



方 茜, 王文湘, 高美龄, 等. 取代基团对含噻二唑片段截短侧耳素衍生物抑制鸡毒支原体活性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(3): 21-25.

取代基团对含噻二唑片段截短侧耳素衍生物抑制鸡毒支原体活性的影响

方 茜, 王文湘, 高美龄, 阳 涛, 刘雅红, 汤有志

(广东省兽药研制与安全评价重点实验室/华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】为研发抗鸡毒支原体感染的药物提供试验依据。【方法】合成 18 种 C14 支链含噻二唑片段的截短侧耳素衍生物, 采用高分辨质谱进行结构确证, 通过体外药敏试验研究所合成苯环取代基衍生物对鸡毒支原体抑菌活性的影响。【结果】化合物 12、15 和 17 对鸡毒支原体 S6 的最小抑菌质量浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 均为 $0.125\ 0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 化合物 18 和对照泰妙菌素对鸡毒支原体 S6 的 MIC 值最高, 均为 $0.015\ 6\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 化合物 18 氨基被苯甲酰基化后所得化合物 17 的抗菌活性减弱。【结论】化合物 18 可作为候选化合物进行深入研究, 以开发新的抗支原体感染药物。

关键词: 鸡毒支原体; 截短侧耳素衍生物; 噻二唑; 高分辨质谱; 最小抑菌质量浓度
中图分类号: S852.62 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2017)03-0021-05

Influence of substituent groups on the antibacterial effect of pleuromutilin derivatives with thiadiazole moiety against *Mycoplasma gallisepticum*

FANG Xi, WANG Wenxiang, GAO Meiling, YANG Tao, LIU Yahong, TANG Youzhi
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Drugs' Research and Safety Evaluation/College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To provide experimental data for the research and development of new antibacterials against *Mycoplasma gallisepticum*. 【Method】Eighteen analogues of pleuromutilin possessing thiadiazole moieties at the C14 chains were synthesized. High resolution mass spectrometry was used to verify the structures of the synthesized compounds. Influence of substituted benzene on the antibacterial effects of these pleuromutilin derivatives against *M. gallisepticum* were investigated by *in vitro* drug sensitivity tests. 【Result】The obtained MIC values revealed that analogues 12, 15 and 17 exhibited potential antibacterial activities against *M. gallisepticum* S6 strain with MIC of $0.125\ 0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Analogue 18 and Tiamulin (control) showed the most potent antibacterial activities against S6 strain *in vitro* with MIC of $0.015\ 6\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Analogue 17, which was the product from benzoylation of the amino group of analogue 18, had lower antibacterial activity compared with analogue 18. 【Conclusion】Analogue 18 can be used as a candidate compound for further development of antibacterials against *M. gallisepticum*.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*; pleuromutilin derivative; thiadiazole moiety; high resolution mass spectrometry; minimum inhibitory concentration (MIC)

收稿日期: 2016-06-21 优先出版时间: 2017-04-12
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170412.1427.012.html>
作者简介: 方 茜 (1991—), 女, 硕士研究生, E-mail: 15989177877@163.com; 通信作者: 汤有志 (1983—), 男, 副教授, 博士, E-mail: youzhitang@scau.edu.cn
基金项目: 广东省自然科学基金 (S2012030006590); 广州市珠江科技新星专项 (2014J2200042)

感染鸡毒支原体 *Mycoplasma gallisepticum* 而引起的慢性呼吸道病是危害禽类的常见疾病,严重影响着养禽业的健康发展^[1],据不完全统计,鸡毒支原体感染鸡群后,会导致雏鸡弱雏率增加 10% 左右,蛋鸡产蛋率下降 10% ~ 20%,肉鸡体质量减少 38%,饲料转化率降低 21%,胴体质量亦随之下降,该病已成为严重威胁养禽业的疾病之一^[2],而使用抗菌药物是防治鸡毒支原体病的一种重要手段^[3]。由于鸡毒支原体没有细胞壁,所以对青霉素类、头孢类等抗菌药不敏感,较为有效的抗菌药有氟喹诺酮类、泰乐菌素、红霉素、庆大霉素、强力霉素、泰妙菌素、沃尼妙林等^[4]。其中泰妙菌素等截短侧耳素类衍生物具有独特的抗菌机理,不仅对鸡毒支原体有很好的抑菌效果,而且不易产生耐药性,已经被广泛应用于临床鸡毒支原体病的防治。

截短侧耳素是由 Kavanagh^[5] 于 1951 年从高等真担子菌高侧耳属 *Pleurotus mutilus* 和 *P. passeckerianus* 菌种培养分离得到的一种三环二萜类化合物,其主体结构由五元、六元和八元环骈合而成。因其独特的抑菌机制,药学工作者设计合成了大量新型截短侧耳素衍生物用于抗菌药物开发^[6]。截短侧耳素的结构修饰主要集中在 C14 位侧链上^[7],C14 位侧链如果连接中性基团或酸性基团的化合物,则抗菌活性极低,连接 2 个碱性中心侧链的衍生物其活性也较低,而连接 1 个碱性中心的硫醚基侧链,其衍生物抗菌活性往往较好^[8-9]。基于噻唑环能增加多数抗菌药物的活性,Ling 等^[10]设计合成了侧链上含有噻唑环的截短侧耳素类衍生物,经生物活性分析发现,其对临床分离的 MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) 和耐甲氧西林表皮葡萄球菌均有良好的体外抑菌效果。Wang 等^[11]在截短侧耳素 C14 侧链上引入 2-氨基噻唑得到系列衍生物,对一些革兰氏阳性耐药菌的抗菌活性强于阿莫西林和泰妙菌素。Shang 等^[12]在 C14 位侧链引入噻二唑杂环作为连接基团,合成了大量截短侧耳素衍生物,经体外抑菌活性研究,发现其中具有氨基或叔胺基的化合物对 MRSA、无乳链球菌具有较好的抗菌活性。但对抑制截短侧耳素衍生物支原体活性的研究并不多见。

基于以上关于截短的工作侧耳素衍生物的合成及活性研究,结合前人的研究成果^[12-13],本研究设计合成了 C14 支链引入噻二唑片段的 18 种截短侧耳素衍生物,以高分辨质谱对所合成化合物进行结构确证,以鸡毒支原体为研究对象,通过体外药敏试验研究了所合成衍生物取代基团对抑菌活性的影响,

以期新型高效截短侧耳素类动物专用抗支原体感染类药物的研发提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试验材料:截短侧耳素原料、对甲基本磺酰氯、取代苯甲酰氯、2-氨基-5-巯基-1,3,4-噻二唑、吡啶、乙腈、异丙醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、硅胶板、无菌 EP 管、无菌猪血清、L-半胱氨酸、辅酶 I、NaOH 溶液、鸡毒支原体菌株 S6;仪器:磁力搅拌器、旋转蒸发仪、紫外灯、循环泵、无菌超净工作台、二氧化碳恒温培养箱、高压灭菌器、LTQ-Orbitrap 高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司,美国)。

1.2 截短侧耳素衍生物的合成

18 种截短侧耳素衍生物的合成在 Shang 等^[13]、王波等^[14]合成方法基础上略作改进,具体步骤为以对甲苯磺酰氯活化截短侧耳 C14 支链上的羟基得对甲苯磺酰化截短侧耳素,碱性条件下与 2-氨基-5-巯基-1,3,4-噻二唑反应在截短侧耳素 C14 支链引入噻二唑环,得到化合物 18,最后再与苯环上有不同取代基的苯甲酰氯进行酰基化反应,得到化合物(1~17)(图 1)。所有产物经柱色谱分离得到高纯度的 18 种含有不同取代基的截短侧耳素衍生物,18 种化合物经高分辨质谱进行结构确证。

1.3 药敏试验

1.3.1 培养基的配制 鸡毒支原体培养基(pH7.8):称取鸡毒支原体基础培养基 47.4 g,加热溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,116 °C 高压灭菌 30 min,冷却至 45 °C 左右加入 150 mL 无菌猪血清(猪血清 56 °C 灭活 30 min),以及 L-半胱氨酸 0.125 g 和还原型辅酶 I 0.125 g,用无菌 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液调 pH 至 7.8 左右。密封放 4 °C 保存,于 1 个月内使用。

1.3.2 鸡毒支原体菌株 S6 的启用 鸡毒支原体标准株 S6,购自中国兽医药品监察所。取鸡毒支原体标准株 S6 冻干粉接种于鸡毒支原体液体培养基中,置于 5% (φ) 二氧化碳培养箱,37 °C 培养 4~6 d,当培养基颜色由红色变为橙黄色时,传代 2 次,然后扩大培养。

1.3.3 抗菌药原液的配制 分别称取 0.025 6 g 截短侧耳素衍生物 1~18 于 10 mL 容量瓶中,用 N,N-二甲基甲酰胺溶解,定容,使药物质量浓度均为 2 560 μg·mL⁻¹,同时按照相同的方法配制质量浓度为 2 560 μg·mL⁻¹ 的泰妙菌素作为对照,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,小管分装,-20 °C 保存备用。

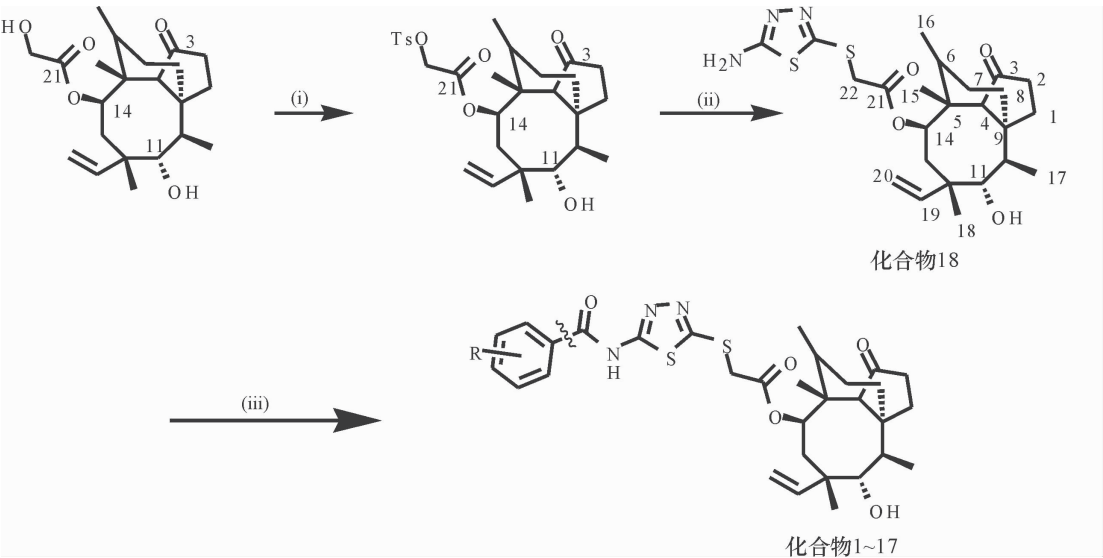


图 1 截短侧耳素衍生物的合成路线

Fig. 1 The synthetic route of pleuromutilin derivatives

1.3.4 化合物最小抑菌质量浓度的测定 采用2倍稀释法每排双面板取无菌2 mL EP管15个,每个编号的衍生物对应1排双面板。在第1管中加入0.9 mL液体培养基,其余各管加入0.5 mL,取配好的药液0.1 mL加入第1管中充分混合后,取0.5 mL混合液加入第2管中,依此类推,最后吸出0.5 mL弃去,然后每管中加入 10^6 CFU · mL⁻¹的菌液0.5 mL,盖好盖子,得到化合物浓度依次2倍递减的15个液体培养基。另作空白对照,37 ℃条件下培养,观察鸡毒支原体的生长

情况,以分析18种截短侧耳素衍生物的最小抑菌质量浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。

2 结果与分析

2.1 结构确认

因合成路线、原料确定,部分化合物经过类似的合成路线进行合成,且已完成结构表征^[12-13],本研究合成的18种截短侧耳素衍生物仅由高分辨质谱进行结构确证。以化合物18(C₂₄H₃₅N₃O₄S₂)(图2)为

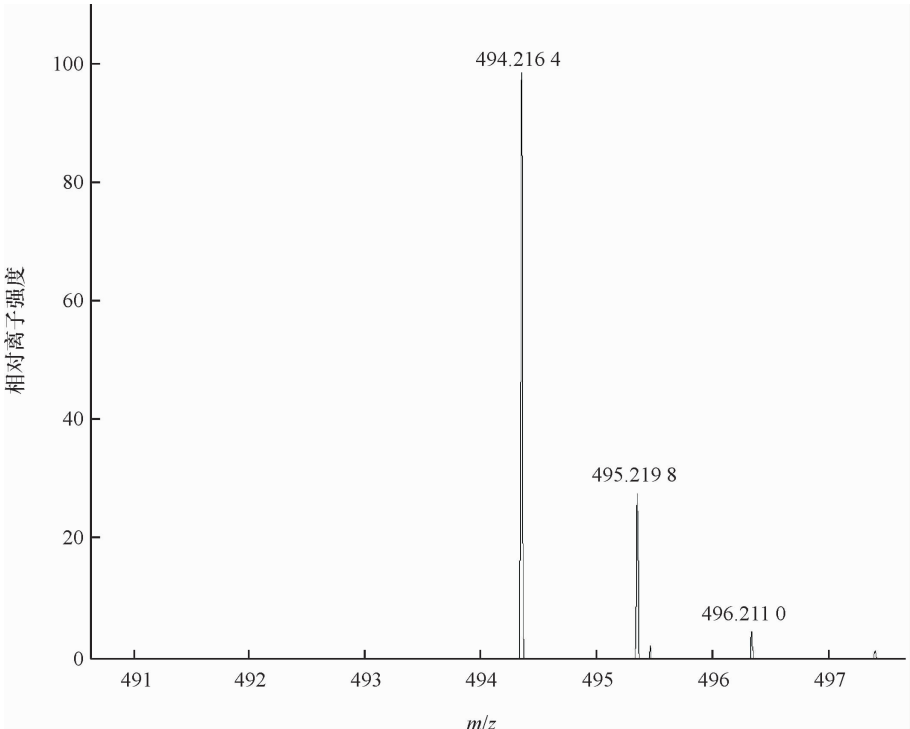


图 2 化合物 18 高分辨质谱图

Fig. 2 High resolution mass spectrum of compound 18

例,高分辨质谱分析表明其精确质量数理论值为 494.214 2, 所得化合物精确质量数实测值为 494.216 4,表明合成所得产物为目标化合物。所有化合物精确质量数如表 1 所示。

表 1 18 种衍生物精确质量数和 18 种衍生物及泰妙菌素对 S6 支原体 MIC 结果

Tab.1 The MIC against <i>Mycoplasma gallisepticum</i> S6 strain and HR-MS of 18 pleuromutilin derivatives and Tiamulin							
化合物	R ¹⁾	HR-MS([M + H] ⁺)	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	化合物	R ¹⁾	HR-MS([M + H] ⁺)	MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1		616.233 1	0.250 0	10		666.230 1	0.500 0
2		616.233 0	0.500 0	11		666.229 9	0.500 0
3		616.231 0	0.250 0	12		612.258 2	0.125 0
4		632.203 5	0.250 0	13		612.258 4	0.250 0
5		632.202 9	0.500 0	14		612.258 2	0.500 0
6		632.204 4	0.250 0	15		628.253 6	0.125 0
7		643.227 2	0.500 0	16		628.253 9	0.250 0
8		643.227 6	0.500 0	17		598.242 9	0.125 0
9		643.228 4	0.500 0	18		494.216 4	0.015 6
				泰妙菌素			0.015 6

1) 苯环上不同取代基的苯甲酰氯。

由表 1 可知,化合物 12、15 及 17 对鸡毒支原体的 MIC 为 0.125 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,化合物 1、3、4、6、13 及 16 对鸡毒支原体的 MIC 为 0.250 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,化合物 2、5、7 ~ 11 及 14 对鸡毒支原体的 MIC 为 0.500 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,化合物 18 与泰妙菌素对 S6 鸡毒支原体的 MIC 均为 0.015 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论与结论

截短侧耳素衍生物与细菌核糖体 50s 亚基相互作用发挥抑菌作用,其 C14 支链能影响该类化合物 <http://xuebao.scau.edu.cn>

2.2 最小抑菌质量浓度

用试管 2 倍稀释法,对 18 种截短侧耳素衍生物及泰妙菌素进行鸡毒支原体抑制活性评价,试验结果如表 1 所示。

的抗菌活性^[15]。本文结果显示,C14 支链引入噻二唑片段的截短侧耳素衍生物 18 对鸡毒支原体抑制活性最强,与泰妙菌素相当。化合物 18 氨基被苯甲酰基化后所得化合物 17 活性减弱,可能因化合物 17 中苯甲酰基的吸电子作用降低了噻二唑环上酰胺氮原子电子云的密度,减弱了化合物 17 中 C14 支链与核糖体 50s 亚基中碱基的相互作用进而降低了化合物 17 的活性。而化合物 1 ~ 11 分子中的苯甲酰基上均有强吸电子基团(氟、氯、硝基及三氟甲基),与化合物 17 相比,分子中噻二唑及酰胺氮原子电子云

密度进一步降低,可能因此导致化合物 1~11 对鸡毒支原体的抑制活性均弱于化合物 17。Shang 等^[13]研究表明在化合物 17 苯环上引入氨基能增强目标化合物对 MRSA 等的抑菌活性,鉴于氨基为给电子基团,我们分别在 17 苯环上引入甲基和甲氧基这 2 种给电子基团,以期增强目标化合物抑制鸡毒支原体活性,但所得化合物仅 12 及 15 与 17 抑菌活性相当。与甲基及甲氧基相比,氨基除了具有给电子效应外,还可能与核糖体上碱基存在强相互作用^[12-13],故而使含氨基衍生物抑菌活性得以增强。本研究并未合成苯环具有氨基取代的衍生物,因而在发挥抗支原体活性时,氨基是否仍具有这一特点尚需在进一步的试验验证。

本研究在截短侧耳素 C14 支链上引入噻二唑片段,合成了 18 种截短侧耳素衍生物,研究了取代基团对衍生物抑制鸡毒支原体活性的影响。化合物 18 对支原体的抑菌活性最强,与泰妙菌素相当。Zhang 等^[16]研究表明化合物 18 以 $948.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量饲喂小鼠无明显急性毒性;以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量连续 28 d 饲喂小鼠无明显蓄积毒性,且其对 MRSA 感染小鼠的死亡保护率与泰妙菌素相当。以上研究结合本试验中化合物 18 对 S6 支原体的体外抑菌结果表明,化合物 18 有望作为兽医临床抗鸡毒支原体感染的候选药物进行进一步研发。此外,本文所得 18 种化合物 S6 支原体抑制活性的构效关系,可为 C14 支链含噻二唑截短侧耳素类衍生物的设计及后续研究提供依据。

参考文献:

[1] 冯元璋. 鸡毒支原体感染及危害[J]. 中国家禽, 2008, 15(12): 45-47.

[2] 陈凤梅,牛钟相,程光民,等. 鸡毒支原体研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(3): 56-59.

[3] 纪新花,王永强,张新民. 鸡支原体病的特点及防控策略[J]. 养禽与禽病防治, 2010(9): 34-36.

[4] 贾志江,刘娣琴,杨红梅. 鸡毒支原体感染的流行病学分析及综合防控[J]. 畜牧兽医杂志, 2010, 29(3): 117-118.

[5] KAVANAGH H R. Antibiotic substances from basidiomycetes; VIII: *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* Pilat[J]. P Natl Acad Sci USA, 1951, 37

(9): 570-574.

[6] TANG Y Z, LIU Y H, CHEN J X. Pleuromutilin and its derivatives: The lead compounds for novel antibiotics[J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(1): 53-61.

[7] 邹懿,黄宇琪,胡昌华. 截短侧耳素及其衍生物的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2): 65-68.

[8] SHANG R, WANG S, XU X, et al. Chemical synthesis and biological activities of novel pleuromutilin derivatives with substituted amino moiety[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82595.

[9] YI Y, YANG G, ZHANG C, et al. Synthesis and evaluation of novel pleuromutilin derivatives with a substituted pyrimidine moiety[J]. Eur J Med Chem, 2015, 101(13): 179-184.

[10] LING Y, WANG X, WANG H, et al. Design, synthesis, and antibacterial activity of novel pleuromutilin derivatives bearing an amino thiazolyl ring[J]. Arch Pharm, 2012, 345(8): 638-646.

[11] WANG X, LING Y, WANG H, et al. Novel pleuromutilin derivatives as antibacterial agents: Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(19): 6166-6172.

[12] SHANG R, PU X, XU X, et al. Synthesis and biological activities of novel pleuromutilin derivatives with a substituted thiadiazole moiety as potent drug-resistant bacteria inhibitors[J]. J Med Chem, 2014, 57(13): 5664-5678.

[13] SHANG R, WANG G, XU X, et al. Synthesis and biological evaluation of new pleuromutilin derivatives as antibacterial agents[J]. Molecules, 2014, 19(11): 19050-19065.

[14] 王波,李健,汤有志,等. 空间位阻对丁胺侧链取代截短侧耳素衍生物鸡毒支原体抑制活性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(12): 101-103.

[15] DAVIDOVICH C, BASHAN A, AUERBACH-NEVO T, et al. Induced-fit tightens pleuromutilins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity[J]. P Natl Acad Sci USA, 2007, 104(11): 4291-4296.

[16] ZHANG C, YI Y, CHEN J, et al. In vivo efficacy and toxicity studies of a novel antibacterial agent: 14-O-[(2-amino-1,3,4-thiadiazol-5-yl)thioacetyl] mutilin[J]. Molecules, 2015, 20(4): 5299-5312.

【责任编辑 庄 延】