

泰乐菌素研究进展

陈礼仁 陈惠勤

(广西农业科学院, 南宁 530007)

泰乐菌素 (Tylosin) 是一种禽、畜专用的大环内酯类抗生素, 它在医药上尚未使用。本品对鸡败血枝原体 (*Mycoplasma gallisepticum*), 猪流行性肺炎 (*Mycoplasma hyopneumoniae*), 猪赤痢 (*Treponema hyodysenteriae*) 等病症具有独特的疗效; 对部分革兰氏阳性细菌、钩端螺旋体等均有一定的效果。泰乐菌素作为饲料添加剂, 除防病外, 对禽、畜生长有明显地促进作用, 自 80 年代以来, 在国际上被广泛的用作饲料添加剂, 目前, 已在美国、日本、荷兰、英国和保加利亚等国家投入生产。

泰乐菌素在我国尚未生产。近年来, 从国外

进口泰乐菌素, 花费了大量的外汇, 尽管如此, 也只能重点供应, 远不能满足需求。因此, 研制泰乐菌素, 对我国发展禽、畜业, 节省国家外汇开支, 出口创汇等均具有深远的意义。以下介绍泰乐菌素的研究进展。

(一) 泰乐菌素产生菌、代谢及发酵的研究

1960 年美国礼来药厂 McGuire 等^[1] 首先报道; 从泰国土壤中分离得到一株弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 产生泰乐菌素。它与 1953 年 Waksman 所发现的弗氏链霉菌所产的新霉素 (Neomycin), 在理化性质、化学结构和抗菌性能上完全不同。对其产生菌经系统的鉴定, 发现也有不同之处。产生泰乐菌素的

弗氏链霉菌能利用蔗糖,在马铃薯块上不能生长^[1],而产生新霉素的弗氏菌则相反。1963年 Jensen^[2]等报道吸水链霉菌(*S. hygrosopicus*)产生泰乐菌素;1973年 Pape 等^[3]报道了第三种产生泰乐菌素的链霉菌——龟裂链霉菌(*S. rimosus*)。

关于泰乐菌素产生菌菌种诱变选育的报道,1987年 Kibarska 等用1%亚硝基胍处理弗氏链霉菌4小时,获得比母株提高产量5—6倍的突变株;1987年 Rodinora等,采用原生质体融合技术,增产2—2.5倍;1988年 Leigh 等^[4]将大肠杆菌质粒 pHJL280,一种合成泰乐菌素的基因密码,产生大菌素3'-O-甲基转移酶,克隆到弗氏链霉菌 GS28 阻断突变株,使之产生大菌素3'-O-甲基转移酶,增加了60—100倍,从而使泰乐菌素的产量提高了14—18倍。目前,国外泰乐菌素发酵单位,保加利亚为8000 u/ml;日本某厂家为8000—10000 u/ml,最高厂达16000 u/ml;国内研制起步较晚,发酵水平较国外低,已有厂家与日本洽谈引进8000—10000 u/ml的菌株。

关于泰乐菌素产生菌代谢的研究,Omura^[5]、Tanaka^[6]及 Masurana^[7]等一致认为高浓度的铵离子抑制了泰乐菌素的生物合成。他们分别在发酵液中加入磷酸镁铵、磷化镁和沸石,均证明有助于限制铵离子的供应,从而提高了泰乐菌素的发酵单位。Omura 等在培养基中分别加入25—100 mmol/L的铵离子,证明随着铵离子浓度的增加,抑制了细胞内缬氨酸脱氢酶的产生,从而减少了太内酯的合成;他在另一试验中^[9],以各种氨基酸为前体,发现L-亮氨酸、L-异亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸以及2-酮酸等五种,明显地促进太内酯的合成,从而使泰乐菌素增产。从研究缬氨酸代谢途径^[7-9],缬氨酸经过脱氨基与脱羧基,得到异-丁酸盐,然后再异构为正丁酸盐,直接作为太内酯合成的前体。

许多学者的研究发现,泰乐菌素的生物合成与胸苷二磷酸-D-葡萄糖4、6-脱水酶、甲基二丙酰-CoA 羧酸转移酶、丙酰-CoA 羧酸酶、乙酰-CoA 以及大菌素3'-O-甲基转移酶等有

关,发酵过程中分化期存在过量的磷酸盐(30 mmol/L),抑制了酶的合成^[9,13],从而抑制了泰乐菌素的生物合成。

Vu-Trong 等^[10]指出,弗氏链霉菌在发酵过程中,营养生长期存在大量 ATP,到分化期泰乐菌素开始合成,ATP 相应下降,此时过多的 ATP,抑制了泰乐菌素的生物合成,分化期存在过量的葡萄糖,促使 ATP 水平的上升,从而抑制了泰乐菌素的合成。

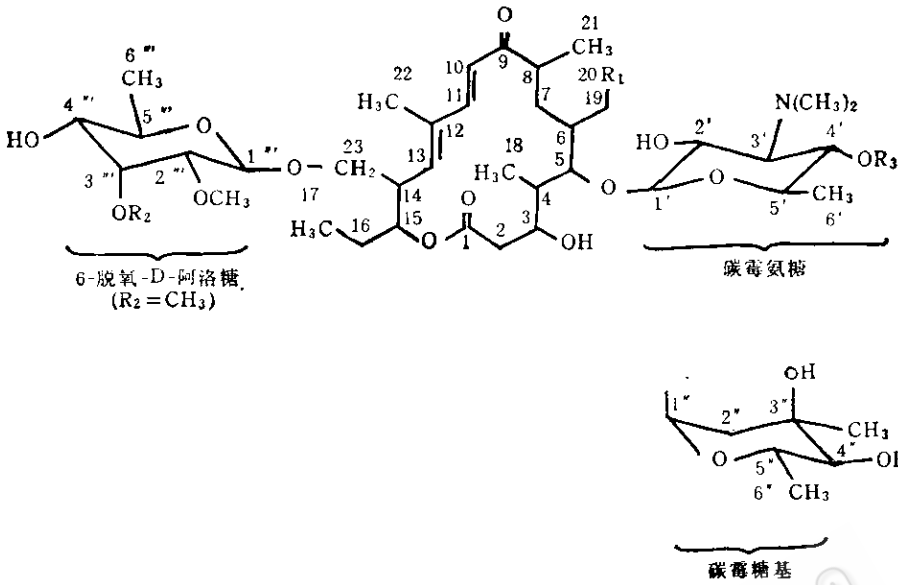
根据我们对泰乐菌素发酵条件初步的摸索,在28—30℃的适温条件下,种龄以40—48小时为最适。在500ml三角瓶发酵,装量25—50ml比100ml增产50%以上;发酵周期以96—120小时为宜;培养基的pH值,消前pH 6.7—7.2最适于产生泰乐菌素,pH 6.3发酵单位下降约50%,pH高于7.5发酵单位也略为降低;最佳的碳源为豆油,其次为麦芽糖和淀粉;黄豆粉和花生饼粉为最佳氮源,其次为酵母粉和鱼粉;培养基中加入磷酸三钙比对照增产30%以上。

(二) 泰乐菌素的理化性质及生物合成路线

1960年美国礼来公司 Hamill 等^[12],首先对弗氏链霉菌发酵液,用溶媒法提纯,并进行一系列理、化性质鉴别,确定其为十六环内酯类抗生素,定名为泰乐菌素。泰乐菌素的酒石酸盐、磷酸盐的水溶液稳定,25℃ pH 5.5—7.5,可保存三个月效价不降低,pH 4以下或9以上,易于分解,在pH 4.5以下保存,脱去一个碳霉糖,成为脱碳霉糖泰乐菌素(Desmycosin),pH 3以下,存在铁离子,再脱去6-脱氧-阿洛糖,成为O-碳霉胺糖太内酯^[13];Aksenov 等报道,泰乐菌素的稳定范围为pH 3.5—9,100℃时活力明显下降。

1970年 Morin 等^[11]确定了泰乐菌素的全结构含一个太内酯,连结一个碳霉胺糖(Myca-minose)和二个中性糖,一为碳霉糖(Myca-rose),另一为6-脱氧-D-阿洛糖(Mycinose),其结构式见图1。

1975年 Omura 等^[17],采用示踪原子标志



菌素	联接基	R ₁	R ₂	R ₃
Tylosin		CHO	CH ₃	碳霉糖
Desmycosin		CHO	CH ₃	H
Macrocin		CHO	H	碳霉糖
Relomycin		CH ₂ OH	CH ₃	碳霉糖
Lactenocin		CHO	H	H

图1 弗氏链霉菌产生菌素的组份

的¹³C 乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠和乙基丙二酸钠为前体，根据所合成具有示踪原子标志的泰乐菌素，从¹³C 核磁共振谱，碳原子化学位移的强度，推断出泰乐菌素的配糖体，由二个乙酸，五个丙酸和一个丁酸所组成。

1960 年 Hamill 等^[17]，从弗氏链霉菌发酵液中发现泰乐菌素 (Tylosin) 和去碳霉糖泰乐菌素 (Desmycosin)，1963 年又发现另一组份——大菌素 (Macrocin)，同年，Whaley 等报道，从弗氏链霉菌和吸水链霉菌发酵液中分离出雷洛菌素 (Relomycin)，1973 年 Seno 等，发现第五种组份——拉克亭菌素 (Lactenocin)，这五种组份的结构式见图 1。

关于泰乐菌素生物合成路线的研究，1963 年 Hamill 等^[18]报道，泰乐菌素组份可以通过生物或化学的方法相互转化；自 1977 年以来，

美国和日本许多学者，研究了弗氏链霉菌的阻断突变株的生物合成，发现它们产生了泰乐菌素的中间体及新的活性物质，并进一步研究这些阻断突变株的互补共合成组份，外加前体和酶等，与泰乐菌素生物合成的关系，从而提出泰乐菌素的生物合成路线(图 2)，概括为以下 9 步^[9]：(1)合成太内酯；(2) 连结碳霉糖到太内酯的 C-5 羟基；(3)太内酯的 C-20 甲基羟甲基化，形成羟甲基；(4) C-20 羟甲基脱氢，形成醛基；(5) 太内酯 C-23 位甲基羟甲基化，形成羟甲基；(6) 连结 6-脱氧-D-阿洛糖到 C-23 位羟甲基；(7) 连结碳霉糖到碳霉糖 4'-羟基；(8) 连结甲基到去甲基大菌素 2'''-羟基；(9) 连结甲基到大菌素 3'''-羟基，形成泰乐菌素。

(三) 泰乐菌素结构改造及其抗菌作用

由于泰乐菌素对禽、畜有独特的防病与育

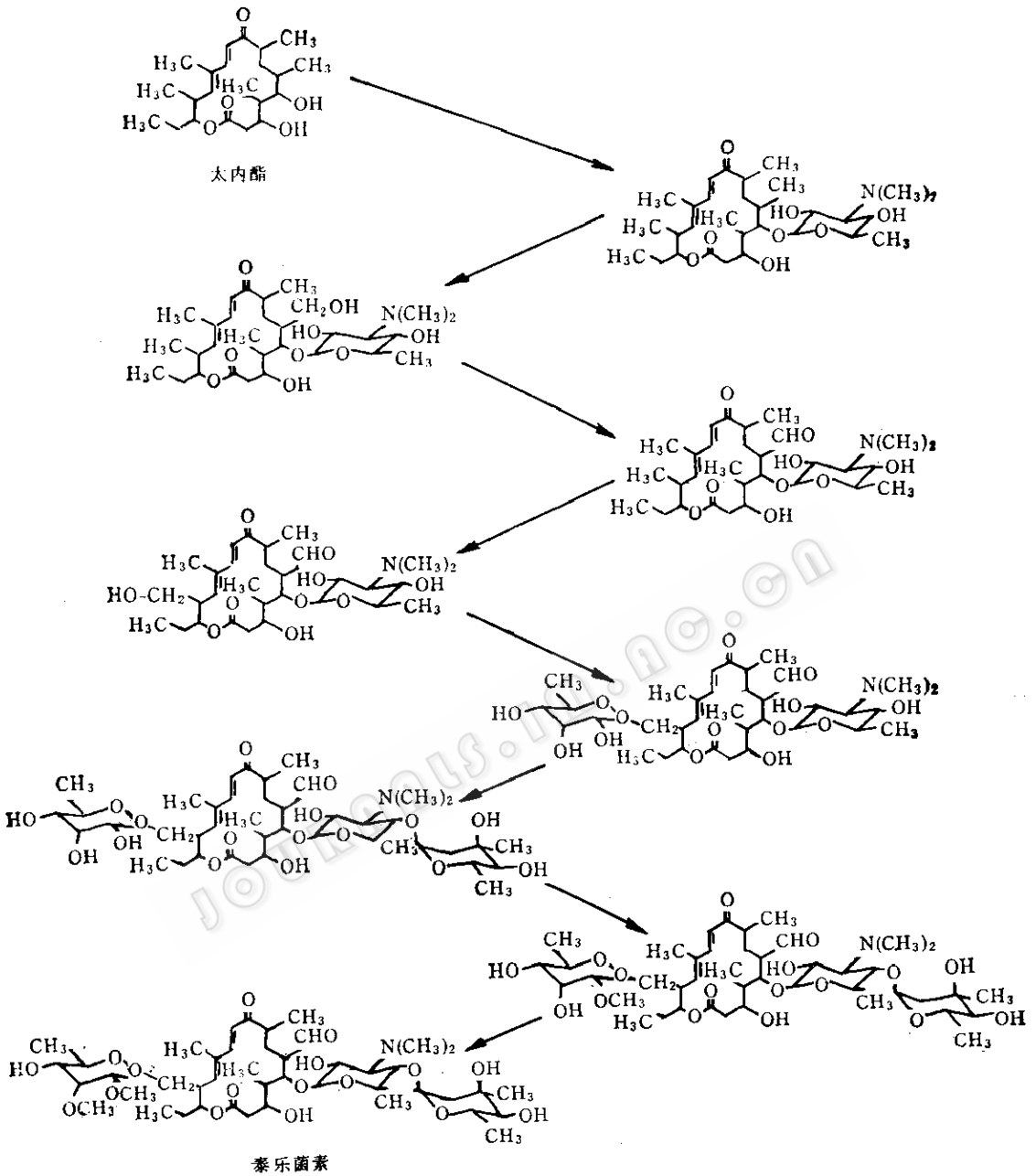


图2 泰乐菌素生物合成路线

肥效果，故使化学家对其进行一系列的结构改造，以改进其抗菌性能。1979年 Okamoto 等^[21-23]发现，泰乐菌素的3-羟基与4'-羟基取代为酰基衍生物，对耐泰乐菌素的金黄色葡萄球菌及链球菌的抗菌活力有所提高，其中3-乙酰4'-异戊酰泰乐菌素抗菌活力最强，对鸡败血枝原体敏感种 KP-13，疗效与泰乐菌素相当，对四种耐药性种活力比泰乐菌素提高8—16倍；

1982年 Tsuchiya 等^[24]，以含支链脂肪酰基， α -甲基异戊酰，或4-甲基戊酰，酯化泰乐菌素的4'-羟基，对耐泰乐菌素的金黄色葡萄球菌 MS-8710 ($IMC \leq 800 \mu\text{g/ml}$) 活力提高了54倍 ($12.5 \mu\text{g/ml}$)；用含芳香基的苯硫乙酰、苯磺乙酰、4-氮苯酰以及苯乙烷磺酰基等酯化，对耐泰乐菌素的鸡败血枝原体 (IMC 为 $2.5-10 \mu\text{g/ml}$)，活力提高30—125倍 ($0.08 \mu\text{g/ml}$)；直

至1988年 Yoshioka 等^[25]阐明了泰乐菌素4"-羟基酰化物之所以在体外具有极强的抗菌活力,而体内活力明显下降或失活,是由于受体为肝酯酶的作用,进而设计了二步筛选法,即测定新衍生物的抗菌活力和测定对肝酯酶的稳定性,并发现在苯环上连结对位的乙酰基与氟,乙酰基与乙酰基、甲硫基、甲氧基等,对肝酯酶比较稳定。

在日本与美国,合成了4-脱氧碳霉胺糖,5-O-碳霉胺糖太内酯以及6-脱氧-D-阿洛糖,泰乐菌素等一系列C-23位取代衍生物,许多品种在体外对泰乐菌素耐药菌的活力很强,但体内试验均没有取得疗效,没有实际应用的价值。

1982年 Omura^[26]和 Matsubara 等^[27]首先报道,合成泰乐菌素及脱碳霉糖泰乐菌素C-20一系列取代氨基衍生物,经体内口服试验,只有20-(N-苯氨基)-20-脱氧,与20-(N-双甲基)-20-脱氧两种脱碳霉糖泰乐菌素的活力与泰乐菌素相当;1987年 Ose 等^[28]报道,一种C-20位取代衍生物泰尔埋菌素(Tilmicosin),对29种肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*), 257种巴斯德杆菌(除两种IMC $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ 外)以及溶血巴斯德杆菌(*Pasteurella hemolytica*)的IMC为 $3.12 \mu\text{g/ml}$,对出血败血性巴斯德杆菌(*P. multocida*)为 $6.25 \mu\text{g/ml}$,口服20小时测定,体内存在4倍抑制巴斯德杆菌的IMC浓度,1988年 Kirst 等^[29,30]进一步报道,无论皮下注射(15和 $30 \text{mg/kg} \times 2$)或口服(0.53g/L),对上述两种巴斯德杆菌均有良好的疗效。Tilmicosin的合成揭开了半合成泰乐菌素临床应用的新一页,该项研究尚在继续进行中。

(四) 泰乐菌素的药理、残留及应用的研究

据文献报道,至少有18个国家和地区进行泰乐菌素的研究与应用,即美国、日本、英国、加拿大、德国、荷兰、保加利亚、苏联、波兰、捷克、澳大利亚、意大利、希腊、菲律宾、南朝鲜、中国、香港和中国台湾等。

泰乐菌素的急性毒性、亚急性毒性、慢性毒

性和副作用,根据 Berkmen 等^[31]对小白鼠、大白鼠、狗、鸡和猪等动物注射与口服给药的试验结果,证明泰乐菌素用作注射、口服给药或饲料添加剂,在指定使用浓度,对禽、畜绝对安全、有效。

泰乐菌素的作用机制是抑制细菌的蛋白质合成,它结合于核糖体50S亚基上,抑制氨酰-tRNA-的氨酰末端的结合,以及抑制mRNA-氨酰-tRNA-核糖的复合物的形成,不同组份对核糖体的结合能力不同^[32-33]。

关于残留量的分析,1978年 Smether 等^[34],采用细菌琼脂和细菌琼脂糖高压电泳法,检查饲料、动物组织、尿等含药量、药理动力学等。1979年 Inocentyna 等^[37],用氯仿、醋酸乙酯、石油醚等有机溶剂提取蛋品和牛奶中泰乐菌素,采用硅胶薄板双向层析法——即先用氯仿:丙酮(60:40),再用醋酸乙酯:甲醇(85:15)展层,可检查出蛋品中含泰乐菌素 0.05mg/kg ,牛奶含 0.01mg/kg 。1982年 Johnston 等^[38],用棉花直接吸收禽、畜肉或其他组织,让棉团充分吸收组织汁液,然后置于含有枯草杆菌的培养基中,根据抑菌圈的大小,确定其残留量,与传统检测方法比较,取得同样的结果,方法简便、快速。

泰乐菌素的应用,1959年 Gard 等^[39]首先报道了泰乐菌素对鸡枝原体(IMC为 $0.031 \mu\text{g/ml}$),猪肺炎枝原体(IMC为 $0.031 \mu\text{g/ml}$)等病原菌有强烈的作用,对部份革兰氏阳性菌有效,对螺旋体、原虫和蛲虫等均有一定的效果,同时还发现对禽、畜有促进生长的作用;1978—1985年许多国家进一步报道,使用泰乐菌素可以治疗禽、畜疾病,促进其生长(5—20%),增加产蛋量(处理产蛋率为85—87%,对照为81—84%),同时明显地减少软壳率,并改进饲料利用转化率。以50与 100mg/kg 连续饲养鸡三天,对鸡败血枝原体治愈率分别为90与100%,以0.1%浓度添加于饲料,治愈效果可达100%,一般用作鸡饲料添加剂,使用0.002—0.1%;小猪用0.01—0.04%^[40]。连续单独使用泰乐菌素,易于出现耐药性,与金霉素、土霉素、磺胺、痢特

灵、蛋白酶、富马酸和微量元素等混合使用，可减慢耐药性，提高疗效，促进增产以及改进饲料利用率。

参 考 文 献

- McGuir J M et al.: *Antib. & Chemoth.* **11**: 320—327, 1960.
- Jensen A L et al.: *Antimicrob. Agents and Chemoth.* **49**—53, 1963.
- Pape H L et al.: *Arch. Microbiol.* **88**: 25—35, 1975.
- Leigh C K et al.: *Eur. Pat. Appl.* 0238323 AZ.
- Omura S et al.: *J. Antib.* **33**: 1568—1569, 1980.
- Tanaka T et al.: *J. Ferment. Technol.* **58**: 189—196, 1980.
- Masurana R et al.: *Ibid.* **16**: 607—614, 1980.
- Omura S et al.: *J. Antib.* **36**: 1792—1794, 1983.
- Ibid.* **37**: 495—520, 1984.
- Vu-Trong K et al.: *Biochnol Bioeng* **24**: 1093—1103, 1982.
- Sprinkmeyer R et al.: *C. A.* **89**: 127695y, 1978.
- Noibert M et al.: *Ibid.* **97**: 88385r, 1982.
- Ah K H et al.: *Ibid.* **108**: 201503, 1988.
- Ales V et al.: *Ibid.* **108**: 20149m, 1988.
- Norbert M et al.: *Ibid.* **96**: 21409m, 1982.
- Vu-Trong K et al.: *Antimicrob. Agents & Chemoth.* **17**: 519—525, 1980.
- Hamil R L et al.: *Antib. & Chemoth.* **11**: 328—334, 1960.
- 二宫幾代治: 家畜の抗生素与化学疗法, 第131—133页, 科学出版社, 北京, 1983.
- Morin R B et al.: *Tetradron Letters* **34**: 4737—4740, 1970.
- Omura S et al.: *Ibid.* **39**: 4503—4506, 1975.
- Okamoto R et al.: *J. Antib.* **32**: 542—544, 1979.
- Ibid.* **33**: 1300—1308, 1980.
- Okamoto R et al.: *J. Antib.* **33**: 1309—1315, 1980.
- Tsuchiya M et al.: *Ibid.* **35**: 661—672, 1982.
- Yoshioka T et al.: *Ibid.* **41**: 1617—1628, 1988.
- Omura S et al.: *Med. Chem.* **25**: 271—275, 1982.
- Masubra H et al.: *J. Antib.* **36**: 1713—1721, 1983.
- Oae E F et al.: *Ibid.* **40**: 190—194, 1987.
- Kirst H A et al.: *Ibid.* **41**: 938—948, 1988.
- Ibid.*: *Med. Chem.* **31**: 1631—1641, 1988.
- Berkman R N et al.: *Antimicrob. Agents Ann.* **595**, 1960.
- Mao J C et al.: *Biochim. Biophys. Acta* **157**: 404—413, 1969.
- Pestka S et al.: *Arch. Biochem. Biophys.* **136**: 89—91, 1970.
- Ibid.*: *Annu. Rev. Microbiol.* **25**: 487—562, 1971.
- Corcoran J W et al.: *Antib. & Chemoth.* **30**: 1012—1014, 1977.
- Smither R et al.: *J. Appl. Bacteriol.* **44**: 421—429, 1978.
- Inocentyna K et al.: *C. A.* **91**: 173459p, 1979.
- Johnston R W et al.: *C. A.* **96**: 18742k, 1982.
- Gard D L et al.: *Poultry Science* **38**: 1207—1212, 1959.
- 唐树人: 国外药学(抗生素分册), **5**: 351—360, 1985.