

## PBP<sub>2a</sub>体外诱导与 MRSA 的耐药关系

吴本权 唐英春 张扣兴 张天托 朱家馨 谈淑卿

(中山医科大学附属第三医院内科; 广州, 510630)

**摘要** 目的: 探讨作用于不同青霉素结合蛋白(PBP<sub>s</sub>)靶位点的β-内酰胺抗生素联合用药对甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)体外抗菌活性的影响及其PBP<sub>2a</sub>的诱导作用。方法: 测定头孢拉啶和头孢氨噻肟单独和联合对MRSA的最小抑菌浓度(MIC)和联合抑菌分数(FIC), 以甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)作对照; 用SDS-PAGE法分离细菌膜蛋白, 用分光光度扫描仪分别测定两种药物单独及联合使用前后菌膜耐药蛋白PBP<sub>2a</sub>的相对含量。结果: 头孢拉啶对20株MRSA的MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>分别为128 mg/L、512 mg/L, 头孢氨噻肟为16 mg/L、256 mg/L; 两药联合应用时: 头孢拉啶的FIC<sub>50</sub>、FIC<sub>90</sub>为4 mg/L、64 mg/L, 头孢氨噻肟为2 mg/L、32 mg/L, FIC指数≤0.5, 两药联合有良好的协同作用。两药单独应用都能在一定范围诱导MRSA大量表达PBP<sub>2a</sub>, 而联合用药却不会诱导PBP<sub>2a</sub>的表达增多。结论: 作用于不同PBP<sub>s</sub>靶位点的β-内酰胺抗生素联合用药不诱导耐药蛋白PBP<sub>2a</sub>的表达, 从而具有良好的协同作用。

**关键词** 蛋白结合/药物作用; 甲氧西林抗药性; 葡萄球菌, 金黄色/药物作用; 药物疗法; 抗生素类, 内酰胺/治疗应用中图分类号 R 453.2

## Study on the Relationship between the Induction *in Vitro* of PBP<sub>2a</sub> and MRSA Resistance

Wu Benquan Tang Yingchun Zhang Kouxing Zhang Tiantuo Zhu Jiaxin Tan Shuqing

(The Department of Internal Medicine, the 3 Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of β-lactam binding PBP<sub>s</sub> sites in combination on anti-MRSA activities *in vitro* and induction of PBP<sub>2a</sub>. **Methods:** MIC (FIC) of cephradine and cefotaxime alone or in combination against MRSA were measured. Bacterial membrane proteins were induced with the two drugs and identified by SDS-PAGE. The relative amount of PBP<sub>2a</sub> was quantitatively analyzed with densitometer. **Results:** MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> of cephradine against 20 strains of MRSA were 128 mg/L, 512 mg/L and that of cefotaxime 16 mg/L, 256 mg/L, respectively. When the two drugs were combined, FIC<sub>50</sub> and FIC<sub>90</sub> of cephradine were 4 mg/L, 64 mg/L and that of cefotaxime 2 mg/L, 32 mg/L, respectively and FIC index ≤0.5. **Conclusion:** β-lactam binding various PBP<sub>s</sub> sites in combination have a synergism and don't induce over expression of PBP<sub>2a</sub>.

**Subject headings** protein binding/drug effects; methicillin resistance, staphylococcus aureus/drug effects; antibiotics, lactam/therapeutic use

甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)致病性与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin sensitive staphylococcus aureus, MSSA)相似, 是医院内感染的重要致病菌之一<sup>[1]</sup>。它几乎对包括甲氧西林在内的所有抗生素耐药, 目前只有万古霉素有效, 而且已出现

对万古霉素中度敏感的MRSA。因此, 寻找可能的抗菌途径有重要意义, 本实验就作用于不同青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins, PBP<sub>s</sub>)靶位点的β-内酰胺抗生素联合用药对MRSA的抗菌活性, 以及对低亲和性青霉素结合蛋白(penicillin binding protein<sub>2a</sub>, PBP<sub>2a</sub>)的诱导作用进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和试剂

MRSA20株 MSSA10株为1995~1997年住院病人痰标本中分离。L-Broth培养基(修改): NaCl 40 g, 酵母浸膏 5 g, 胰蛋白胨 10 g, pH 7.2。Maeller Hinton培养基: 牛肉浸膏 2 g, 水解酪蛋白 17.5 g, 淀粉 1.5 g, 加蒸馏水 1 L。细菌膜蛋白提取试剂: lysostaphin 50 mg/L(Sigma), 脱氧胆酸钠 10 g/L, 磷酸钠缓冲液(Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 50 mmol/L, 氯化镁(MgCl<sub>2</sub>) 10 mmol/L, pH 7.2。凝胶储备液: 300 g/L, 丙烯酰胺 80 g/L, N,N-亚甲双丙酰胺 0.6 g/L。蛋白质分子标准品(上海生化试剂厂)。头孢拉啶(cephradine)(中美上海施贵宝制药有限公司); 头孢氨噻肟(cefotaxime)(德国赫斯特公司)。

### 1.2 MRSA 鉴定方法

琼脂板稀释法: 参照 NCCLS 标准, 从临床痰标本分离的金葡菌转种至 L-B 培养基, 培养 24 h, 配成 10<sup>10</sup> CFU/L 的细菌悬液, 沾取 1.2 μL 接种至 M-H 琼脂板上 (M-H 平板含 40 g/L NaCl, 对倍稀释的 Oxacillin) 直径约 5~8 mm 的圆形区, 32 °C 孵育 24 h, MIC ≥ 4 mg/L 为 MRSA。MRSA 特异性 MecA 基因的 PCR 检测: 按常规方法抽提细菌 DNA, PCR 循环条件参照詹文华等<sup>[2]</sup>, 在 20 g/L 琼脂糖上电泳, 623 bp 处出现强荧光带为耐药株 MRSA, 并设阴性及阳性对照。

### 1.3 体外药物敏感实验

头孢拉啶和头孢氨噻肟按对倍稀释法加入 pH 7.2, 40 g/L NaCl 的 M-H 琼脂板中, 借用多点接种仪, 接种 20 株 MRSA 和 10 株 MSSA, 32 °C 培养 24 h 观察结果, 测定 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>。

### 1.4 体外联合抑菌实验

首先分别测定拟联合的抗生素, 头孢拉啶和头孢氨噻肟对 MRSA, MSSA 的 MIC。根据两药的 MIC 确定药物联合抑菌的 8 个稀释度, 按棋盘法对倍稀释, 从高到低得到两药各种浓度配对。用多点接种仪分别接种 MRSA、MSSA (10<sup>10</sup> CFU/L) 至不同浓度 M-H 平板中。测定 FIC<sub>50</sub>、FIC<sub>90</sub> 和 FIC 指数<sup>[3]</sup>。

### 1.5 PBP<sub>2a</sub>的诱导

从 L-B 平板挑单个 MRSA 菌落至 15 mL L-B 液体培养基振荡 16 h 至对数生长期, 转种至 300 mL 改良的 L-B 培养基(接种量 50 mL/L) 32 °C 震荡过

夜, 细菌收获前 1.5 h 加入 β-内酰胺抗生素作为诱导剂, 离心获取细菌, 加入 lysostaphin 30 °C 孵育 30 min, 超声粉碎细菌, 上清 100 000×g, 4 °C 离心 1 h, 沉淀加 10 g/L 脱氧胆酸钠游离膜蛋白。用 80 g/L 丙烯酰胺及 0.6 g/L 单丙烯酰胺行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R-250 染色。参照分子量标志物同步电泳所制的对数曲线图, 根据 PBP<sub>2a</sub> 相对分子质量 78 ku 及被 β-内酰胺抗生素诱导来确定 PBP<sub>2a</sub> 在凝胶板的位置, 用分光光度扫描仪测定 PBP<sub>2a</sub> 的相对含量<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 头孢拉啶(PBP<sub>3</sub>)和头孢氨噻肟(PBP<sub>2</sub>)联合用药对 MRSA 体外抗菌活性

头孢拉啶联合时对 MRSA 的 MIC<sub>50</sub> 即 FIC<sub>50</sub> 为 4 mg/L, FIC<sub>90</sub> 64 mg/L, 而单独用药 MIC<sub>50</sub> 为 128 mg/L, MIC<sub>90</sub> 512 mg/L; 头孢氨噻肟联合时对 MRSA 的 FIC<sub>50</sub> 为 2 mg/L, FIC<sub>90</sub> 32 mg/L, 单独用药 MIC<sub>50</sub> 为 16 mg/L, MIC<sub>90</sub> 256 mg/L, 两药联合时各自的最小抑菌浓度均明显低于单独用药。两种抗生素对 MSSA 和 MRSA 的 FIC 指数均 ≤ 0.5, 有良好的协同作用。由于耐药蛋白 PBP<sub>2a</sub> 对 MRSA 的保护作用, 两药对 MRSA 抑菌浓度明显高于 MSSA, 结果见表 1。

### 2.2 头孢拉啶和头孢氨噻肟单独应用能诱导耐药蛋白 PBP<sub>2a</sub> 的大量表达

头孢拉啶和头孢氨噻肟分别以不同浓度作用于 10 株 MRSA, 其中 7 株在相对分子质量 78 ku 处出现明显的蓝色蛋白浓集带为 PBP<sub>2a</sub>, 分光光度扫描仪测定其相对含量显示, 随着药物浓度递增 PBP<sub>2a</sub> 的平均相对含量增多, 头孢拉啶的最佳诱导浓度 1 mg/L, 此时诱导的 PBP<sub>2a</sub> 平均相对含量 (19.4 ± 2.9)% 明显高于无药对照组 (12.0 ± 1.5)% (P < 0.01), 随后开始下降, 但仍然高于无药组。头孢氨噻肟浓度达到 0.2 mg/L 时, 诱导 PBP<sub>2a</sub> 最多 (20.9 ± 1.9)% (P < 0.01), 药物最佳诱导浓度峰值前移, 显示较头孢拉啶更强的诱导活性, 见图 1。

### 2.3 头孢拉啶和头孢氨噻肟联合应用不诱导 MRSA 耐药蛋白 PBP<sub>2a</sub> 的表达

联合用药后各个浓度梯度均不能诱导 PBP<sub>2a</sub> 表达增加, 与单独用药比较, 有 8 株 MRSA 出现相对分子质量 78 ku 的蓝色蛋白带即 PBP<sub>2a</sub> 淡染和变细, 在两药合用的药物浓度上升致 25 mg/L 之前, PBP<sub>2a</sub> 平均相对含量与对照组比较无显著差异 (P >

0.05), 当药物浓度增加到 25 mg/L PBP<sub>2a</sub> 表达减少 (9.8 ± 1.8)%, 低于无药对照组 (11.9 ± 1.6)% ( $P < 0.01$ )。联合用药高浓度时对 PBP<sub>2a</sub> 产生了破坏

作用。从图 1 可以看出两药单独应用时 PBP<sub>2a</sub> 随药物浓度增加而上升, 达到最高时开始下降, 两药联合时则呈一平缓曲线。

表 1 头孢拉啶和头孢氨噻肟联合对 MRSA 的体外抗菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of cephadrine and cefotaxime in combination against MRSA *in vitro* ( $c/mg \cdot L^{-1}$ )

Antibiotics	Range		MIC(FIC) <sub>50</sub>		MIC(FIC) <sub>90</sub>	
	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA
Cephadrine	0.5 ~ 2.0	64 ~ 1024	1.0	128	2.0	512
Cefotaxime	0.25 ~ 1.0	8 ~ 512	1.0	16	1.0	256
Cephadrine (combination)	0.06 ~ 0.5	0.5 ~ 125	0.25	4	0.5	64
Cefotaxime (combination)	0.03 ~ 0.25	1 ~ 64	0.125	2	0.125	32

1) FIC index  $\leq 0.5$ ; against 20 strains of MRSA and 10 of MSSA

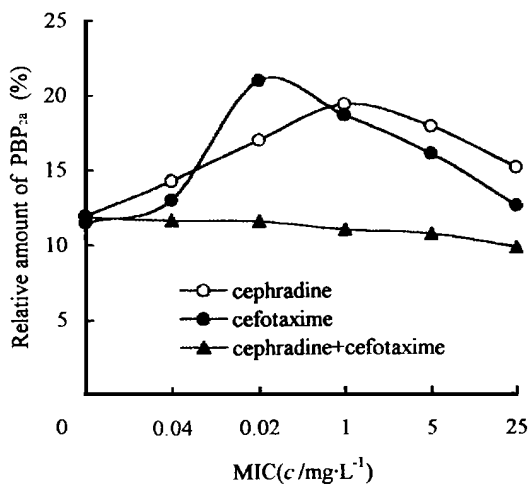


图 1 头孢拉啶和头孢氨噻肟单独或联合对 MRSA PBP<sub>2a</sub> 表达的诱导作用

Fig. 1 Inducing effects of cephadrine and cefotaxime alone or in combination on PBP<sub>2a</sub> expression in MRSA

Cephadrine and cefotaxime alone induced different amount of PBP<sub>2a</sub> at 5-fold dilution of MICs. The relative amount of PBP<sub>2a</sub> increased along with their higher MICs before the optimum inducing concentration, but the two drugs combined did not induce over expression of PBP<sub>2a</sub>

### 3 讨论

本实验应用作用不同 PBP<sub>s</sub> 靶位点的头孢拉啶和头孢氨噻肟对 PBP<sub>2a</sub> 的诱导作用, 探讨临床上 MRSA 的广泛耐药与  $\beta$ -内酰胺抗生素应用关系和可能的抗菌途径。有报道, 在一定剂量  $\beta$ -内酰胺抗

生素作用下 MRSA 表达大量 PBP<sub>2a</sub>, 并且证实诱导增多的 PBP<sub>2a</sub> 在相对长的时间内保护细菌避免抗生素的攻击, 抗生素浓度不同诱导的 PBP<sub>2a</sub> 含量不同, 不同抗生素最佳诱导浓度亦不相同<sup>[4, 5]</sup>。本实验发现头孢拉啶最佳诱导浓度为 1.0 mg/L, 而头孢氨噻肟为 0.2 mg/L, 达到最佳浓度后进一步增加抗生素剂量 PBP<sub>2a</sub> 开始下降。从两药最佳诱导浓度可以看出头孢氨噻肟更容易诱导 MRSA 高度耐药。在最佳诱导浓度前, 随抗生素浓度增加 PBP<sub>2a</sub> 的含量亦增加 ( $P < 0.01$ ), 与国外的报道相近<sup>[4]</sup>, 提示盲目增加抗生素剂量会诱导严重耐药的 MRSA 出现。

抗生素必须与 PBP 结合才能破坏该蛋白酶的肽聚糖转肽功能, 产生抗菌作用, 耐酶的  $\beta$ -内酰胺抗生素广泛使用诱导 MRSA 产生低亲和性 PBP<sub>2a</sub>, PBP<sub>2a</sub> 与所有  $\beta$ -内酰胺抗生素亲和性极低, 但具有其它 PBP 的生物学功能, 能维持细菌胞壁肽聚糖的正常代谢, 从而使 MRSA 逃避抗生素攻击<sup>[5]</sup>。作用不同 PBP<sub>s</sub> 的  $\beta$ -内酰胺抗生素联合会产生多靶蛋白的破坏作用。由于头孢拉啶主要作用于 PBP<sub>3</sub>, 头孢氨噻肟作用于 PBP<sub>2</sub>, 前者影响细菌分裂, 后者参与胞壁肽聚糖合成, 因此两药合用抗菌性增强。

本研究显示头孢拉啶和头孢氨噻肟单独应用时, 对 MRSA 和 MSSA 的 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 均明显高于两药联合使用, 单独用药对 MRSA 的抗菌活性较差, 但对 MSSA 显示较强的抗菌作用, 两种药物对耐药菌与敏感菌的 MIC<sub>50</sub> 分别相差近 10 ~ 100 倍以上。头孢拉啶和头孢氨噻肟联合用药时对耐药菌和敏

感菌的抗菌活性均明显增强,其FIC指数均 $\leq 0.5$ ,具有良好的协同作用。就高度耐药的MRSA而言,由于PBP<sub>3</sub>和PBP<sub>2</sub>为金黄色葡萄球菌存活所必需,特异性作用于此类PBP靶位点的抗生素具有联合应用的前景。结果亦表明两种药物联合时各个浓度对PBP<sub>2a</sub>均无诱导作用( $P > 0.05$ ),并且当抗生素浓度升至25 mg/L时PBP<sub>2a</sub>含量则减少,  $(9.8 \pm 1.8)\%$ ,低于对照组  $(11.9 \pm 1.6)\%$  ( $P < 0.01$ )。因此不仅具有良好的协同作用,而且不会诱导MRSA耐药增强。Uete T, Matsuda K等证实,作用于金黄色葡萄球菌PBP<sub>4</sub>的头霉素与作用于其它PBP<sub>s</sub>的 $\beta$ -内酰胺抗生素联合应用具有良好的协同作用,推测可能对PBP<sub>2a</sub>的影响有关<sup>[3,7]</sup>。 $\beta$ -内酰胺抗生素联合应用在临床上已经取得了良好的效果,如青霉素类与2、3代头孢菌素合用治疗严重革兰阴性杆菌感染。这种联合减少了与氨基甙类联用的毒副作用,但作用方式或机制相同的抗生素以不合用为宜<sup>[6]</sup>,象作用于同一PBP<sub>s</sub>靶位点的抗生素合用会产生相互拮抗作用。

临床可以用两药联合来治疗MSSA感染,并可预防尚未确诊的MRSA感染,以防单独用药耐药性进一步增强,为种种原因不适合使用万古霉素或出现万古霉素耐药时提供一种新的抗菌途径。

#### 参 考 文 献

1 Mulligan M E, Murray leisue K A, Ribner R S. Methicillin-

- Resistant Staphylococcus aureus: A consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med*, 1993, 94(3): 313
- 2 詹文华,竹村弘,东山康仁,等. PCR法检测耐甲氧苯青霉素金葡菌的MecA基因. *中山医科大学学报*, 1995, 16(3): 35
- 3 Uete T, Matsuo K. Synergistic enhancement of in vitro antimicrobial activity of Cefmetazole and cefazolin, cefotiam, cefamandole or cefoperazone in combination against methicillin-sensitive and resistant Staphylococcus aureus. *Jap J Antibiotics*, 1995, 553(113): 48
- 4 Tomasz A, Drugeon H B, Lencastre H M P. New mechanism for methicillin-resistance in Staphylococcus aureus: Clinical isolates that lack the PBP<sub>2a</sub> gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, 33(11): 1869
- 5 Murakami K, Nomurak K, Doi M, *et al*. Production of low-affinity penicillin-binding protein by low and high-resistance groups of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31(9): 1307
- 6 戴自英. 抗菌药物的治疗性应用. 见: 戴自英主编. 实用抗菌药理学. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 74~75
- 8 Matsuda K, Nakamura K, Adachi Y, *et al*. Autolysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus is involved in synergism between imipenem and cefotiam. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(12): 2631

(1998-10-07 收稿 1999-04-23 修回)

## 会 讯

1999年5月13日下午,为期4天的卫生部、国家中医药管理局所属医院思想政治工作研究会第2届第3次年会在广州珠江宾馆胜利闭幕。参加本次年会的多数代表是从事多年医院党务和行政管理工作的中高层管理干部,来自全国50多家医院的近百名代表交流了科学管理医院的有关经验。

据悉,本届年会由中山医科大学主办。本校党委副书记陈玉川、陈伟林、附一院党委书记樊筑生出席了本次大会。前任卫生部副部长、政研会秘书处成员孙隆寿在会上做了“关于医疗体制改革有关问题”的报告。

(吴金泉)