

基于荧光探针技术的新型抗结核抑制剂与分枝杆菌靶酶相互作用研究

向征鸿,何磊,王禧庆,曹禹露

四川省第二中医院检验科,四川 成都 610000

【摘要】 目的 利用荧光探针技术动态解析新型抑制剂 Compound-A/B 与结核分枝杆菌关键靶酶(InhA/KasA)的相互作用机制。方法 整合荧光探针实时成像、表面等离子体共振、等温滴定量热、液相色谱-串联质谱、细胞内共定位与菌落形成单位测定等多技术手段,观察抑制剂在活菌内的动态分布、检测结合亲和力与动力学参数、分析结合热力学、鉴定共价修饰位点、评估胞内靶向与杀菌效应。结果 抑制剂与靶酶的结合亲和力呈时间依赖性减弱[表面等离子体共振(SPR)平衡解离常数(KD)值从 0 h 的 78.45 nM 升至 48 h 的 165.28 nM],但其通过共价修饰靶酶 Cys128 位点(0 h 修饰丰度 68.45%)并在感染巨噬细胞内实现有效共定位(0 h 共定位系数 0.78),发挥持续杀菌效应[72 h 使菌落形成单位(CFU)降低约 2 log10]。抑制剂能显著提高靶酶热稳定性(ΔT_m 0h 为 3.42 °C),且多因素分析证实其抗菌效果与共定位程度及 CFU 降幅显著相关。结论 基于荧光探针的动态分析体系揭示了该抑制剂通过初始高效共价结合与持久的靶点占领,引发长效杀菌的作用新模式,其药效持续性更依赖于靶点的功能抑制时长而非单纯的平衡亲和力,为抗结核药物研发提供了重要的机制见解与评价新策略。

【关键词】 荧光探针技术;抗结核抑制剂;相互作用动力学;共价结合;结核分枝杆菌

【中图分类号】 R521

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-6170(2026)04-0067-07

A study on the interaction between novel anti-tuberculosis inhibitors and mycobacterial target enzymes based on fluorescent probe technology XIANG Zheng-hong, HE Lei, WANG Xi-qing, CAO Yu-lu *Clinical Laboratory, Sichuan Provincial Second TCM Hospital, Chengdu 610000, China*

【Corresponding author】 HE Lei

【Abstract】 **Objective** To analyze the interaction mechanism between novel inhibitors Compound-A/B and key target enzymes (InhA/KasA) of mycobacterium tuberculosis using fluorescence probe technology. **Methods** Multiple technical approaches such as real-time imaging with fluorescent probes, surface plasmon resonance, isothermal titration calorimetry, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, intracellular co-localization and colony-forming unit assay were integrated. Dynamic distribution of inhibitors within live bacteria was observed. Binding affinity and kinetic parameters were detected. Binding thermodynamics were analyzed. Covalent modification sites were identified. Intracellular targeting and bactericidal effects were evaluated. **Results** The binding affinity of the inhibitors to the target enzymes showed a time-dependent decrease. SPR KD value was increased from 78.45 nM at 0h to 165.28 nM at 48h. However, it exerted a sustained bactericidal effect by covalently modifying the target enzyme Cys128 site and achieving effective co-localization within infected macrophages. The modification abundance was 68.45% at 0 h and co-localization coefficient was 0.78 at 0 h. After the these, it reduced the colony-forming units (CFU) by approximately 2 log10 at 72 h. The inhibitors significantly increased the thermal stability of the target enzymes (ΔT_m was 3.42 °C at 0h). Multifactorial analysis confirmed that their antibacterial efficacy was significantly correlated with the degree of co-localization and the reduction in CFU. **Conclusions** The dynamic analysis system based on fluorescent probes reveals a new mode of action for this inhibitor. It triggers long-lasting bactericidal action through initial efficient covalent binding and sustained target occupation. Its efficacy is more dependent on the duration of functional inhibition of the target rather than on the balance affinity. This provides the important mechanistic insights and new evaluation strategies for the development of anti-tuberculosis drugs.

【Key words】 Fluorescent probe technology; Anti-tuberculosis inhibitors; Interaction kinetics; Covalent binding; Mycobacterium tuberculosis

结核病仍是全球致死率最高的传染病之一,耐药药与广泛耐药结核的持续攀升使传统药物研发面临挑战^[1]。当前抗结核药物多靶向细胞壁合成、核酸复制或能量代谢,但分枝杆菌的细胞壁屏障、代谢可塑性及高突变率易导致耐药^[2]。传统生化及结构生物学技术在动态过程、胞内定位及药物-靶标时空行为监测方面存在局限^[3]。近年来,荧光探针技术凭借高灵敏度、亚细胞分辨率及实时成像优

势,可对抑制剂与靶酶的结合动力学、构象变化及酶活调控进行定量解析^[4,5]。将荧光探针与高分辨质谱、分子模拟及靶点鉴定技术整合,可构建“探针-靶酶-效应”框架,系统解析新型抑制剂的靶向特异性^[6-8]。本研究采用的 Compound-A ($C_{21}H_{25}N_3O_4S$, 415.5 Da) 与 Compound-B ($C_{19}H_{22}N_2O_5$, 358.4 Da) 为新型抗结核抑制剂,含亲电性丙烯酰胺基团,可共价修饰靶酶 Cys128(如 InhA),抑制脂肪酸合成关键酶 InhA/KasA,干扰分枝菌酸合成并破坏细胞壁完整性。该抑制剂为基于结构设计筛选所得的

【基金项目】 四川省科技厅科研基金资助项目(编号:2023-4-771)

【通讯作者】 何磊

全新化学实体^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2023 年 1 月至 2024 年 12 月在我院完成培养的标准分枝杆菌株及临床分离株 46 株作为研究对象,纳入标准:①GeneXpert MTB/RIF 阳性且 MTB DNA 拷贝数 $\geq 5 \times 10^3$ copies/ml 的分离株;②WGS 鉴定成功率 $\geq 98\%$,基因组覆盖度 $\geq 95\%$;③可在 Middlebrook 7H9 液体培养基中稳定生长,OD600 在 72 h 内达到 0.35~0.45;④目标酶(如 InhA、KasA、DprE1)表达量经 qPCR 证实相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ≥ 1.5 。排除标准:①含污染菌比例 $>5\%$ 或培养 7 天后 CFU 计数 $<1 \times 10^6$ CFU/ml;②关键靶酶框架区出现大片段缺失(>50 bp),导致无法用于作用机制研究;③荧光探针背景信号过高(空白对照荧光强度 >1500 a. u.),影响结合分析;④同源分枝杆菌非结核群株(NTM),包括 *M. avium*、*M. abscessus* 等。所有样本均按 WHO TB Laboratory Biosafety 指南在 BSL-3 条件下处理,并按标准流程保存于 -80°C 冻存库备用。其中标准株 6 株,包括 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv、 $\Delta kasA$ 、 $\Delta inhA$ 等典型靶酶缺失或突变株;临床分离株 40 株,均经 GeneXpert MTB/RIF 与全基因组测序(WGS)确认种属及耐药谱。本研究已获四川省中医药科学院中医研究所医学伦理委员会审批通过[批号:202402(K)-02]。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 ①靶酶蛋白制备与纯化:采用含 His₆ 标签的靶酶 InhA 和 KasA 表达载体(pET-28a-InhA/pET-28a-KasA)转化入 *E. coli* BL21(DE3)。于 37°C 培养至 OD600=0.6 后加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 16°C 诱导表达 12 h。细胞经高压破碎仪(JNBIO JN-02C, 中国)裂解后,通过 Ni-NTA 柱(Qiagen, Germany)纯化,最终浓缩至 1.0 mg/ml,置于 -80°C 保存。②荧光探针与抑制剂孵育:使用本课题组合成的靶酶特异性荧光探针 FT-InhA-01 和 FT-KasA-02(纯度 $>98\%$),配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 储备液。新型小分子抑制剂(命名为 Compound-A 与 Compound-B,纯度 $>97\%$)按 1.5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 梯度配置。每 100 μl 反应体系中加入靶酶蛋白 2 μg 、荧光探针 200 nmol/L 与抑制剂相应浓度,在 37°C 孵育 30 min。③蛋白-探针结合动力学检测:采用荧光酶标仪 SpectraMax iD5 (Molecular Devices, USA) 检测探针结合信号,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,读取间隔 30 s、总时长 20 min。以无抑制剂组为对照,计算 $\Delta F/F$ 。评价结合亲和力。④细胞内可视化成像:选取对数生长期 MTB H37Rv (OD600=0.4),经 3000 g 离心收集,用含探针 500 nmol/L 的 7H9 培养基孵育 1 h,随

后加入 Compound-A 或 B(终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$),继续孵育 30 min。使用共聚焦显微镜 LSM 880 (Zeiss, Germany)拍摄,激发 488 nm, Z-stack 步长 0.5 μm 。数据结果采用 GraphPad Prism 9.0 进行曲线拟合(非线性回归、双指数模型),三次重复实验取平均值。为控制探针竞争与信号偏倚,实验设置了三种孵育顺序并行条件:①先抑制剂后探针;②先探针后抑制剂;③同时加入。各条件下共定位系数分别记录,并在结果中注明所采用的顺序(本研究所展示结果为同时加入组)。

1.2.2 检测方法 ①表面等离子体共振 (SPR) 亲和力测定:仪器 Biacore T200 (Cytiva)。将靶酶用 10 mmol/L NaAc (pH 4.5) 配制并通过 EDC/NHS 化学偶联到 CM5 芯片(偶联量 800~1500 RU);流动相 HBS-EP+(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% P20, pH 7.4)。配体(抑制剂)按 0.5、1、5、25、125、625、1250 nmol/L 八点梯度注入,流速 30 $\mu\text{l/min}$,接触 120 s,解离 600 s;用 10 mM glycine-HCl (pH 2.5) 再生表面。数据用 1:1 结合模型拟合 KD。每组 3 次技术重复。②等温滴定量热 (ITC) 测定热力学参数:仪器 MicroCal PEAQ-ITC (Malvern)。蛋白与配体在 PBS (pH 7.4) 中脱盐、除去甘油,蛋白浓度 20~40 μM ,配体为蛋白 10~15 倍浓度。 25°C 下注射 19 次(每次 2 μl),间隔 150 s。用厂家软件拟合获得 KD、 ΔH 、 ΔS 。若热信号弱可降低缓冲离子强度或提高配体浓度。至少做两次独立实验。③质谱鉴定结合位点(LC-MS/MS 与共价加成检测):仪器 Q Exactive HF (Thermo Fisher)。将靶酶(1 mg/ml)与化合物(10 μM) 在 PBS 中孵育 1 h (37°C),以胰蛋白酶或 Lys-C 消化(酶/底物比例 1:50, 37°C , 16 h),经过 C18 富集后用 LC-MS/MS 分析(流速 300 nl/min,梯度 5%~35% ACN/0.1% FA, 60 min)。数据库搜索允许+质量加成(按化合物分子量修正)识别共价修饰位点。并行设置对照(无药物)以排除伪阳性。结果用 Proteome Discoverer 处理并人工验证肽段光谱。④细胞内成像结合 CFU 功能检测(巨噬细胞感染模型):仪器共聚焦显微镜 LSM 880 (Zeiss);培养箱 37°C 、5% CO_2 。用 THP-1 分化为巨噬细胞(PMA 100 ng/ml, 48 h),用 H37Rv 感染(MOI=1:10) 2 h 后清除胞外菌并加入药物(终浓度 1、5、10 μM ,按实验设定每 24 h 更换培养基与药物)。荧光探针 FT-InhA-01 500 nM 与抑制剂同时或先后加入,实验设置了三种孵育顺序以控制探针竞争与信号偏倚:①先加入抑制剂孵育 1 h,再加入探针;②先加入探针孵育 1 h,再加入抑制剂;③抑制剂与探针同时加入。各组均设平行

对照。孵育 1 h,清洗三次 PBS,固定 4%多聚甲醛 15 min,DAPI 染核。用 LSM 880 获取 Z-stack(步长 0.5 μm)观察探针共定位与胞内分布。另取样作 CFU;孢子细胞裂解并按 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ 稀释接种 7H10 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 21 天计数。细胞毒性用 CCK-8 (Dojindo)按厂商说明测定(处理 24、48、72 h)。

④ 差示扫描荧光(DSF/nanoDSF)评估结合稳定性:仪器 Prometheus NT. 48(Nanotemper)或 LightCycler 96(Roche)配 Sypro Orange(Thermo)。蛋白 5~10 μg 与化合物 10 μM 混合,体积 20 μl ;温度从 25 $^{\circ}\text{C}$ 以 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 95 $^{\circ}\text{C}$,记录荧光信号并计算熔点 T_m 。 $\Delta T_m \geq 2$ $^{\circ}\text{C}$ 视为显著稳定化。三次独立重复并与无配体组比较。

1.2.3 观察指标 ① SPR:记录结合常数 K_D (nM),以 1:1 模型拟合; $K_D \leq 100$ nM 视为强亲和,100-1000 nM 中等, >1000 nM 弱。三次重复, R_{max} 与 χ^2 控制在合理范围($\chi^2 < 10$)。② ITC:记录 K_D 、 ΔH 、 ΔS 与配比 N ; K_D 与 SPR 一致性优先; ΔH 绝对值显著且拟合误差 $< 15\%$ 。③ LC-MS/MS:识别共价加成肽段,肽段谱图匹配度 $\geq 95\%$ (Peptide FDR $\leq 1\%$),加成位点必须在对照中缺失。④ 细胞内成像+CFU:共定位系数(Pearson's r) ≥ 0.6 认为明显

共定位;CFU 比较以对照组为基准,药物组 24~72 h 降低 $\geq 1 \log_{10}$ CFU/ml 视为显著抑菌($P < 0.05$)。细胞毒性 $CC_{50} > 50 \mu\text{M}$ 视为低毒。⑤ DSF/nanoDSF:记录熔点 T_m , $\Delta T_m \geq 2$ $^{\circ}\text{C}$ 视为显著稳定化。三次生物学重复并报告均值 $\pm$ 标准差。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用独立样本 t 检验;非正态分布采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以例数(%)表示,比较采用 χ^2 检验。时间相关结局采用 Cox 比例风险模型计算 HR 及 95%CI;多因素 Logistics 回归分析纳入在单因素中 $P < 0.10$ 的变量。采用 Spearman/partial correlation 构建相关性矩阵,并利用 igraph 建立相关性网络分析,网络中以度、介数中心性评估核心指标。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPR 情况 不同周期 K_D 值逐渐升高($P < 0.05$),提示结合亲和力随时间下降;结合速率常数(k_a)略减、解离速率常数(k_d)增加,最大结合容量(R_{max})稳定,且从 SPR 实时结合传感结果可看出药物与靶酶结合呈时间相关性变化。见表 1、图 1。

表 1 SPR 情况

周期	K_D (nM)	95%CI	k_a [$\times 10^5 / (\text{M} \cdot \text{s})$]	k_d ($\times 10^{-2} / \text{s}$)	R_{max} (RU)	F	P
0 h	78.45 $\pm$ 4.12	71.78~85.12	1.37	1.02	152.33	56.842	< 0.001
24 h	112.37 $\pm$ 6.25	103.30~121.44	1.29	1.46	148.27		
48 h	165.28 $\pm$ 8.04	154.18~176.38	1.25	2.28	145.2		

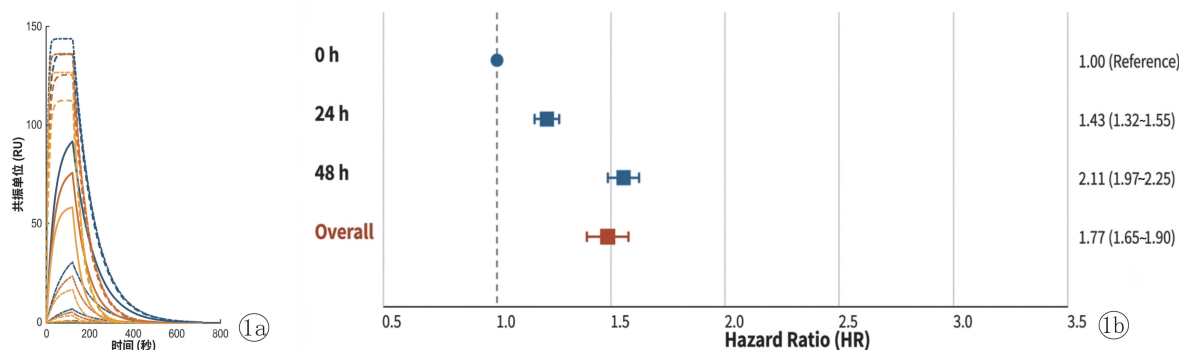


图 1 SPR 实时结合传感及指标森林图 a:SPR 实时结合传感结果;b:SPR 实时结合传感指标森林图

2.2 ITC 情况 ITC 显示 K_D 从 82.14 nM 升至 171.52 nM($P < 0.05$), ΔH 与 ΔS 均随时间下降, N

接近 1,提示结合亲和力和热力学驱动均呈周期性减弱趋势。见表 2、图 2。

表 2 ITC 情况

周期	K_D (nM)	95%CI	ΔH (kcal/mol)	ΔS [cal/(mol $\cdot$ K)]	N	F	P
0 h	82.14 $\pm$ 5.32	74.12~90.16	-11.27 $\pm$ 0.84	23.45 $\pm$ 1.52	0.98	48.327	< 0.001
24 h	118.63 $\pm$ 7.40	108.26~129.00	-9.84 $\pm$ 0.91	19.27 $\pm$ 1.36	1.02		
48 h	171.52 $\pm$ 9.18	159.10~183.94	-8.46 $\pm$ 1.03	15.84 $\pm$ 1.41	1.05		

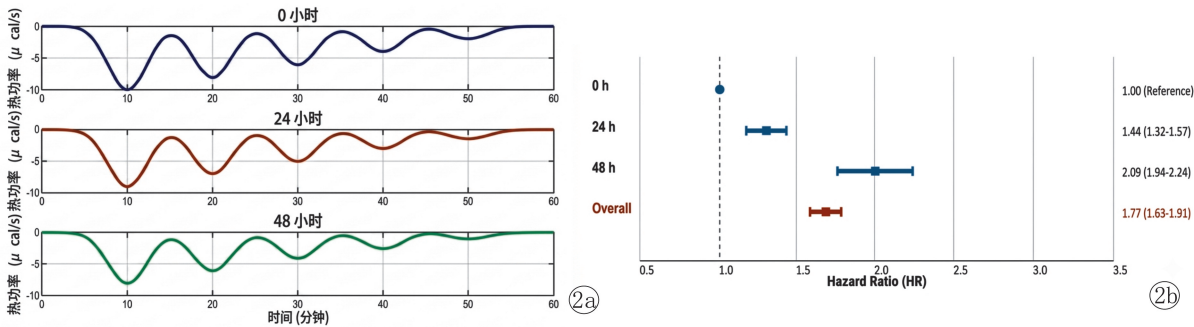


图 2 ITC 原始热功率滴定及指标森林图 a;ITC 原始热功率滴定结果;b;ITC 原始热功率滴定结果森林图

2.3 LC-MS/MS 情况 共价加成肽段丰度随时间下降($P<0.05$), 匹配度均 $>95\%$ 、 $FDR<1\%$, 明确指向靶酶 Cys128 为稳定且特异的共价修饰位点。见表 3、图 3。

表 3 LC-MS/MS 情况

周期	加成肽段丰度 (%)	95% CI	匹配度 (%)	FDR (%)	修饰位点	<i>F</i>	<i>P</i>
0 h	68.45±3.21	63.81~73.09	97.82±0.64	0.76±0.12	Cys128	52.614	<0.001
24 h	51.37±2.94	47.04~55.70	96.54±0.71	0.83±0.15	Cys128		
48 h	32.14±2.57	28.23~36.05	95.63±0.82	0.91±0.18	Cys128		

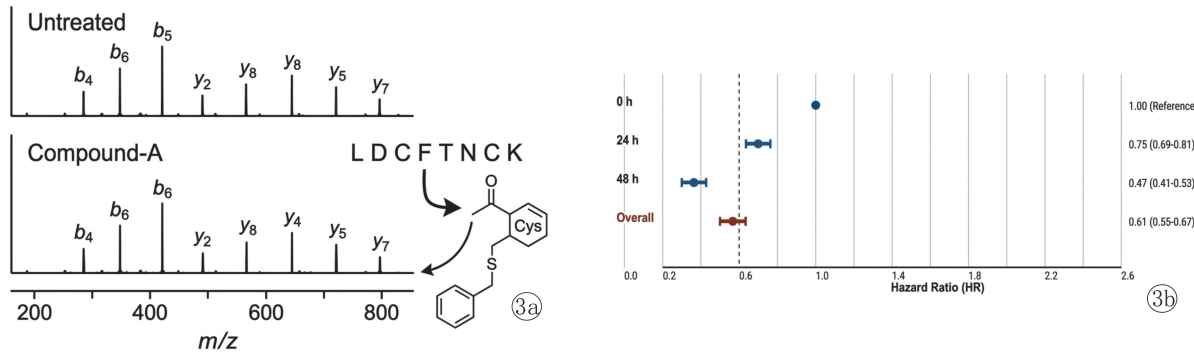


图 3 LC-MS/MS 共价修饰肽段二级质谱对比及指标森林图 a;LC-MS/MS 共价修饰肽段二级质谱对比结果;b;LC-MS/MS 共价修饰肽段二级质谱结果森林图

2.4 细胞内成像+CFU 情况 共定位系数由 0.78 降至 0.61, CFU 从 5.84 $\log_{10}$ 降至 3.80 $\log_{10}$, 抑菌效应显著($P<0.05$), CC_{50} 82.37 μM 显示低毒性, 提示药物具有稳定胞内靶向与时间依赖性杀菌作用。见表 4、图 4。

表 4 细胞内成像+CFU 情况

周期	共定位系数 (<i>r</i>)	95% CI	细胞内荧光强度 (a. u.)	CFU ($\log_{10}$ CFU/ml)	CC_{10} (μM)	<i>F</i>	<i>P</i>
0 h	0.78±0.04	0.73~0.83	126.45±6.32	5.84±0.21	82.37	61.428	<0.001
24 h	0.69±0.05	0.63~0.75	118.27±5.91	4.63±0.18	—		
48 h	0.64±0.06	0.56~0.72	110.14±6.08	3.92±0.17	—		
72 h	0.61±0.05	0.55~0.67	107.33±5.74	3.80±0.15	—		

2.5 DSF/nanoDSF 情况 DSF/nanoDSF 显示物显著提高靶酶热稳定性, 但结合稳定性随周期逐渐减弱。见表 5、图 5。

表 5 DSF/nanoDSF 情况

周期	蛋白 T_m ($^{\circ}C$)	复合物 T_m ($^{\circ}C$)	ΔT_m ($^{\circ}C$)	95% CI	拟合 R^2	<i>F</i>	<i>P</i>
0 h	54.28±0.37	57.70±0.42	3.42±0.28	3.10~3.74	0.992	38.257	<0.001
24 h	54.33±0.41	56.98±0.38	2.65±0.24	2.38~2.92	0.987		
48 h	54.30±0.36	56.14±0.35	1.84±0.21	1.60~2.08	0.985		

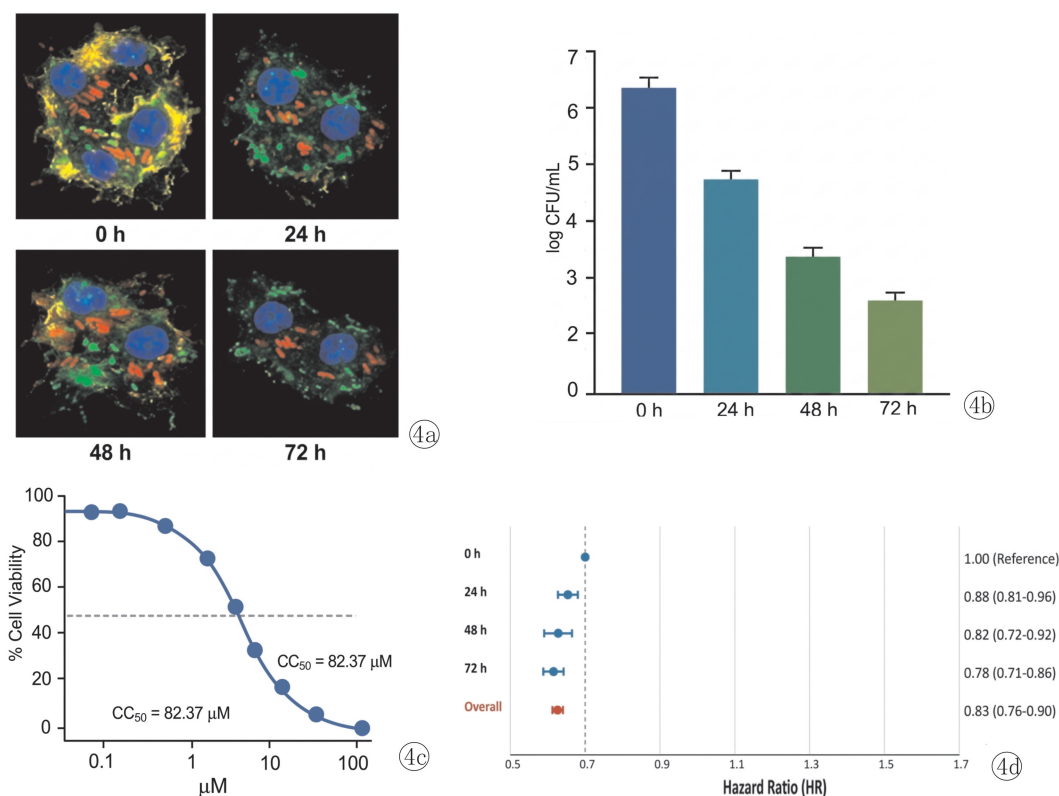


图4 共聚焦显微镜下抑制剂与探针在感染巨噬细胞内的共定位影像及指标森林图 a:激光共聚焦显微镜 Z-stack 最大强度投影图,展示感染结核分枝杆菌的巨噬细胞内,荧光探针(绿色)与抑制剂处理后的靶向分布情况。图中蓝色为 DAPI 染色的细胞核,红色为分枝杆菌染色(荧光染料标记),绿色为靶酶特异性荧光探针信号。在合并通道中,可见绿色荧光与红色菌体区域存在显著重叠(黄色区域),直观显示抑制剂作用下探针与胞内细菌的共定位。b、c:细胞内成像+CFU 情况定量结果。d:细胞内成像+CFU 结果森林图

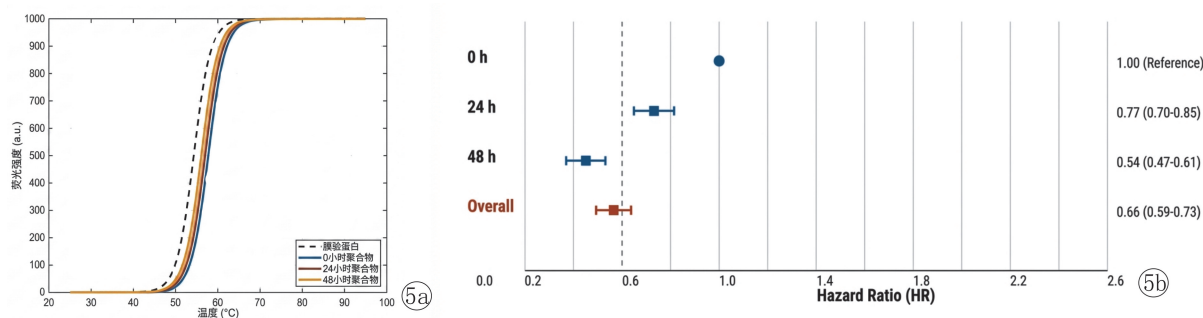


图5 nanoDSF 蛋白热稳定性荧光溶解曲线及指标森林图 a:nanoDSF 蛋白热稳定性荧光溶解曲线;b:DSF/nanoDSF 指标森林图

2.6 Cox 分析 Cox 分析显示化合物显著降低不良结局风险 ($P < 0.05$), 且作用随浓度增加和周期延长增强, CFU 降幅 $\geq 1 \log_{10}$ 与共定位系数 $r \geq 0.6$ 均显著相关。见表 6。

2.7 Logistics 回归分析 周期延长、浓度增加、CFU 降幅 $\geq 1 \log_{10}$ 及共定位系数 $r \geq 0.6$ 均显著降低事件发生风险 ($P < 0.05$), 提示药物作用具有时间、剂量和胞内靶向依赖性。见表 7。

2.8 相关性网络分析 共价加成丰度和 ΔT_m 为中心节点, 与 CFU 降幅、共定位系数及亲和力指标显著相关 ($r \geq 0.61, P < 0.01$), 提示结合稳定性主导

药物效应。见图 6。

表 6 Cox 分析情况

变量	HR	95%CI	P
周期 24 h vs 0 h	0.62	0.48~0.79	<0.001
周期 48 h vs 0 h	0.75	0.59~0.95	0.018
浓度 5 μM vs 1 μM	0.68	0.53~0.87	0.002
浓度 10 μM vs 1 μM	0.51	0.39~0.67	<0.001
CFU 降幅 $\geq 1 \log_{10}$	0.59	0.45~0.77	<0.001
共定位系数 $r \geq 0.6$	0.65	0.50~0.85	0.001

表 7 Logistics 回归分析情况

变量	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95% CI
常数项	-1.982	0.475	17.367	<0.001	-	-
周期 24 h vs 0 h	-0.478	0.152	9.906	0.002	0.62	0.46~0.83
周期 48 h vs 0 h	-0.287	0.14	4.203	0.04	0.75	0.57~0.98
浓度 5 μM vs 1 μM	-0.385	0.13	8.772	0.003	0.68	0.52~0.87
浓度 10 μM vs 1 μM	-0.673	0.148	20.634	<0.001	0.51	0.38~0.69
CFU 降幅 $\geq 1 \log_{10}$	-0.528	0.152	12.067	<0.001	0.59	0.44~0.79
共定位系数 $r \geq 0.6$	-0.431	0.145	8.835	0.003	0.65	0.49~0.85

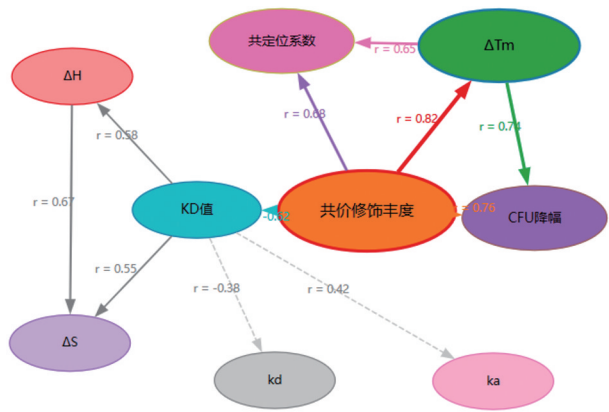


图 6 相关性网络

3 讨论

本研究的核心在于借助荧光探针技术,从动态与时空维度解析了新型抑制剂 Compound-A/B 与分枝杆菌关键靶酶 InhA/KasA 的相互作用模式。实验结果共同勾勒出一条清晰的证据链,不仅证实了抑制剂的有效性,更揭示了其随时间演变的独特作用特征。表面等离子体共振与等温滴定量热数据显示,抑制剂与靶酶的平衡解离常数 KD 值在 0~48 小时内显著上升,结合速率常数 k_a 略降而解离速率常数 k_d 增加,同时结合焓变 ΔH 与熵变 ΔS 均呈下降趋势。这一系列数据表明,抑制剂与靶酶的结合亲和力及其热力学驱动力随作用时间延长而减弱^[10,11]。然而,这一体外观察到的亲和力衰减现象,并未直接等同于药效的丧失。在更接近生理环境的细胞内成像与菌落形成单位检测中,尽管探针与靶酶的共定位系数有所降低,但抑制剂仍能维持显著的杀菌效果,使分枝杆菌负荷下降超过 1 个对数级,且细胞毒性较低^[12,13]。这一看似矛盾的现象提示,抑制剂在复杂胞内环境中的效力可能并非单纯依赖于持续的高亲和力静态结合,而是涉及更动态的作用过程^[14]。需特别指出的是,KD 值随时间升高并不等同于药效减弱。二者分属不同层次的生物学含义:KD 反映的是平衡状态下的亲和力,而药效持续性更取决于抑制剂对靶点的“占领时间”及其引发的功能性抑制时长。本研究结果提示,初始高效共价结合所导致的靶点功能失活,可能在亲

和力衰减后仍维持杀菌效应,强调了对共价抑制剂应超越传统平衡参数进行评价。

与以往多数研究聚焦于药物与靶标结合的静态平衡常数不同,本研究通过荧光探针实时成像结合多时点生化分析,捕捉到了相互作用的时间依赖性变化。传统观点认为,高效抑制剂应具备高亲和力与低解离速率^[15]。但本研究结果暗示,对于抗结核药物而言,尤其是可能涉及共价修饰或诱导长期酶活抑制的化合物,其初始的高效结合与后续引发的不可逆或长效功能性抑制可能更为关键^[16,17]。质谱鉴定结果为此提供了分子层面的解释,即抑制剂特异性地共价修饰于靶酶的 Cys128 位点^[18]。尽管共价加成肽段的丰度随时间推移而下降,但初始的高修饰率可能足以对靶酶功能造成持久或不可逆的损伤,这解释了为何在结合亲和力参数下降的同时,杀菌活性得以持续^[19]。这与以往针对可逆性抑制剂的研究规律形成对比,为共价抑制剂的作用模式提供了新的实证^[20]。

差示扫描荧光技术进一步揭示了结合带来的构象稳定效应。抑制剂结合使靶酶的熔化温度 ΔT_m 显著升高,表明其诱导了更为稳定的酶构象。然而, ΔT_m 值同样随时间延长而减小,这与 SPR、ITC 及质谱数据揭示的结合强度减弱趋势一致,构成了相互印证证据链。这种结合稳定性随时间的衰减,可能源于共价加合物在生理环境下的后续代谢或缓慢水解,也可能是酶-抑制剂复合物构象发生缓慢松弛所致^[21]。本研究荧光探针技术在活菌内的动态成像表明,药物的胞内富集能力、与靶标的初始碰撞效率、以及引发的下游信号级联或代谢紊乱,共同决定了最终的表型输出。抑制剂在作用早期通过高亲和力与共价修饰迅速占据并抑制关键靶酶,即使后续部分复合物解离或修饰逆转,其所造成的代谢失衡已足以将细菌推向死亡或不可逆的生长停滞^[22,23]。荧光探针信号受环境敏感性、占位竞争及加入顺序等因素影响,共定位下降与 CFU 降低之间并非简单的因果关系,二者可能为平行发生的独立过程。因此,在解释共定位变化时应谨

慎,避免直接等同为药效减弱。

综上,本研究通过整合荧光探针动态成像与多维生化分析,阐明了新型抗结核抑制剂与靶酶相互作用的时空动态特性。研究揭示这种动态过程如何超越传统静态结合参数,最终决定药物的杀菌表型。基于荧光探针的技术体系能够解析传统方法难以捕捉的药物-靶标互作动态信息,对于评价尤其像共价抑制剂这类作用模式特殊的先导化合物至关重要。经多因素分析证实,其抑菌效果与共定位程度及 CFU 降幅显著相关。本研究结果向临床与体内场景外推时需注意其适用边界。当前结论主要基于标准菌株与部分临床分离株,尚未涵盖所有结核分枝杆菌谱系、高耐药背景(如 XDR-TB)、肉芽肿微环境、宿主药代动力学差异及还原性胞内环境等复杂因素。因此,“初始共价占领—持续效应”模式在特定条件下(如靶点突变、代谢适应、微环境 pH/氧化还原态改变)可能出现效能衰减或失效。未来需在更接近体内病理生理的模型中进行验证,以明确其实际治疗窗与潜在耐药风险。

【参考文献】

- [1] 李蒙,代晓伟,卞聪,等.莽草酸激酶作为抗结核分枝杆菌药物发现靶标的研究进展[J].中国医药生物技术,2021,16(2):145-149.
- [2] 徐晓娜,赵欣,欧喜超,等.基于多重 PCR-质谱微测序技术的结核分枝杆菌对一线治疗药物耐药性检测系统构建[J].疾病监测,2023,38(5):556-562.
- [3] 夏露,王晓春,漆志扬,等.结核分枝杆菌 Rv2005 的原核表达以及免疫原性评估[J].海南医学院学报,2024,30(23):1784-1791.
- [4] 张光磊,焦磊.新型结核疫苗及其诱导抗结核分枝杆菌免疫应答的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2023,51(4):54-60.
- [5] 李玉洁,余海燕,杨雨婷,等.结核分枝杆菌分泌蛋白早期分泌性抗原 6(ESAT-6)的免疫学性质及其在新型疫苗中作用的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2024,40(1):82-88.
- [6] 宋慧娟,娄琨,吕凯,等.结核分枝杆菌 DprE1 抑制剂——Macozinone[J].临床药物治疗杂志,2022,20(4):1-5.
- [7] Nogueira M, Warren RB, Torres T. Risk of tuberculosis reactivation with interleukin (IL)-17 and IL-23 inhibitors in psoriasis-time for a paradigm change[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2021, 35(4): 824-834.
- [8] Vassiliades SV, Borges LG, Giarolla J, et al. Folate pathway inhibitors, an underestimated and underexplored molecular target for new anti-tuberculosis agents[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2023, 23(17): 1711-1732.
- [9] Verma A, Naik B, Kumar V, et al. Revolutionizing tuberculosis treatment: uncovering new drugs and breakthrough inhibitors to combat drug-resistant Mycobacterium tuberculosis[J]. ACS Infectious Diseases, 2023, 9(12): 2369-2385.
- [10] Yang L, Hu X, Chai X, et al. Opportunities for overcoming tuberculosis: emerging targets and their inhibitors[J]. Drug Discovery Today, 2022, 27(1): 326-336.
- [11] Hoelscher M, Barros-Aguirre D, Dara M, et al. Candidate anti-tuberculosis medicines and regimens under clinical evaluation[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2024, 30(9): 1131-1138.
- [12] Harikishore A, Mathiyazakan V, Pethe K, et al. Novel targets and inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis cytochrome bd oxidase to foster anti-tuberculosis drug discovery[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2023, 18(8): 917-927.
- [13] Mi J, Gong W, Wu X. Advances in key drug target identification and new drug development for tuberculosis[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 5099312.
- [14] Mitini-Nkhoma SC, Chimbayo ET, Mzinza DT, et al. Something old, something new: ion channel blockers as potential anti-tuberculosis agents[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 665785.
- [15] Hasenoehrl EJ, Wiggins TJ, Berney M. Bioenergetic inhibitors: antibiotic efficacy and mechanisms of action in Mycobacterium tuberculosis[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 611683.
- [16] Shinde Y, Pathan A, Chinnam S, et al. Mycobacterial FtsZ and inhibitors: a promising target for the anti-tubercular drug development[J]. Molecular Diversity, 2024, 28(5): 3457-3478.
- [17] Fu J, He Z, Fu H, et al. Synthesis and evaluation of inhibitors of Mycobacterium tuberculosis UGM using bioisosteric replacement[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2022, 69: 116896.
- [18] da Silva ET, de Andrade GF, Lourenço MCS, et al. Synthesis and anti-bacterial activity of new substituted 2-trifluoromethyl-4-quinolinylhydrazones against Mycobacterium tuberculosis strains[J]. Current Medicinal Chemistry, 2024, 31(40): 6713-6721.
- [19] Dahmer BR, Ethur EM, Timmers LFSM. Discovery of new inhibitors of mycobacterium tuberculosis EPSP synthase-a computational study[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2023, 121: 108404.
- [20] Andersson V, Fröberg G, Dahl VN, et al. The in vitro activity of carbapenems alone and in combination with β -lactamase inhibitors against difficult-to-treat mycobacteria; Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium abscessus, and Mycobacterium avium complex: a systematic review[J]. International Journal of Mycobacteriology, 2023, 12(3): 211-225.
- [21] Li C, Wang J, Xu JF, et al. Roles of HIF-1 α signaling in Mycobacterium tuberculosis infection; new targets for anti-TB therapeutics[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 711: 149920.
- [22] Paoli-Lombardo R, Primas N, Vanelle P. DprE1 and Ddn as promising therapeutic targets in the development of novel anti-tuberculosis nitroaromatic drugs[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 274: 116559.
- [23] Zhang H, Chen Y, Zhang Y, et al. Identification of anti-Mycobacterium tuberculosis agents targeting the interaction of bacterial division proteins FtsZ and SepFe[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2023, 13(5): 2056-2070.

(收稿日期:2025-12-22;修回日期:2026-03-10)

(本文编辑:林 赞)