

靶向结核分枝杆菌代谢关键酶 DprE1 的 抗结核药物活性评价方法的建立

张晓蕊¹, 万国权², 高超³, 谭惺妍¹, 曾菊梅¹, 李雨庆⁴, 王国庆¹

1. 四川大学华西公共卫生学院 / 华西第四医院, 四川 成都 610041; 2. 四川大学生物治疗国家重点实验室;
3. 四川大学华西医院人类疾病与免疫治疗实验室; 4. 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学华西口腔医院

摘要:目的 根据 OPC-167832 与 DprE1 蛋白的已知相互作用, 建立靶向结核分枝杆菌代谢关键酶 DprE1 的抗结核药物活性评价方法。方法 首先, 通过 pET28a-Rv3790 表达 DprE1 蛋白, pGro7-Rv0440 表达结核分枝杆菌分子伴侣 CPN60.2, 将两种载体共转化至 *E. coli* BL21 中表达 DprE1 蛋白。经 Ni-NTA 亲和层析纯化目的蛋白并使用 LC-MS 质谱对目的蛋白进行鉴定。其次, 通过 ITC 等温滴定法, 检测靶向 DprE1 的抑制剂与 DprE1 的直接相互作用。最后, 利用计算机模拟技术对 OPC-167832 与 DprE1 蛋白的进行相互作用对接。结果 成功构建 pET28a-Rv3790 表达载体、pGro7-Rv0440 表达载体, 并表达纯化出可溶性目的蛋白 DprE1。ITC 实验结果表明, DprE1 与 OPC-167832 结合时产生显著的热量变化。计算机分子对接结果显示, OPC-167832 与 DprE1 蛋白的碳氢键结合位点主要位于 Pro316, 氟化物氢键结合的位点则为 His132、Asn364。结论 可溶性蛋白 DprE1 成功表达, 表达的蛋白与 OPC-167832 相互作用产生热量变化。基于此, 可证实靶向结核分枝杆菌代谢关键酶 DprE1 的抗结核药物活性评价方法成功建立。本研究为以 DprE1 为靶点的结核分枝杆菌抑制剂活性评价提供了实验基础和方法学支持。

关键词: 结核分枝杆菌; DprE1; 可溶性表达; ITC; 抑制

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2025)11-2080-11

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202502351

Establishment of evaluation methods for antituberculosis drug activity targeting the key metabolic enzyme DprE1 of mycobacterium tuberculosis

ZHANG Xiao-ru^{*}, WAN Guo-quan, GAO Chao, TAN Xing-yan, ZENG Ju-mei, LI Yu-qing, WANG Guo-qing

^{*}West China School of Public Health/West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** Based on the known interaction between OPC-167832 and the DprE1 protein, this study aims to establish an evaluation method for the antituberculosis drug activity targeting the key metabolic enzyme DprE1 of Mycobacterium tuberculosis. **Methods** First, the DprE1 protein was expressed using the pET28a-Rv3790 vector, and the molecular chaperone CPN60.2 of Mycobacterium tuberculosis was expressed using the pGro7-Rv0440 vector. Both vectors were co-transformed into *E. coli* BL21 for DprE1 protein expression. The target protein was purified via Ni-NTA affinity chromatography and identified using LC-MS mass spectrometry. Secondly, the direct interaction between the DprE1-targeting inhibitor and DprE1 was assessed using isothermal titration calorimetry (ITC). Finally, computational simulation techniques were employed to dock OPC-167832 with the DprE1 protein. **Results** The pET28a-Rv3790 and pGro7-Rv0440 expression vectors were successfully constructed, leading to the expression and purification of soluble DprE1 protein. ITC results indicated a significant heat change upon the binding of DprE1 to OPC-167832. Molecular docking results revealed that the hydrogen bond binding site of OPC-167832 with DprE1 was primarily located at Pro316, while the binding sites for the fluorinated hydrogen bond were His132 and Asn364. **Conclusion** The soluble DprE1 protein was successfully expressed, and its interaction with OPC-167832 resulted in a measurable heat change. This confirms the successful establishment of an evaluation method for the antituberculosis drug activity targeting the key metabolic enzyme DprE1 of Mycobacterium tuberculosis. This study provides an experimental basis and methodological support for the activity evaluation of DprE1-targeting inhibitors against Mycobacterium tuberculosis.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis; DprE1; Soluble expression; ITC; Inhibition

基金项目: 四川省自然科学基金面上项目(2025ZNSFSC0770); 成都市科技局重点研发项目(2024-YF05-00039-SN)

作者简介: 张晓蕊(1998-), 女, 硕士在读, 研究方向: 公共卫生

通信作者: 王国庆, E-mail: huaxiwgq@163.com

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是一种具有弯曲或分枝状形态特征的革兰阳性杆菌, 是结核病 (tuberculosis) 的主要病原体, 大多通过空气进行传播^[1]。据估计, 全球近四分之一的人口感染了 MTB, 其中大约 5% ~ 10% 的感染者最终会出现相关症状并发展为结核病^[2]。《2024 年 WHO 全球结核病报告》显示, 2023 年全球结核病确诊病例达 1 080 万例, 是自 1995 年监测以来的最高水平^[3]。作为结核病高负担国家之一, 我国结核病发病数占全球的 6.8%, 仅次于印度 (26%) 和印度尼西亚 (10%)^[3]。2023 年我国新发结核病患者约 74.1 万例, 死亡约 2.5 万例^[3]。结核病的治愈需要长期使用抗结核药物进行抗菌治疗, 常规治疗使用的一线临床药物为异烟肼 (isoniazid)、利福平 (rifampin)、吡嗪酰胺 (pyrazinamide, PZA)、乙胺丁醇 (ethambutol, EMB), 异烟肼的作用靶点为参与细胞壁分枝菌酸 (mycolic acid, MA) 合成途径的 InhA (烯酰基载体蛋白还原酶) 和 KasA (β -酮酰基载体蛋白合成酶)^[4]。耐药 MTB 菌株 (drug-resistant MTB, DR-MTB) 的出现, 使得结核病患者依从性下降^[5]。据 WHO 估计, 2023 年全球约新增 40 万多重耐药 / 利福平耐药结核病 (MDR/RR-TB) 患者, 而我国新增 MDR/RR-TB 病例数达 2.9 万 (占全球的 7.3%), 居世界第四位^[3]。耐药结核病病例治疗持续时间长、费用昂贵、且有毒副作用, 在世界范围内大约夺走了 160 万人的生命^[6-7]。

结核病的持续威胁促使全球广泛关注 MTB 中的药物靶点, 以促进新的抗结核药物开发^[8]。在抗结核药物的药物靶点中, DprE1 是抗结核药物开发领域最常见且最受欢迎的研究靶点之一, 由基因 *Rv3790* 编码^[9]。DprE1 和 DprE2 酶共同作用将 DPR (十异戊二烯基磷酸基 -D-核糖) 转化为 DPA (十异戊二烯基磷酸基 -D-阿拉伯糖), 参与 MTB 细胞壁主要成分阿拉伯半乳糖的形成^[10-11]。DprE1 作为一种黄素酶, 其 FAD 结合域 (7-196, 413-461) 呈 $\alpha + \beta$ 折叠, 底物结合域 (197-412) 呈反平行 β 折叠 ($\beta 10-\beta 16$), 并与螺旋 $\alpha 5, \alpha 9, \alpha 10$ 共同构成活性中心^[12]。由于 DprE1 结构的复杂性, 其在重组表达的过程中难以正确折叠和修饰, 易形成包涵体^[13]。DprE1 抑制剂可分为共价结合抑制剂与非共价结合抑制剂。目前, 已报道的 DprE1 共价抑制剂以苯并噻嗪酮类 (benzothiazinones, BTZs) 为主, 已有超过 600 种新的硝基苯并噻嗪酮被报道, 其中有近 90% 被证明对 MTB ($MIC < 10 \mu M$) 具有活性^[14]。DprE1 非共价抑制剂包括 TCA1、TBA7371 和 OPC-167832 等^[15]。OPC-167832 是日本 Otsuka 制药公司报道的一种喹啉酮类抗结核药物, 对细胞内和细胞外 MTB 均有杀菌活性^[16-17], 且已经进入临床 IIb 期试

验阶段^[18], 可用作建立 DprE1 抑制剂筛选模型的标准药物。

抗结核新药的筛选是抗结核药物开发的初始阶段, 用计算手段识别潜在的靶点结合物, 进行抗结核药物的虚拟筛选是抗结核新药筛选的常见方法^[14, 19-21], 但该方法缺乏直接的生物证据。应用 MTB 进行药敏实验开展抗结核分子的筛选则需要高等级的实验室环境, 且存在生物安全风险, 也不能明确化合物直接的抗菌靶点和作用机制^[21]。本研究采用等温滴定量热法 (total ion chromatogram, ITC) 实验验证与计算机模拟相结合的策略: 一方面, 通过体外表达并纯化可溶性 DprE1 蛋白, 采用 ITC 测定 OPC-167832 与 DprE1 蛋白的生物结合特性; 另一方面, 利用计算机分子对接技术模拟 DprE1 蛋白与 OPC-167832 的结合模式。通过整合计算机虚拟筛选与 ITC 等温滴定技术, 建立了一套靶向 DprE1 的 MTB 抑制剂活性评价方法, 为抗结核药物的筛选提供了新的研究思路和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 H37Ra (ATCC 25177) 由上海晶诺提供。pET28a 质粒、pGro7 质粒、DH5 α 和 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞由擎科生物提供。质粒提取、DNA 提取及纯化试剂盒购自 Omega Bio-Tek。KOD Mix 酶来自 Toyobo, T4 DNA 连接酶来自 Takara, 限制性核酸内切酶 *XhoI* 和 *NcoI* 购自 NEB, MultiF Seamless Assembly Mix 酶来自 ABclonal。IPTG、阿拉伯糖、卡拉霉素、氯霉素及透析袋由索莱宝提供。Ni-NTA 购自碧云天, Protein A HP 柱由 Biodragon 提供。OPC-167832 由成都药德康明供应, 异烟肼购自麦克林。

1.2 方 法

1.2.1 构建重组质粒 pET28a-Rv3790 和 pGro7-Rv0440 根据 NCBI 获得的 *Rv3790*、*Rv0440* 基因序列, 与 pET28a 质粒载体和 pGro7 质粒载体选择合适的同源序列, 目的基因与载体的上下游引物由擎科生物公司合成。*Rv3790* 的上下游引物分别是: 5'-GATATACCATGGCCTTGAGCGTGGGAGCTACCAC-3', 5'-GTAATGCTCGAGCAGCAGCTCCAAGCGTCGG-3'。*Rv0440* (编码 MTB 伴侣蛋白 CPN60.2) 的上下游引物分别是: 5'-TACGAATTTAAGGAATAAAGATAGCGCCGCCAAGACAATTGCGTA-3', 5'-TATTTCTGCCAGGTGCAGGGCAACATATGTCCAGAAATCCATG CCACCATGTCCG-3'。质粒 pGro7 引物为 pGro-7F: 5'-CGACATGGGTGGCATGGATTCT GACATATGTTGCCTGCACCTCGCAGAAATA-3', pGro-7R: 5'-TACCGAATTGTCTTGGCCATGCGGCCGCTATCTTTATTCCTTAAATTCGTA-3'。

以 *H37Ra* 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *Rv3790* 和 *Rv0440* 基因片段。经 *XhoI* & *NcoI* 双酶切 pET28a 和 *Rv3790* 片段后, T4 DNA 连接酶连接、转化至 DH5 α 、涂布于含卡那霉素 (50 $\mu\text{g/ml}$) LB 平板; 通过同源重组法将线性化 pGro7 载体和 *Rv0440* 片段连接、转化至 DH5 α 、涂布于含氯霉素 (50 $\mu\text{g/ml}$) LB 平板。涂布后平板均 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 转化子均通过菌落 PCR 及测序验证。将成功克隆的 pET28a-*Rv3790* 和 pGro7-*Rv0440* 质粒共转化至 *E.coli* BL21 菌株, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[22]。

1.2.2 蛋白表达与纯化的条件摸索 将含有 pGro7-*Rv0440* 和 pET28a-*Rv3790* 的 BL21 菌株接种至 LB 培养基活化过夜。按 1:100 比例扩大培养, OD600 为 0.6 ~ 0.8 时, 添加 0.5 mM IPTG, 分别在 16 $^{\circ}\text{C}$ 、18 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 下诱导 4 ~ 20 h, 阿拉伯糖浓度为 250 $\mu\text{g/ml}$ 或 1 mg/ml。通过 SDS-PAGE 验证蛋白表达情况, 确定最佳表达条件^[23]。

1.2.3 蛋白的大量诱导表达纯化与鉴定 根据前期结果, 选择 0.5 mM IPTG 和 250 $\mu\text{g/ml}$ 阿拉伯糖, 20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 6 h。收集菌体后, 用 5 mM 咪唑缓冲液 (5 ml 1M 咪唑 + 75 ml 4M NaCl + 50 ml 1M Tris-HCl + 870 ml ddH₂O) 溶解, 冰水浴超声破碎细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$, 16 000 $\times g$ 离心 15 min, 收集上清液过 Ni-NTA, 用不同浓度咪唑缓冲液洗脱。洗脱液在透析液 (25 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、25% 甘油, pH 8.0) 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析 12 ~ 16 h, 分装后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。通过 SDS-PAGE 验证蛋白纯度, 切取目的条带进行 LC-MS 鉴定。

1.2.4 ITC 检测 OPC-167832 与蛋白的相互作用 采用 ITC 研究 OPC-167832 与 DprE1 蛋白的相互作用, 通过测定热量变化进行小分子与蛋白质结合定性分析^[24-25]。实验分为有诱导剂 (DprE1 表达) 和无诱导剂 (无 DprE1 表达) 两组, 分别与 OPC-167832、二甲基亚砜 (DMSO) 及异烟肼进行滴定。将样品溶液 (360 μl 已透析目的蛋白 + 40 μl DMSO) 注入 ITC 反应槽, 50 μl 配体溶液 (40 μl 透析液 + 10 μl 化合物) 注入滴定槽, 每次滴定 2 μl , 间隔 2 min。ITC 仪器 (MicroCal PEAQ-ITC) 记录热量变化, 数据保存为原始文件。

1.2.5 OPC-167832 与 DprE1 蛋白的分子对接 使用 AutoDock 1.5.6 和 PyMol 1.8.2 进行分子对接分析^[26]。从 PDB 官网 (<http://www.pdb.org>) 获取 DprE1 三维结构, 通过 ChemDraw 2023 (<https://www.chemdraw.com/>) 获得 OPC-167832 的 2D 和 3D 结构文件。将 DprE1 的 PDB 文件与 OPC-167832 的 SDF 文件导入 AutoDock, 设置参数后进行对接模拟。使用 PyMol 可视化分析, 生成结合模式图像, 展示分子结合的空间结构特征。

2 结 果

2.1 质粒 pET28a-*Rv3790* 的构建 *Rv3790* 基因和 pET28a 质粒经 *XhoI* & *NcoI* 双酶切后, 通过 T4 连接酶将目标基因插入线性化载体, 见图 1A。PCR 结果显示 *Rv3790* 扩增片段为 1 000 ~ 2 000 bp, 与理论大小 1 386 bp 一致, 见图 1B; 酶切后载体片段 7 500 ~ 10 000 bp 符合 pET28a (5 962 bp) 预期大小, 见图 1C。连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞后经卡那霉素筛选获得单菌落, 见图 1D。挑取多个单菌落, 进行 PCR 验证后选择在目标条带 1 000 ~ 2 000 bp 范围内的菌落进行测序, 见图 1E。双向测序结果与 *Rv3790* 标准序列高度匹配, 证实基因成功克隆至载体, 见图 1F。

2.2 质粒 pGro7-*Rv0440* 的构建 采用 PCR 获得 *Rv0440* 基因 (1 623 bp) 及线性化 pGro7 质粒后同源重组进行连接, 见图 2A。*Rv0440* 基因扩增产物在 1 000 ~ 2 000 bp 范围内, 符合理论大小, 见图 2B; 线性化质粒 5 000 ~ 7 500 bp 符合质粒 pGro7 (5 467 bp) 预期大小, 见图 2C。连接产物转化至 DH5 α 后经氯霉素筛选获得单菌落, 见图 2D。选取菌落 PCR 显示 1 000 ~ 2 000 bp 目标条带大小的单菌落进行 PCR 验证, 见图 2E, 双向测序结果与 *Rv0440* 标准序列完全匹配, 证实 pGro7-*Rv0440* 表达载体构建成功, 见图 2F。

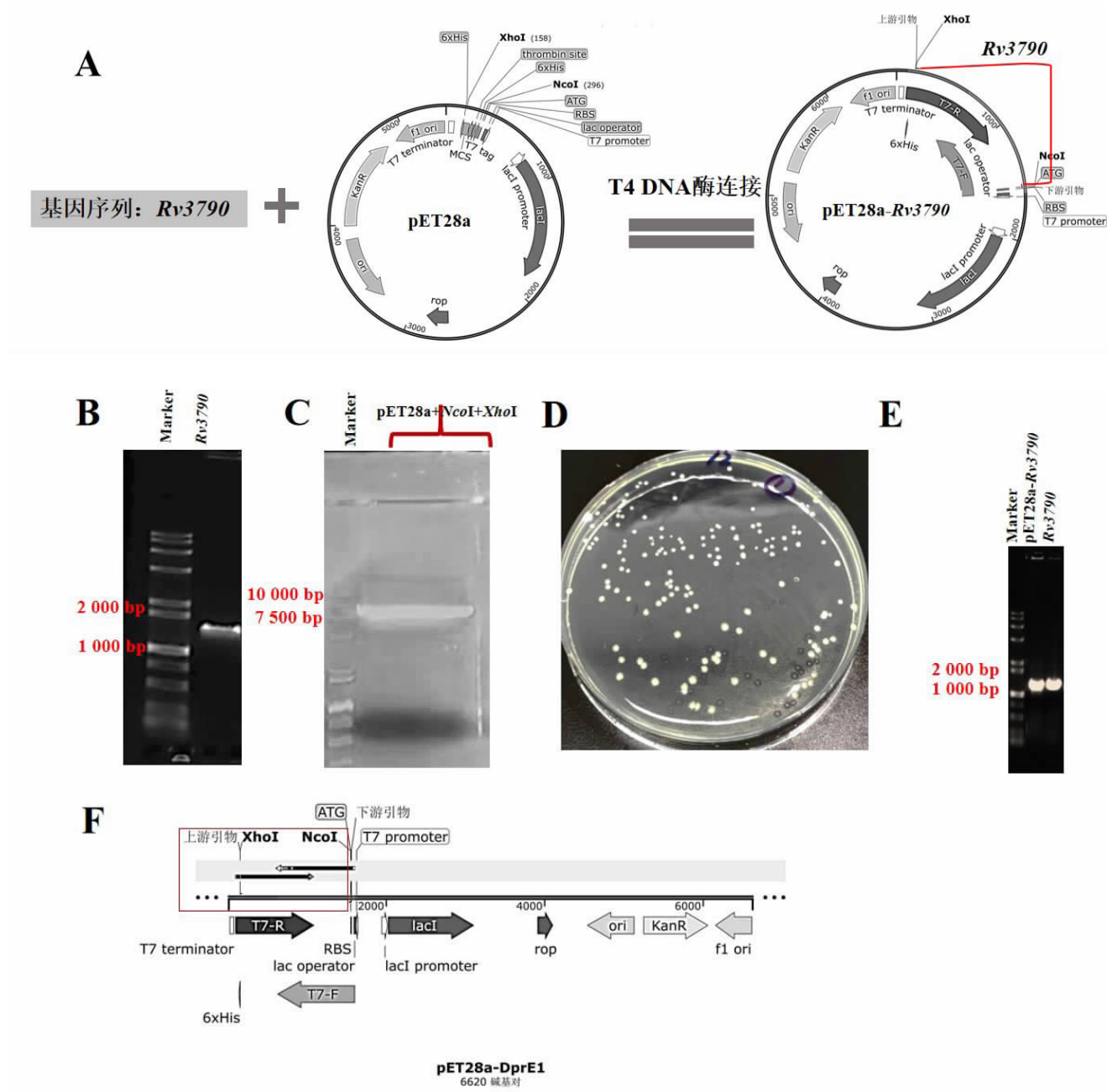
2.3 质粒 pET28a-*Rv3790* 和质粒 pGro7-*Rv0440* 在 BL21 的共表达 将验证成功的质粒 pET28a-*Rv3790* 和 pGro7-*Rv0440* 共转化至 BL21 菌株中, 并在含卡那霉素和氯霉素双抗的 LB 培养基上筛选单菌落, 见图 3A。随机挑选单菌落进行液体培养并加入 IPTG 诱导, 初步观察目的蛋白表达情况。SDS-PAGE 结果显示, 在 55 kDa 处 (接近 DprE1 蛋白 50 kDa 的大小) 加入 IPTG 的菌液蛋白条带明显粗于未加 IPTG 的对照组, 表明 DprE1 蛋白成功表达, 选择该菌液用于后续大量诱导实验, 见图 3B。为优化蛋白表达条件, 对诱导温度进行筛选, 发现 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导无明显蛋白表达, 18 $^{\circ}\text{C}$ 时 DprE1 蛋白诱导表达量相对较少, 而 37 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 均能诱导 DprE1 蛋白表达, 见图 4A。为避免 37 $^{\circ}\text{C}$ 下蛋白过快表达形成包涵体, 选择 20 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 进行进一步优化。

为促进 DprE1 蛋白的正确折叠和可溶性表达, 使用阿拉伯糖作为分子伴侣 CPN60.2 (*Rv0440*) 的诱导剂, 并对其浓度 (250 $\mu\text{g/ml}$ 和 1 mg/ml) 和温度 (20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$) 进行组合优化。结果显示, 20 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 250 $\mu\text{g/ml}$ 阿拉伯糖诱导的 DprE1 上清表达量显著高于 1 mg/ml 组, 见图 4B, 因此选择 250 $\mu\text{g/ml}$ 阿拉伯糖作为最佳诱导浓度。超声破碎后 Ni 柱亲和层析纯化蛋白, 20 $^{\circ}\text{C}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ 阿拉伯糖, 0.5 mM IPTG 下

DprE1 在上清中的表达量较优,见图 4B。

2.4 DprE1 蛋白表达纯化和鉴定 根据上述条件诱导 1 L 的表达菌株培养物,DprE1 蛋白与结核分枝伴侣蛋白 CPN60.2 在 BL21 中共表达,经超声破碎、Ni-柱吸附、洗脱后将 250 mM 咪唑洗脱液收集并透析,透析后于 -80 ℃ 保存,其余样品 SDS-PAGE 胶分离验证。红色框可看到疑似目的蛋白条带大小的条带,

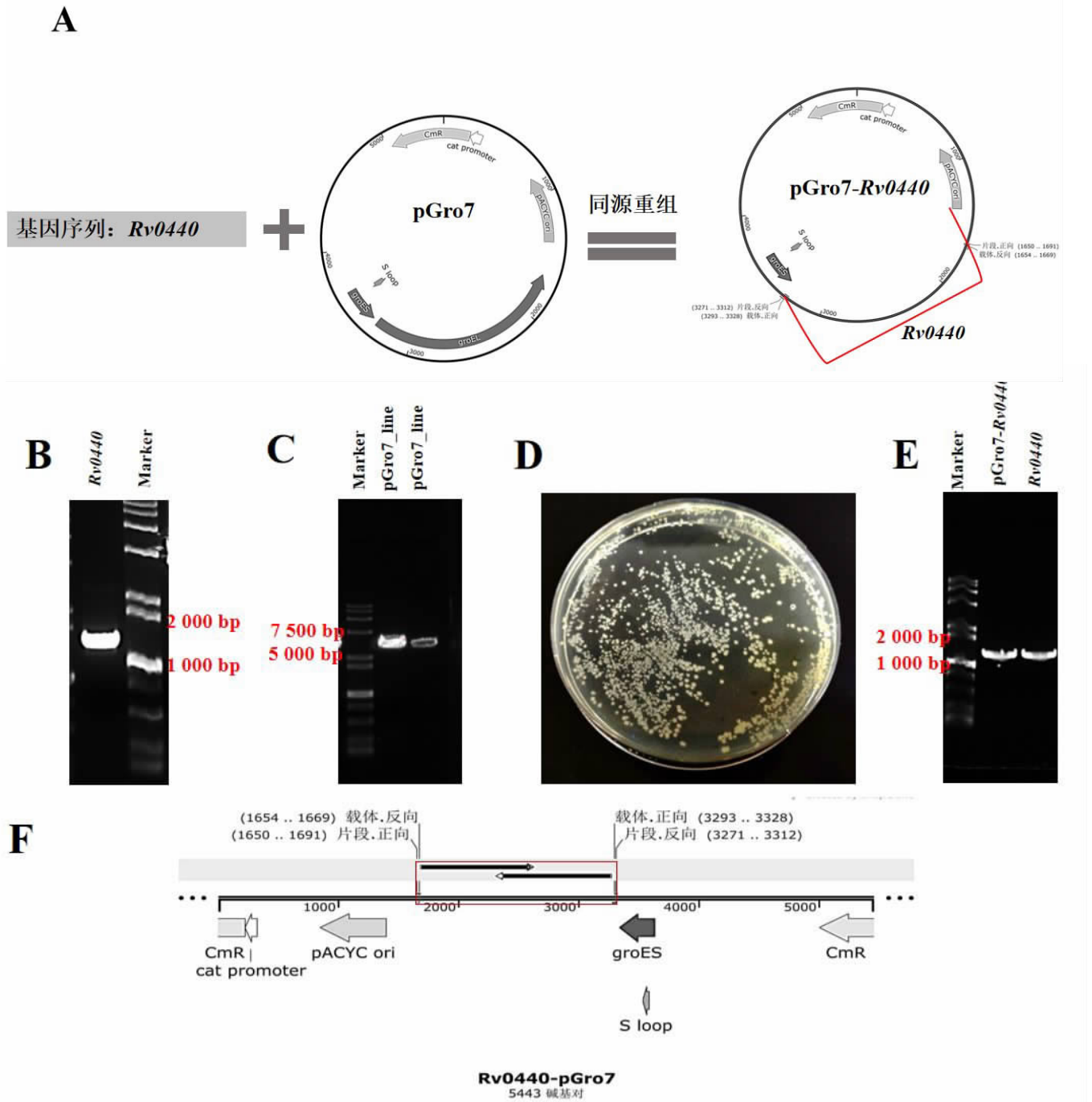
切下目的条带寄送至相关公司进行 LC-MS 蛋白质谱检测,见图 5、6。检测结果表明 DprE1 蛋白为该条带中相对含量最高的蛋白,占比 77%;而相对含量次之的蛋白为 CPN60.2,占 8%;ClpX 和 AtpA 仅占比 3% 和 2%,见表 1。因此,纯化后的上清液中包含 DprE1 蛋白,可用于 ITC 实验以验证 OPC-1678932 与 DprE1 蛋白的结合特性。



注: 图 A 为 *Rv3790* 基因与质粒 pET28a 的连接方式; 图 B 为目的基因 *Rv3790* 的获取; 图 C 为质粒 pET28a 的酶切线性化; 图 D 为 pET28a-*Rv3790* 转入 DH5 α ; 图 E 为菌落 PCR 验证, 1~10 为挑取的单菌落; 图 F 为 pET28a-*Rv3790* 表达载体与 *Rv3790* 标准序列测序比对结果。

图 1 质粒 pET28a-*Rv3790* 的构建

Figure 1 Construction of plasmid pET28a-*Rv3790*



注:图 A 为 *Rv0440* 基因与质粒 pGro7 的连接方式;图 B 为目的基因 *Rv0440* 获取;图 C 为质粒 pGro7 线性化;图 D 为菌 PCR 验证;图 E 为 pGro7-*Rv0440* 转入 DH5 α ;图 F 为 pGro7-*Rv0440* 表达载体与 *Rv0440* 标准序列测序比对。

图 2 质粒 pGro7-*Rv0440* 的构建

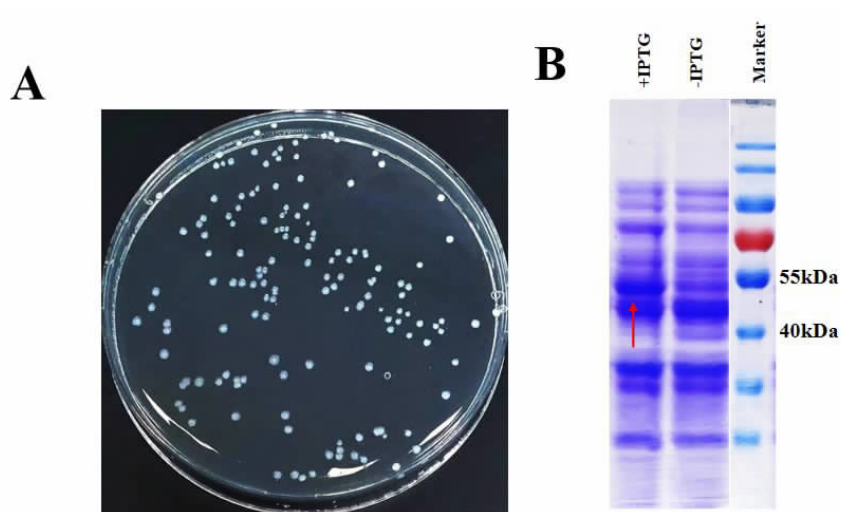
Figure 2 Construction of plasmid pGro7-*Rv0440*

表 1 LC-MS 检测蛋白胶的蛋白质结果

Table 1 LC-MS analysis of proteins from gel electrophoresis

基因标准名 缩写	蛋白质错误 发现率置信度	总和肽错误 概率分数	覆盖率(%)	肽段	肽段谱匹配数	独特肽段	Sequest HT 评分	丰度:F1:样本	分子量(kDa)
<i>DprE1</i>	High	60.996	77	35	196	35	325.94	99 471 954 288	50.1
<i>CPN60.2</i>	High	2.157	8	4	4	4	5.65	95 181 806	56.7
<i>ClpX</i>	High	0.978	3	1	1	1	2.61	6 743 042	46.8
<i>AtpA</i>	High	0.920	2	1	1	1	2.18	<100 000	59.3

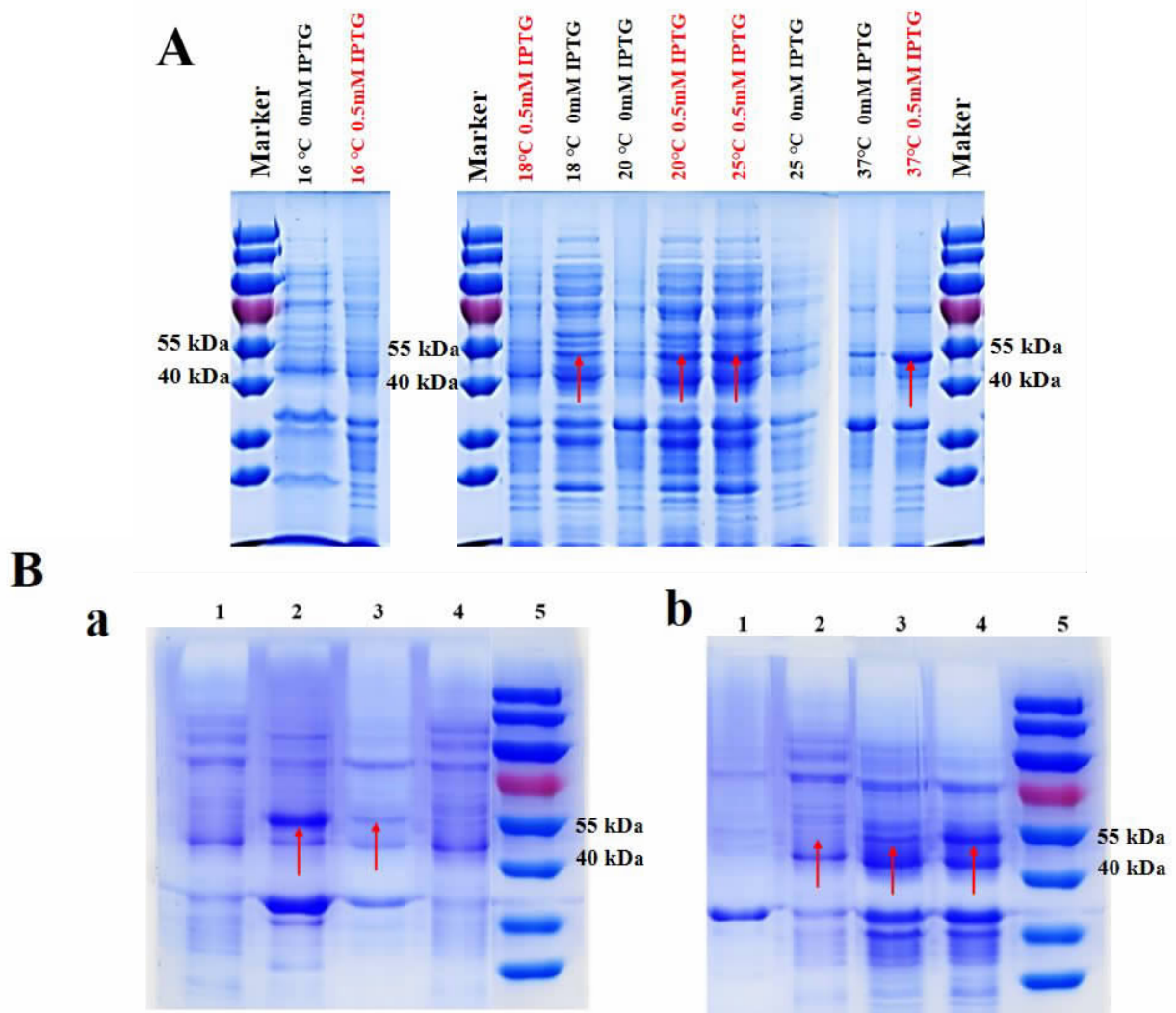
注:Sequest HT 为质谱数据分析软件名称;丰度:F1:样本为样本 F1 中蛋白质的相对/绝对定量值;*ClpX* (Caseinolytic protease X, 酪蛋白水解蛋白酶 X);*AtpA* (ATP synthase subunit alpha ATP 合酶 α 亚基)。



注：图 A 为质粒 pET28a-Rv3790 和质粒 pGro7-Rv0440 在 BL21 中的抗性筛选；图 B 为 IPTG 诱导含 pET28a-Rv3790 和 pGro7-Rv0440 菌株 BL21 的 DprE1 蛋白表达。

图 3 目的蛋白 DprE1 在含 pET28a-Rv3790 和 pGro7-Rv0440 菌株 BL21 中的表达

Figure 3 Expression of DprE1 in E. coli BL21 strain harboring pET28a-Rv3790 and pGro7-Rv0440



注：红色箭头表示目的蛋白 DprE1 所在位置；图 A 为不同温度条件的 DprE1 蛋白诱导情况；图 B 为不同阿拉伯糖浓度参与的 DprE1 蛋白诱导情况；a 为 25 °C, 1 表示 250 µg/ml 阿拉伯糖、上清, 2 表示 250 µg/ml 阿拉伯糖、菌体, 3 表示 1 mg/ml 阿拉伯糖、菌体, 4 表示 1 mg/ml 阿拉伯糖、上清；b 为 20 °C, 1 表示 1 mg/ml 阿拉伯糖、上清, 2 表示 250 µg/ml 阿拉伯糖、上清, 3 表示 1 mg/ml 阿拉伯糖、菌体, 4 表示 1 mg/ml 阿拉伯糖、菌体。

图 4 DprE1 蛋白表达纯化条件摸索

Figure 4 Optimization of DprE1 protein expression and purification conditions

2.5 化合物与 DprE1 蛋白相互作用测试 ITC 是一种微量热检测方法,可对小分子化合物与蛋白质结合时所放出或吸收的热量精确测定。本研究中将加入诱导剂作为 DprE1 蛋白表达的蛋白样本,将不加入诱导剂作为不含 DprE1 蛋白的样本,分别与 OPC-167832、DMSO、异烟肼进行等温滴定,观察是否有热量变化,以此表征小分子化合物与蛋白质的相互作用。实验结果表明 OPC-167832 与不含 DprE1 蛋白的样本滴定无热量变化,见图 7Aa;而与含有 DprE1 蛋白的样本滴定有热量变化,并且为放热反应 ($\Delta Q < 0$),表明化合物与 DprE1 蛋白有相互作用,见图 7Ba。阴性 DMSO 对照组和阳性异烟肼对照组与所有蛋白样本滴定均无热量变化,见图 7Ab、c 和图 7B b、c,表明 DMSO、异烟肼与 DprE1 蛋白均未发生相互作用。因此,OPC-167832 与纯化的 DprE1 蛋白存在相互作用。

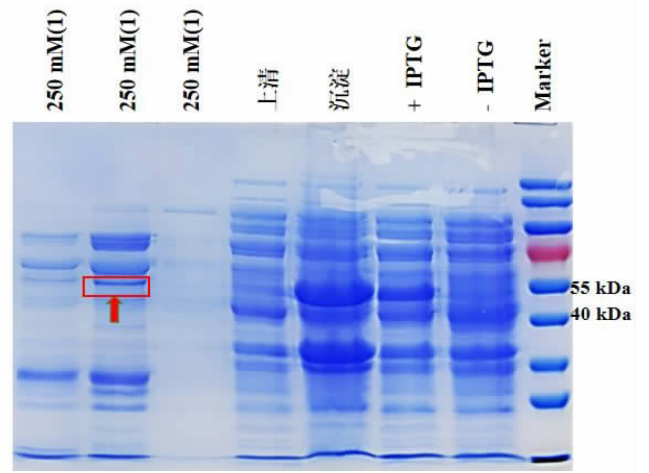


图 5 DprE1 蛋白与结核分枝伴侣蛋白在 BL21 中大量共表达情况

Figure 5 Co-expression of DprE1 and Mycobacterium tuberculosis chaperone proteins in *E. coli* BL21

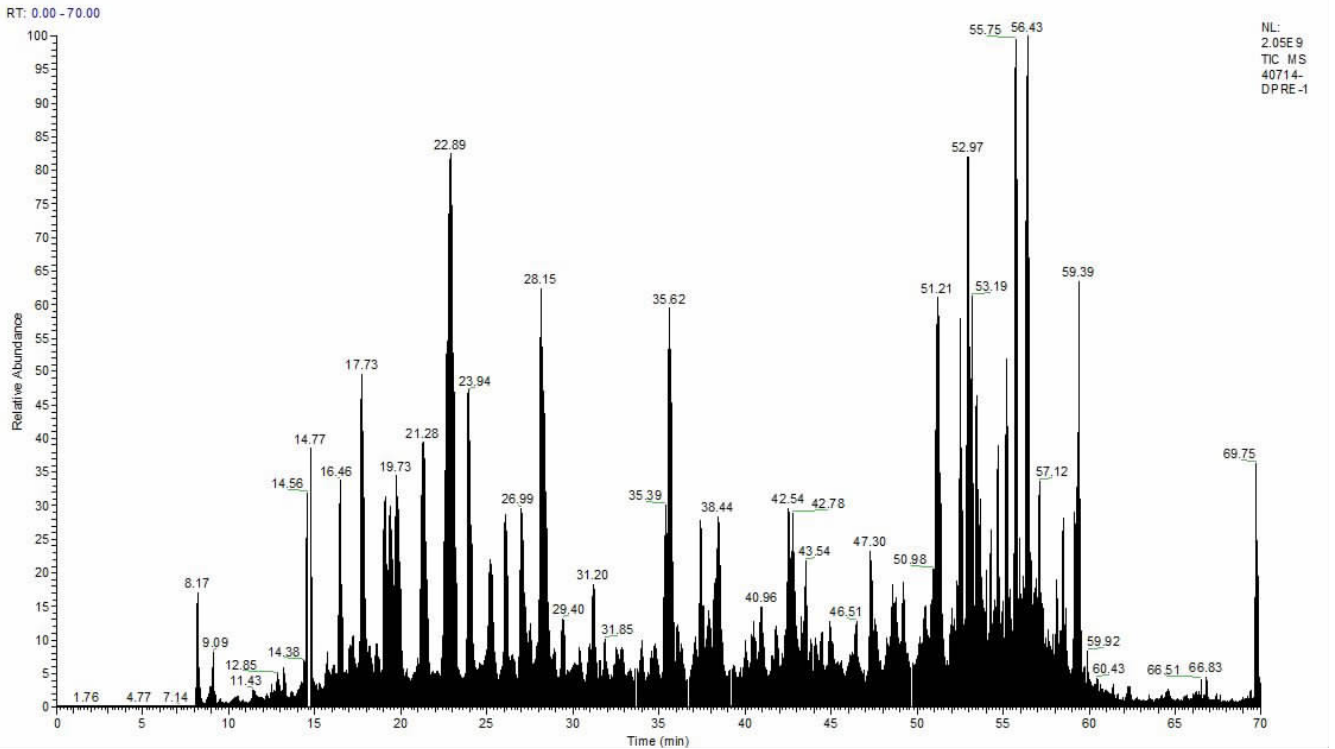
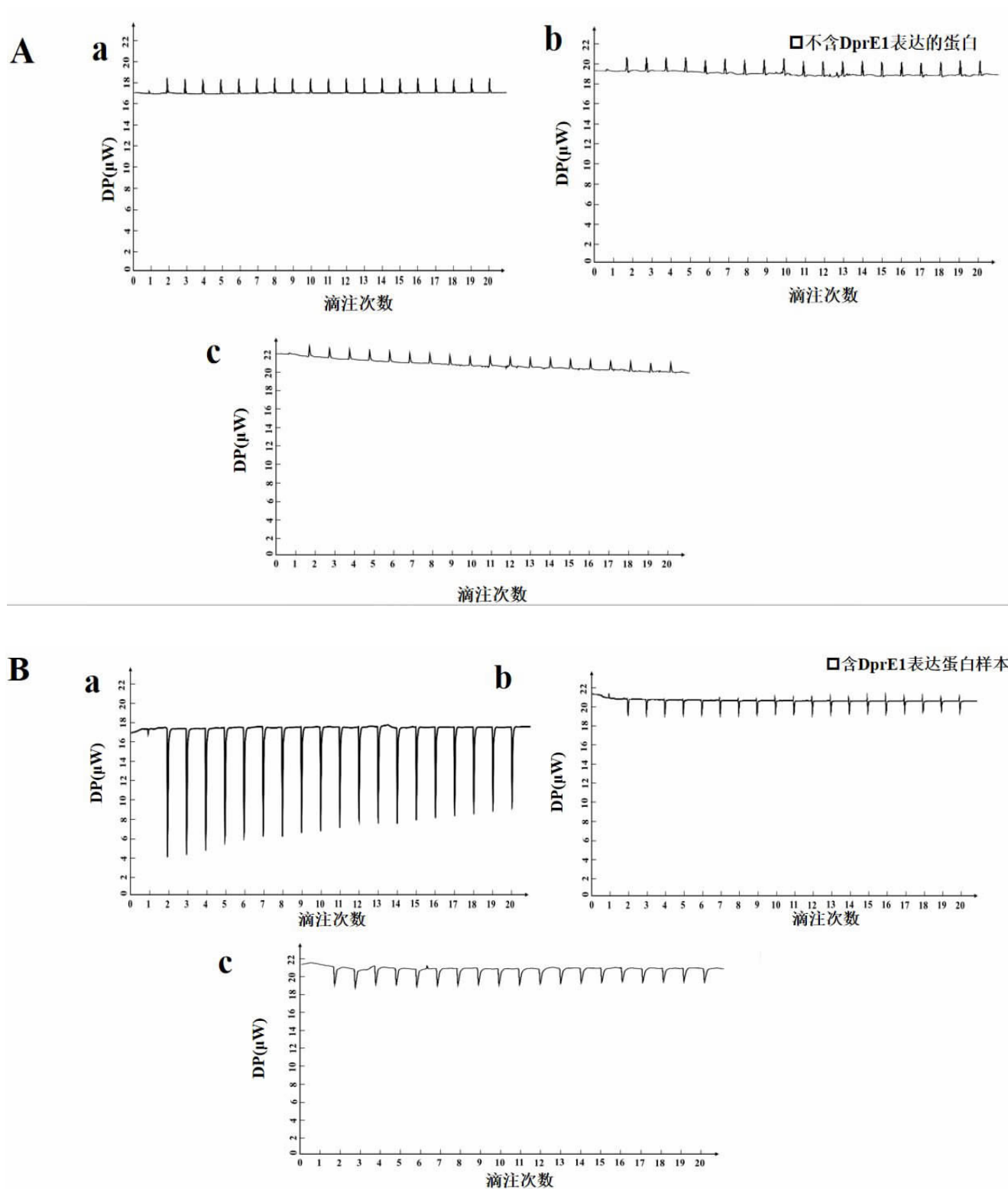


图 6 蛋白胶 TIC 总离子流图

Figure 6 Total Ion Chromatogram (TIC) of protein gel electrophoresis

2.6 OPC-167832 与 DprE1 蛋白计算机分子对接 在 DprE1 活性位点中,OPC-167832 与其对接需要范德华力、常规氢键、碳氢键,卤素(氟)、烷基、 π -烷基,表明该分子与 DprE1 稳定结合,见图 8。范德华力的分子间作用主要发生在 DprE1 蛋白的 Cys387、Phe369、Lys367、Lys134、Gly117、Gly133、Leu317 残基位点,常规氢键的分子间 DprE1 蛋白结合位点为: Asn385、Lys418、Gln336、Ser228、Typ314,碳氢键结合

位点主要位于 Pro316,氟化物氢键结合的位点则为 His132、Asn364,而 DprE1 蛋白的 Leu363、Typ230、Val365 结合位点发生烷基或 π -烷基的结合。其中,OPC-167832 中的 donor 基团与 DprE1 蛋白中的 acceptor 基团之间不匹配,所以 Asn385、Ser228、Typ314 和 Val365 位点发生的相互作用效果不佳或不稳定。



注:图 A 为不含 DprE1 蛋白样本滴定,a 为 OPC-167832,b 为 DMSO,c 为异烟肼;B 为含 DprE1 蛋白样本滴定,a 为 OPC-167832,b 为 DMSO,c 为异烟肼。

图 7 药物与 DprE1 蛋白相互作用的热量变化

Figure 7 Thermodynamic changes in the interaction between drugs and DprE1 protein

3 讨论

DprE1 是 MTB 细胞壁重要组成成分——阿拉伯半乳糖合成过程中的一个关键酶,参与 DPA 的合

成,对细菌的生存和繁殖起关键作用^[1]。自 2009 年被首次报道以来^[27],不仅引起了科学界的广泛关注,还拓展了药物研发领域的新思路。近年来,一系列 DprE1 抑制剂,包括苯并噻嗪酮类化合物^[28],喹啉

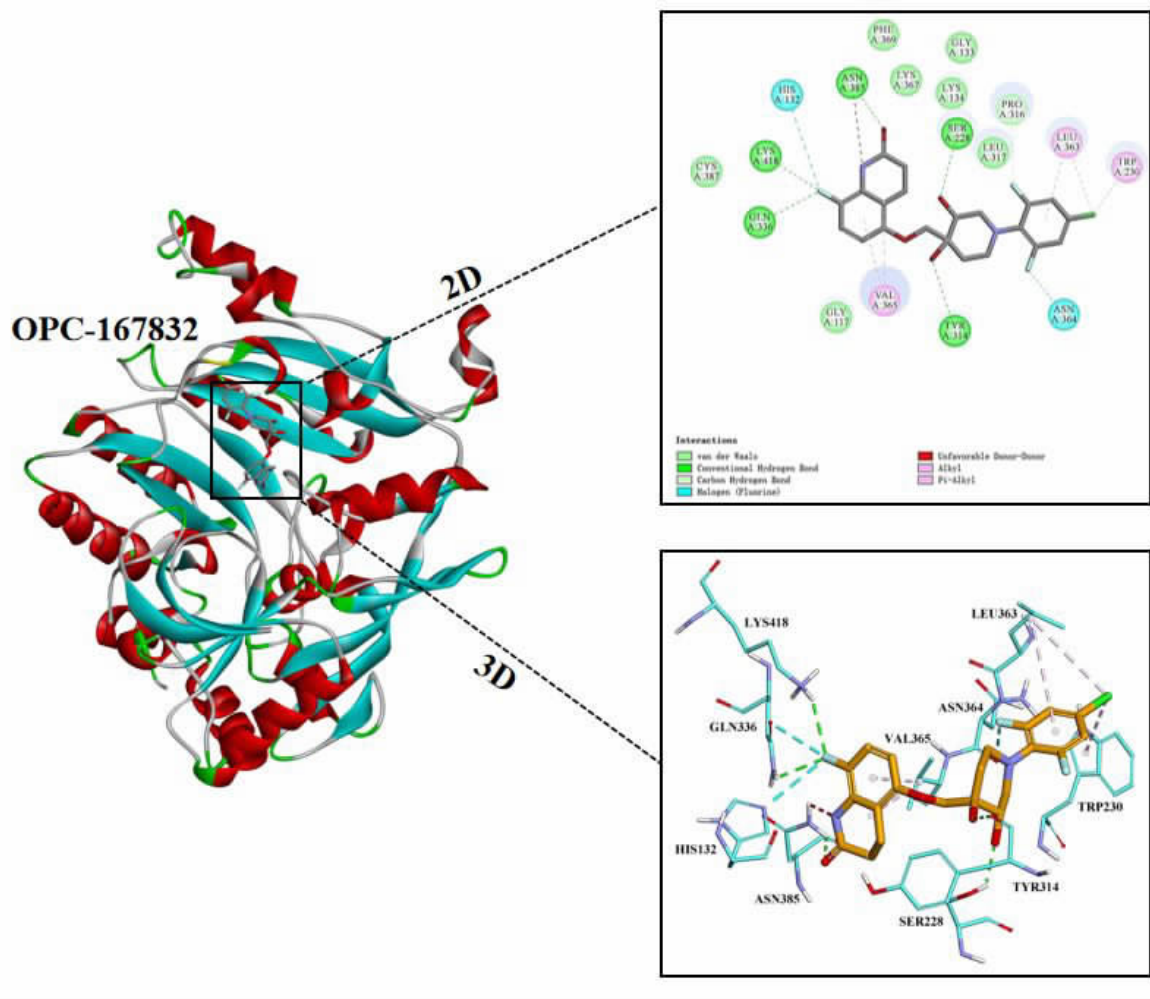


图 8 DprE1 和 OPC-167832 计算机对接结果

Figure 8 In silico docking results of DprE1 and OPC-167832

类^[29]、苯并噻唑类^[30]等抗结核化合物开发成功,人们看到了结核病治疗的新希望。这些抑制剂通过特异性地与 DprE1 酶结合,阻断其催化活性,从而有效地抑制了 MTB 的生长和繁殖^[12]。DprE1 作为抗结核药物的新靶点具有巨大的潜力和广阔的应用前景^[11]。然而,目前仅有 BTZ-043、PBTZ-169、TBA-7371、OPC-167832、BTZ038、TMC-207 等少部分药物处于临床开发阶段^[31]。现有的 DprE1 抑制剂存在代谢活性差、合成难度高、价格昂贵等问题^[32]。因此开发并筛选新的 DprE1 抑制剂,进行更好的临床应用迫在眉睫。

本文通过建立靶向 MTB 代谢关键酶 DprE1 的抗结核药物活性评价方法,为靶向 DprE1 抗结核药物的筛选及评价提供新的思路。DprE1 蛋白作为一种酶,需要在上清中大量表达以保持其活性,而非以包涵体的形式在沉淀中表达。经过深入研究并参考文献方法后,用 MTB 的 CPN60.2 替换 pGro7 中的大肠杆菌 GroEL,在 BL21 表达菌株共表达分子伴侣 pGro7-Rv0440 与 pET28a-Rv3790,以期提高目的蛋白在上清中的表达量^[28,33]。同时,改变 BL21 菌株的培

养温度、诱导剂(IPTG、阿拉伯糖)浓度等因素,最大程度避免合成缺乏生物学活性的包涵体^[34]。结果显示,目的蛋白的表达量显著提升,成功在上清中检测到可溶的 DprE1 目的蛋白条带。虽然只纯化出少量可溶性 DprE1 蛋白,但 ITC 等温滴定实验观察到 OPC-167832 与 DprE1 蛋白结合的热量变化。后续可进一步提高目的蛋白 DprE1 在上清中的表达和纯化量^[35]。Renhe Liu 等人^[23]研究表明 DprE1 抑制剂 TCA1 与 DprE1 残基 Lys418、His132 和 Ser228 之间以氢键结合,与 OPC-167832 同 DprE1 的残基结合位点相似,且与 His132 残基结合方式由氢键转变为氟化物氢键,相互作用更强。进一步可制备 DprE1 复合物衍射晶体,分析其与 OPC-167832 结合的构效关系^[12]。

综上所述,以 DprE1 蛋白为靶点的抗结核化合物展现出显著的优势,但溶解性差、价格昂贵、心脏毒性等诸多问题影响着其在临床的使用。因此,筛选并开发新型 DprE1 抑制剂对于缓解结核病治疗压力具有重要意义。本研究成功表达并纯化到可溶性 DprE1 蛋白,通过 ITC 分析其与 OPC-167832 的相互作用,

并结合计算机分子对接技术验证了 OPC-167832 与 DprE1 蛋白的结合模式。与传统的抗菌实验相比,本研究建立的方法不仅降低了生物安全风险,还更有利于初步阐明化合物的作用机制。研究结果初步证实了 ITC 等温滴定与计算机模拟联合技术在 DprE1 抑制剂筛选中的可行性,为基于 DprE1 靶点的抗结核药物开发提供了重要的实验依据和方法学支持。后续将扩大 DprE1 抑制剂筛选的范围,获得更多靶向 DprE1 酶的抑制剂,用于开发新的抗结核药物^[36-38]。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Wazahat R, Zaidi R, Kumar P. Epigenetic regulations in Mycobacterium tuberculosis infection [J]. The Indian Journal of Tuberculosis, 2024, 71(2): 204-212.
- [2] Vasiliu A, Martinez L, Gupta RK, et al. Tuberculosis prevention: current strategies and future directions [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2024, 30(9): 1123-1130.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2024[EB/OL]. [2025-04-25]. <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lunghealth/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>.
- [4] Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Infection Genetics and Evolution, 2016, 45: 474-492.
- [5] Chiang CY, Centis R, Migliori GB. Drug-resistant tuberculosis: past, present, future[J]. Respiriology, 2010, 15(3): 413-432.
- [6] Datta D, Jamwal S, Jyoti N, et al. Actionable mechanisms of drug tolerance and resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. FEBS Journal, 2024, 291(20): 4433-4452.
- [7] Farhat M, Cox H, Ghanem M, et al. Drug-resistant tuberculosis: a persistent global health concern [J]. Nature Reviews Microbiology, 2024, 22(10): 617-635.
- [8] Alsayed SSR, Gunosewoyo H. Tuberculosis: pathogenesis, current treatment regimens and new drug targets [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5202.
- [9] Dash S, Rathi E, Kumar A, et al. Structure-activity relationship mediated molecular insights of DprE1 inhibitors: A Comprehensive Review [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2024, 42(12): 6472-6522.
- [10] Kolly GS, Boldrin F, Sala C, et al. Assessing the essentiality of the decaprenyl-phospho-d-arabinofuranose pathway in Mycobacterium tuberculosis using conditional mutants [J]. Molecular Microbiology, 2014, 92(1): 194-211.
- [11] Yadav S, Soni A, Tanwar O, et al. DprE1 inhibitors: enduring aspirations for future antituberculosis drug discovery [J]. Chem Med Chem, 2023, 18(16): e202300099.
- [12] Batt SM, Jabeen T, Bhowruth V, et al. Structural basis of inhibition of Mycobacterium tuberculosis DprE1 by benzothiazinone inhibitors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(28): 11354-11359.
- [13] 马文俊. DprE1 酶抑制剂的设计、合成及生物活性测定[D]. 北京:北京化工大学,2021.
- [14] Ma WJ. Design, synthesis and biological activity detection of dpre1 enzyme inhibitors [D]. Beijing: University of Chemical Technology, 2021.(In Chinese)
- [15] Amado PSM, Woodley C, Cristiano MLS, et al. Recent advances of DprE1 inhibitors against mycobacterium tuberculosis: computational analysis of physicochemical and ADMET properties [J]. ACS Omega, 2022, 7(45): 40659-40681.
- [16] Imran M, A S A, Thabet HK, et al. Synthetic molecules as DprE1 inhibitors: A patent review [J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2021, 31(8): 759-772.
- [17] Chatterji M, Shandil R, Manjunatha MR, et al. 1,4-azaindole, a potential drug candidate for treatment of tuberculosis [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(9): 5325-5331.
- [18] Hariguchi N, Chen XH, Hayashi YH, et al. OPC-167832, a novel carbostyryl derivative with potent antituberculosis activity as a DprE1 inhibitor [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(6): e02020-19.
- [19] Clinical Trials. Safety and efficacy evaluation of 4-month regimen of OPC-167832, delamanid and bedaquiline in participants with drug-susceptible pulmonary TB [EB/OL]. [2025-04-25]. <https://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/NCT05221502/safety-and-efficacy-evaluation-of-4-month-regimen-of-opc-167832-delamanid-and-bedaquiline-in-participants-with-drug-susceptible-pulmonary-tb>.
- [20] Hu XP, Yang L, Chai X, et al. Discovery of novel DprE1 inhibitors via computational bioactivity fingerprints and structure-based virtual screening[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(6): 1605-1615.
- [21] Zhang G, Guo S, Cui H, et al. Virtual screening of small molecular inhibitors against DprE1[J]. Molecules, 2018, 23(3): 524.
- [22] Zhou YZ, Qiu ZQ, Dong BY, et al. Integrating computational and experimental approaches in discovery and validation of MmpL3 pore domain inhibitors for specific labelling of Mycobacterium tuberculosis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 279(2): 135212.
- [23] 许馨月, 东宝瑜, 李树华, 等. MTBRv3428c 重组蛋白表达与纯化及其单克隆抗体的制备 [J]. 现代预防医学, 2023, 50(6): 1111-1116.
- [24] Xu XY, Dong BY, Li SH, et al. Expression and purification of Rv3428c protein from Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) and preparation of its monoclonal antibody [J]. Modern Preventive Medicine, 2023, 50(6): 1111-1116.(In Chinese)
- [25] Liu RH, Lyu X, Batt SM, et al. Determinants of the inhibition of DprE1 and CYP2C9 by antitubercular thiophenes [J]. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2017, 56(42): 13011-13015.
- [26] Lv XL, Li WJ, Zhang M, et al. Investigation of steric hindrance effect on the interactions between four alkaloids and HSA by isothermal titration calorimetry and molecular docking [J]. Journal of Molecular Recognition, 2024, 37(2): e3075.
- [27] Upadhyay V, Lucas A, Patrick C, et al. Isothermal titration calorimetry and surface plasmon resonance methods to probe protein-protein interactions[J]. Methods, 2024, 225: 52-61.
- [28] Zhang MY, Zheng SQ. Network pharmacology and molecular dynamics study of the effect of the Astragalus-Coptis drug pair on diabetic kidney disease [J]. World Journal of Diabetes, 2024, 15(7): 1562-1588.

- 96-103.(In Chinese)
- [9] 梁达,商越,王兆芬,等. 青海省 2014-2019 年肺结核患者就诊延迟情况及影响因素 [J]. 中华疾病控制杂志,2021,25(7): 763-767.
- Liang D, Shang Y, Wang ZF, et al. Treatment-seeking delays and influencing factors among pulmonary tuberculosis patients in Qinghai Province, 2014-2019 [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2021, 25(7): 763-767.(In Chinese)
- [10] 吴塔娜,荣岩,曹文杰,等. 2011-2022 年内蒙古自治区肺结核发病变化趋势分析[J]. 疾病监测,2024,39(1):53-58.
- Wu TN, Rong Y, Cao WJ, et al. Incidence trend of pulmonary tuberculosis in Inner Mongolia Autonomous Region,2011-2022 [J]. Disease Surveillance, 2024, 39(1): 53-58.(In Chinese)
- [11] 税义超,张婷,钟吉元,等. 2016-2022 年重庆都市圈肺结核患者就诊延迟特征及影响因素分析[J]. 疾病监测,2024,39(10): 1282-1287.
- Shui YC, Zhang T, Zhong JY, et al. Analysis on medical care seeking delay in pulmonary tuberculosis patients and influencing factors in Chongqing metropolitan area,2016-2022 [J]. Disease Surveillance, 2024, 39(10): 1282-1287.(In Chinese)
- [12] 杨国锋,张宝莹,王健. 西藏 2012-2021 年学生肺结核患者就诊延迟及影响因素分析[J]. 西藏医药,2024,45(2):85-87.
- Yang GF, Zhang BY, Wang J. Treatment-seeking delays and influencing factors among student pulmonary tuberculosis patients in Tibet, 2012-2021[J]. Tibetan Medical Journal, 2024, 45(2): 85-87. (In Chinese)
- [13] 甄丽丽,路立勇,任艳,等. 2012-2021 年烟台市肺结核患者就诊延迟趋势及影响因素分析[J]. 现代预防医学,2024,51(8): 1507-1511, 1523.
- Zhen LL, Lu LY, Ren Y, et al. Health-care seeking delay and influencing factors of pulmonary tuberculosis patients,Yantai, 2012-2021 [J]. Modern Preventive Medicine, 2024, 51 (8): 1507-1511, 1523.(In Chinese)
- [14] Guo J, Feng YP, Liu ZD, et al. Analysis of factors influencing patient delay by patients with pulmonary tuberculosis in Lishui City, Zhejiang Province[J]. BMC Pulmonary Medicine, 2023, 23(1): 264.
- [15] Storla DG, Yimer S, Bjune GA. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis[J]. BMC Public Health, 2008, 8: 15.
- [16] 高敏,赵阿会,何梦雅,等. 2018-2021 年河南省周口市肺结核患者就诊和诊断延迟及影响因素分析[J]. 现代疾病预防控制, 2024,35(5):348-354.
- Gao M, Zhao AH, He MY, et al. Treatment-seeking and diagnostic delays and influencing factors among pulmonary tuberculosis patients in Zhoukou City, Henan Province, 2018 - 2021 [J]. Modern Disease Control and Prevention, 2024, 35(5): 348-354.(In Chinese)
- [17] 李佳琛,赵剑喜,白玉娥,等. 甘肃省肺结核就诊和诊断延误分析:2016-2022 年监测[J]. 疾病监测,2024,39(4):1003-9961.
- Li JC, Zhao JX, Bai YE, et al. Analysis of treatment-seeking and diagnostic delays among pulmonary tuberculosis patients in Gansu Province: Surveillance data from 2016 to 2022 [J]. Disease Surveillance, 2024, 39(4): 1003-9961.(In Chinese)

收稿日期:2025-01-06

(上接第 2089 页)

- [27] Christophe T, Jackson M, Jeon HK, et al. High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2'epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors[J]. PLOS Pathogens, 2009, 5(10): e1000645.
- [28] Foo CSY, Lechartier B, Kolly GS, et al. Characterization of DprE1-Mediated benzothiazinone resistance in mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60 (11): 6451-6459.
- [29] Neres J, Hartkoom RC, Chiarelli LR, et al. 2-Carboxyquinoxalines kill mycobacterium tuberculosis through noncovalent inhibition of DprE1[J]. ACS Chemical Biology, 2015, 10(3): 705-714.
- [30] Landge S, Mullick AB, Nagalapur K, et al. Discovery of benzothiazoles as antimycobacterial agents: Synthesis, structure-activity relationships and binding studies with Mycobacterium tuberculosis decaprenylphosphoryl- β -D-ribose 2'-oxidase [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 23(24): 7694-7710.
- [31] Dash S, Rathi E, Kumar A, et al. Identification of DprE1 inhibitors for tuberculosis through integrated in-silico approaches[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 11315.
- [32] Mali SN, Pandey A, Bhandare RR, et al. Identification of hydantoin based Decaprenylphosphoryl- β -D-Ribose Oxidase (DprE1) inhibitors as antimycobacterial agents using computational tools[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 16368.
- [33] Makarov V, Lechartier B, Zhang M, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next Generation benzothiazinones [J]. EMBO Molecular Medicine, 2014, 6(3): 372-383.
- [34] Singhvi P, Saneja A, Srichandan S, et al. Bacterial inclusion bodies: a treasure trove of bioactive proteins [J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(5): 474-486.
- [35] Okitsu K, Misawa TKH, Shoda T, et al. Development of an ON/OFF switchable fluorescent probe targeting His tag fused proteins in living cells [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(15): 3417-3422.
- [36] Gong Z, Hu GP, Li Q, et al. Compound libraries: recent advances and their applications in drug discovery [J]. Current Drug Discovery Technologies, 2017, 14(4): 216-228.
- [37] John L, Nagamani S, Mahanta HJ, et al. Molecular property diagnostic suite compound library (MPDS-CL): a structure-based classification of the chemical space [J]. Molecular Diversity, 2024, 28 (5): 3243-3259.
- [38] Van vlijmen H, Ortholand JY, Li VMJ, et al. The European Lead factory: an updated HTS compound library for innovative drug discovery[J]. Drug Discovery Today, 2021, 26(10): 2406-2413.

收稿日期:2025-02-18