ying² (1. Department of pharmacy, the 169th Hospital of PLA, Hengyang 421002, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Scientific Resarch, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 4. Department of pharmacy, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of butenafine on ergosterol biosynthesis in fungi by measuring incorporation of nuclide. **Methods** The inhibitory effect of butenafine on ergosterol biosynthesis in whole-cell fungi was studied by measuring the incorporation of [1-¹⁴C] acetate into nonsaponifiable lipids (NSLs), while the effect in cell-free extracts was studied by measuring the incorporation of [2-¹⁴C] mevalonate into NSLs. **Results** The synthesis of ergosterol in fungi was significantly decreased after butenafine treatment, whereas the level of squalene was increased. The IC₅₀ value of butenafine on ergosterol biosynthesis was 136.19 nmol/L in whole-cell study and 203.15 nmol/L in cell-free study. **Conclusion** The method to measure the incorporation of [1-¹⁴C] acetate and [2-¹⁴C] mevalonate into NSLs of fungi, which could indicate the level of squalene, might be widely used to study the mechanism of inhibitor of squalene epoxidase.

[Key words] butenafine; ergosterol; squalene epoxidase; fluid flash counter

布替萘芬对包括烟曲霉菌在内的霉菌均有较强的抗菌活性, 且作用强于氮唑类抗真菌药氟康唑和酮康唑, 对酵母菌的作用则相对较弱, 因此适用于各类霉菌引起的皮肤真菌感染。布替萘芬在较低浓度时即能抑制真菌角鲨烯环氧化酶活性, 致真菌体内麦角甾醇合成不足及角鲨烯积聚。角鲨烯对真菌细胞有直接的毒性作用, 可致真菌快速死亡, 因此布替萘芬具有杀真菌活性^[1, 2]。

笔者前期研究表明, 薄层色谱法能很好地分辨不同类别抗真菌药物对真菌麦角甾醇生物合成

的抑制作用的不同, 氟康唑等羊毛甾醇14 α -去甲基化酶抑制剂能引起羊毛甾醇及其上游成分的累积, 布替萘芬则能使真菌中的角鲨烯含量增加, 而其下游成分(包括麦角甾醇)的含量下降, 从而证明布替萘芬作用机制不同于氮唑类药物, 为角鲨烯环氧化酶的抑制剂。但薄层色谱法不能定量检测药物对不同靶酶的抑制活性^[3]。本研究利用真菌活细胞[1-¹⁴C]乙酸钠掺入实验和离细胞液[2-¹⁴C]甲羟戊酸掺入实验, 定量考察了布替萘芬对真菌麦角甾醇生物合成的抑制作用, 为筛选不同麦角甾醇生物合成抑制剂, 开发新型抗真菌药物提供了新方法。

1 材料和方法

[基金项目] 国家自然科学基金(81273556)。

[作者简介] 王科兵(1966-), 男, 主任药师, Tel: 13037343451, E-mail: wangkb169@163.com。

[通讯作者] 姜远英, E-mail: jiangyycn@yahoo.com.cn。

1.1 材料

1.1.1 菌株 ATCC 标准株为白念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC76615 及新隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) ATCC32609 均由长征医院菌种保存中心赠送。

实验用菌株均于沙堡葡萄糖琼脂培养基 (SDA) 划线活化, 深部真菌于 35 °C 培养一周, 浅部真菌于 28 °C 培养 2 周后, 分别挑取单克隆再次划线活化, 取第二次所得单克隆置 SDA 斜面, 用上述方法培养后于 4 °C 保存备用。

1.1.2 培养液 沙堡氏葡萄糖琼脂培养液 (SDA); 酵母浸膏蛋白胨葡萄糖培养液 (YEPD) 及 RPMI 1640 培养液分别按文献方法配制^[1]。

1.1.3 试剂 布替萘芬 (butenafine)、氟康唑 (fluconazole) 由本院药物化学教研室提供, 分别用 DMSO 配成 6.4 mg/ml 溶液, -20 °C 保存, 实验前, 将 6.4 mg/ml 药物贮存液取出置 35 °C 温箱融化, 各取 10 μl 用 RPMI 1640 培养液稀释 10 倍, 充分混匀, 制成 640 μg/ml 后备用。麦角甾醇 (ergosterol)、羊毛甾醇 (lanosterol) 和角鲨烯 (squalene) 对照品 (Sigma) 分别用环己烷配成 0.25 g/L 溶液, -20 °C 保存; 皂化剂: 新鲜配制的含 15% NaOH 的 90% 乙醇溶液; 其余试剂均为国产 AR 级, 其中 DMSO 于用前重蒸。

掺入试剂: 取 [1-¹⁴C] 醋酸钠水溶液加三蒸水稀释成 20 μCi/ml; 取 RS-[2-¹⁴C] 甲羟戊酸内酯甲苯溶液用氮气吹干, 加三蒸水制成 8 μCi/ml;

辅酶溶液: 使用前用三蒸水新鲜配制辅酶溶液, 使溶液中各成分浓度分别为: 辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 0.02 mol/L; 辅酶 II (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) 0.02 mol/L; 还原型辅酶 II (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, NADPH) 0.02 mol/L; D-葡萄糖-6-磷酸盐 0.06 mol/L; 5'-三磷酸腺苷 (ATP) 0.1 mol/L; 还原型谷光甘肽 0.06 mol/L。用 10 M NaOH 调 pH 至 7.0。

二价阳离子溶液: 用三蒸水分别配制 MgCl₂ 和 MnCl₂ 溶液, 使用前用 5 M K₂HPO₄ 调节 pH 分别为 7.0 和 6.7。

1.1.4 仪器 隔水式电热恒温培养箱和 THZ-82A 台式恒温振荡器 (上海跃进医疗器械厂); Hermle-ZK364 型离心机 (BHG); 511 型酶标分析仪 (上海第三分析仪器厂); 高效硅胶板 HSGF254 (烟台芝罘黄务硅胶开发试验厂); Dead-beater 细胞破碎机 (Bio-spec); SN-6904 液体闪烁计数器 (上海核福光电仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 [1-¹⁴C] 乙酸掺入实验 取新生隐球菌 ATCC32609 标准株, 经 YEPD 两次活化, 取 2 ml 接种至 200 ml YEPD, 35 °C, 250 rpm 振荡培养 16 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 用 G-PBS 洗两次, 至上清液无色, 去上清, 称菌重, 用 G-PBS 配成 5% (W/V) 菌液。于 15 ml 试管内分别加 5% 菌液 940 μl 及相应浓度药物溶液 10 μl, 35 °C, 250 r/min 振荡, 预培养 10 min 后, 各加 [1-¹⁴C] 醋酸钠 50 μl (1 μCi), 加盖, 35 °C, 250 r/min 振荡培养 3 h, 加新鲜配制的皂化剂 2 ml, 加盖, 80 °C, 皂化 1 h, 加石油醚 (沸程 30 ~ 60 °C) 3 ml 提取 3 次, 合并提取液, 挥至 3 ml, 加三蒸水 3 ml 洗涤, 取醚层挥干, 加环己烷 100 μl 溶解, 即得 NSLs 样品。取 NSLs 样品 30 μl 于高效硅胶板上点样, 每个样品点于 6 mm 宽的条带上, 各样品间间隔 6 mm。麦角甾醇、羊毛甾醇和角鲨烯对照品点于同一高效硅胶板用于定位。按文献方法薄层展开^[3], 挥干展开液后放射自显影 24 h。薄层板于碘蒸气中显色定位, 挥尽碘后将各斑点处硅胶刮下, 置闪烁瓶中, 加闪烁液 1 ml, 进行液体闪烁计数, 测定各样品中不同斑点的 cpm 值。

1.2.2 [2-¹⁴C] 甲羟戊酸掺入实验 取白念珠菌 ATCC76615 标准株, 经 YEPD 两次活化, 取 3 ml 接种至 300 ml YEPD, 35 °C, 250 r/min 振荡培养 16 h, 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清。以下操作均在 4 °C 以下进行: 菌体用冰浴预冷过的 PBS 洗两次, 至上清液无色, 去上清, 再用 PBS 混悬, 加入等体积预先于 4 °C 保存的玻璃珠 (直径为 0.5 mm), 转入专用匀浆杯中, 补充 PBS 使液面与杯口持平, 旋紧杯盖, 使杯中空气尽可能少, 置 Bead-beater 细胞破碎机上, 冰盐浴降温, 破菌 30 s, 重复 4 次, 每次间隔 30 s。破碎的菌液 3 000 × g 离心 10 min, 取上清即为离细胞酶液。用考马氏亮兰测定其蛋白质含量, 加 PBS 调整浓度至蛋白质含量为 8 mg/ml, 4 °C 保存, 当天使用。

于 15 ml 试管中分别加入上述离细胞酶液 900 μl、新鲜配制的辅酶溶液 50 μl (含 NAD 1 μmol; NADP 1 μmol; NADPH 1 μmol; D-葡萄糖-6-磷酸盐 3 μmol; ATP 5 μmol; 还原型谷光甘肽 3 μmol)、0.5 M MgCl₂ 10 μl、0.4 M MnCl₂ 5 μl、[2-¹⁴C] 甲羟戊酸 25 μl (0.2 μCi) 及不同浓度药物溶液 10 μl, 混匀, 35 °C, 180 r/min 振荡培养 3 h。加 1 ml 新鲜配制的皂化液中止反应, 按“[1-¹⁴C] 乙酸掺入实验”方法皂化, 提取 NSLs 样品, 薄层色谱法分离 NSLs 并放射自显影, 液体闪烁计数测量各样品中不同斑点的 cpm 值。

1.3 统计学处理 液体闪烁计数器对 ¹⁴C 的检测效

率为95.77%,空白计数为78 cpm,NSLs各成分液体闪烁计数测定值经下式转换,则得¹⁴C在各成分中的掺入量:

$$D = \{ [(C - 78) / 95.77\%] \times V / v \} / 2220$$

D: ¹⁴C在NSLs各成分中的掺入量(nCi); C: 各成分液体闪烁计数测定值(cpm); V/v: 各NSLs样品总体积和薄层点样用体积比; [2220]: 1 nCi = 37 Bq = 2220 dpm

组间差异用t检验。IC₅₀用第四军医大学卫生统计学教研室所编线性拟合统计软件(SPLM)计算。

2 结果

2.1 布替萘芬对[1-¹⁴C]乙酸掺入的影响 在不加药物的空白对照组中,[1-¹⁴C]乙酸主要掺入麦角甾醇,而在NSLs其它成分中很少积累,掺入到麦角甾醇中的[1-¹⁴C]乙酸占其总掺入的93.2%。布替萘芬为角鲨烯环氧化酶抑制剂,角鲨烯环氧化的阻断使[1-¹⁴C]乙酸难以掺入其下游成分,因此,随着药物浓度的增加,¹⁴C在角鲨烯中积累增加,在麦角甾醇中掺入减少,而在羊毛甾醇和角鲨烯环氧化物中未能测到¹⁴C的掺入(图1)。布替萘芬对真菌整体细胞麦角甾醇生物合成的IC₅₀为136.19 nmol/L。

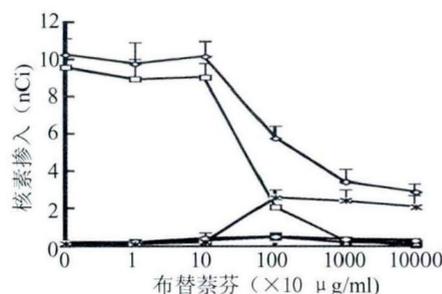
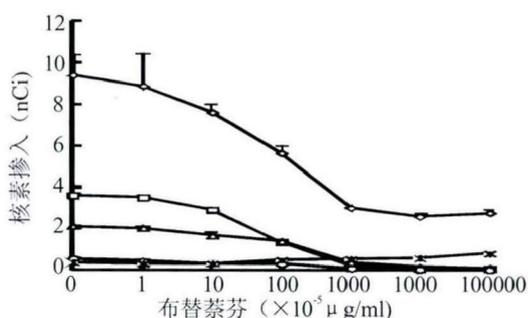


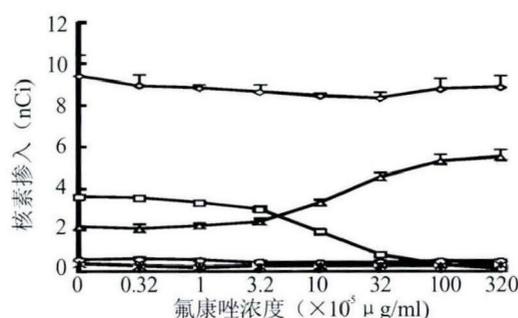
图1 布替萘芬对[1-¹⁴C]乙酸掺入真菌整体细胞NCLs的影响(n=5)

◇-总NSLs; □-麦角甾醇; △-羊毛甾醇;
○-环氧角鲨烯; * -角鲨烯

2.2 布替萘芬对[2-¹⁴C]甲羟戊酸掺入的影响 在离细胞酶反应体系中,随着反应的进行,[2-¹⁴C]甲羟戊酸作为麦角甾醇生物合成的原始底物,可以逐步掺入到NSLs的各个成分中。随着药物的改变和药物浓度的增加,考察[2-¹⁴C]甲羟戊酸在各个成分中的掺入变化情况便可确切判断麦角甾醇生物合成抑制剂的作用机制。本研究测定了角鲨烯环氧化酶抑制剂布替萘芬对[2-¹⁴C]甲羟戊酸掺入的影响(图2),布替萘芬能抑制¹⁴C在麦角甾醇中的掺入,但只引起角鲨烯中¹⁴C的积累。利用真菌离细胞酶测得布替萘芬抑制麦角甾醇生物合成的IC₅₀为203.15 nmol/L。

图2 氟康唑和布替萘芬对[1-¹⁴C]甲羟戊酸掺入真菌离细胞液NCLs的影响(n=5)

◇-总NSLs; □-麦角甾醇; △-羊毛甾醇; ○-环氧角鲨烯; * -角鲨烯



3 讨论

布替萘芬为苜甲胺衍生物,是在萘替芬基础上发展起来的广谱抗真菌药。其化学结构和作用模式类似于丙烯胺类抗真菌药,为角鲨烯环氧化酶抑制剂,在较低浓度时能抑制真菌角鲨烯环氧化酶活性,致真菌体内麦角甾醇合成不足及角鲨烯积聚,兼具抑菌及杀菌作用。麦角甾醇是真菌细胞膜结构的重要组成部分,麦角甾醇合成不足使真菌生长受到抑制;角鲨烯对真菌细胞有直接的毒性作用,可致真菌

快速死亡。布替萘芬的双重作用引起真菌细胞膜的破裂,表现出强大的杀真菌活性^[1]。

本实验室前期利用薄层色谱扫描法研究抗真菌药物对真菌麦角甾醇生物合成的影响,发现麦角甾醇和羊毛甾醇的Rf值适中,斑点清晰,用TLC扫描法能快速、准确地测定其含量,便于考察羊毛甾醇14α-去甲基化酶抑制剂的生物活性。但由于角鲨烯和甾醇的极性相差较大,无法将其Rf值调整到适当范围内,不能对其进行准确的定量测定,故无法比较

(下转第365页)

的50倍^[9]。大豆磷脂作为一种特殊的纯天然营养物质,为机体提供能量的同时,还可以为机体补充一定必需脂肪酸及其他机体所必需的营养成分,将两者科学、合理、有效的组合在一起,使其开发为具有抗氧化功能的营养补充剂、保健食品或药品,对许多疾病的防治有着重要的意义。

【参考文献】

- [1] 周坦洋,罗芙蓉,白彬.葡萄籽原花青素生物药理活性的研究进展[J].哈尔滨医科大学学报,2012,46(1):94.
- [2] 刷红梅,曲梓怡,王召令,等.原花青素的抗氧化作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(16):3155.
- [3] 黄进,杨丹丹,郝书颖,等.大豆磷脂对肉仔鸡抗氧化性能影响的研究[J].饲料工业,2012,33(7):15.

- [4] 凌沛学,汤漩,王凤山,等.药物与磷脂复合物研究近况[J].中国药学杂志.2005,40(6):401.
- [5] 国家食品药品监督管理局.抗氧化功能评价方法[S].2012:1.
- [6] 左巨波,尚京川.中药磷脂复合物的研究进展[J].中国药房.2007,18(27):2149.
- [7] 戴伟,尹晓晨.蜂胶对乙醇所致化学性肝损伤的保护作用研究[J].实用预防医学,2010,17(6):1207.
- [8] 段丽菊,刘英帅,朱燕,等.DNPH比色法:一种简单的蛋白质胺基含量测定方法[J].毒理学杂志,2005,19(4):320.
- [9] 毕玲,傅柏平.葡萄籽原花青素提取物的研究进展[J].中国新药杂志,2008,17(17):1478.

【收稿日期】2013-04-17

【修回日期】2013-06-28

(上接第361页)

角鲨烯环氧化酶抑制剂的生物活性^[3]。因此,建立能对真菌中麦角甾醇、羊毛甾醇和角鲨烯同时定量检测的方法,有利于筛选比较作用于不同靶酶的真菌麦角甾醇生物合成抑制剂。

本实验室利用 $[1-^{14}\text{C}]$ 乙酸掺入,结合薄层色谱分析、放射自显影和液体闪烁计数方法,研究了氟康唑对真菌整体细胞中麦角甾醇生物合成的影响。表明该方法能同时检测 ^{14}C 在羊毛甾醇和麦角甾醇等各成分中的掺入量,并能定量计算药物对真菌麦角甾醇生物合成的半数抑制浓度(IC_{50})^[4]。为进一步研究该方法是否能定量考察比较角鲨烯环氧化酶抑制剂的活性,本研究利用该方法考察了布替萘芬对 ^{14}C 在麦角甾醇生物合成通路各成分中,尤其在角鲨烯中的掺入量。

前期研究显示,氟康唑在抑制 ^{14}C 掺入麦角甾醇的同时,只引起其在羊毛甾醇和角鲨烯环氧化物中的掺入增加,未见 ^{14}C 在角鲨烯中的累积。本研究结果显示,随着布替萘芬药物浓度的增加, ^{14}C 在麦角甾醇中的掺入也逐渐减少,但能定量检测到 ^{14}C 在角鲨烯中的掺入呈剂量依赖性地增加,而在羊毛甾醇和角鲨烯环氧化物中未见掺入。这一结果证明,布替萘芬是角鲨烯环氧化酶的抑制剂,它的作用可使该酶的直接底物——角鲨烯的累积增加。同时表明,该方法可定量考察布替萘芬等角鲨烯环氧化酶抑制剂的生物活性。

该方法研究结果显示,氟康唑和布替萘芬在抑制 ^{14}C 掺入麦角甾醇的同时,都能不同程度地抑制 ^{14}C 的总掺入。由于氟康唑在抑制CYP51酶时,可引起羊毛甾醇积累的同时,并未造成角鲨烯的堆积,因此,推测 $[1-^{14}\text{C}]$ 乙酸掺入的减少并不是酶反应受

阻造成的直接后果, ^{14}C 掺入总量的减少除了与用药后真菌生长受抑有关外,还可能与真菌在药物作用下功能紊乱,对 $[1-^{14}\text{C}]$ 乙酸的摄取能力下降有关。

为减少细胞活性、底物摄取能力等因素的干扰,本研究还利用前期建立的真菌离细胞液 $[2-^{14}\text{C}]$ 甲羟戊酸掺入实验^[5],研究了布替萘芬对真菌离细胞酶的麦角甾醇生物合成功能影响。结果显示,在离细胞酶中,氟康唑不会影响 ^{14}C 的总掺入,而布替萘芬对 ^{14}C 的总掺入仍有抑制作用。这是因为角鲨烯在麦角甾醇合成通路的上游,其过度积累可造成 ^{14}C 的前期掺入受阻。可见,用离细胞液 $[2-^{14}\text{C}]$ 甲羟戊酸掺入实验,可以更加直接地考察抗真菌药物对真菌麦角甾醇生物合成酶系的作用,有利于定量考察药物的抑酶活性,为抗真菌药物的作用机制和抑酶活性研究提供了新方法。

【参考文献】

- [1] Iwatani W, Arika T, Yamaguchi H. Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37(4): 785.
- [2] McNeely W, Spencer CM. Butenafine [J]. Drugs, 1998, 55(3): 405.
- [3] 曹永兵,孙福红.薄层色谱扫描法检测氟康唑对真菌麦角甾醇生物合成的影响[J].第二军医大学学报,1999,20(5):312.
- [4] 曹永兵,高平挥,张军东,等.核素掺入研究氟康唑对真菌麦角甾醇生物合成的影响[J].第二军医大学学报,2004,25(7):751.
- [5] 晏秀伟,刘洪涛,曹永兵,姜远英.同位素掺入法测定耐药白念珠菌CYP51酶活性[J].中国新医药.2004,3(6):1.

【收稿日期】2013-03-07

【修回日期】2013-05-07