

抗菌药物诱导大肠杆菌内毒素释放的研究

吴朝晖 张扣兴 唐英春

(中山医科大学附属第三医院呼吸科; 广州, 510630)

摘要 目的:探讨不同类型的抗菌药物释放细菌内毒素潜能和速率的不同。**方法:**选择5种不同类型抗菌药物单独或联合作用于大肠杆菌,比较4h期间游离内毒素,同时作菌落计数和细菌形态学检查。**结果:**亚胺培南-西司他丁杀菌作用和释放内毒素最快,但释放内毒素量较少;头孢他啶释放内毒素较快,量较多;环丙沙星释放缓慢,量中等;阿米卡星释放缓慢,量最小;头孢曲松致细菌丝状体形成,杀菌并释放内毒素最慢但量最大;阿米卡星和头孢曲松联合用药有协同抗菌作用,且明显减少头孢曲松释放内毒素的量,与单独使用阿米卡星释放内毒素的量近似。**结论:**不同类型抗菌药物诱导细菌内毒素释放的量和速率不同。

主题词 抗生素类/药理学; 抗生素类/治疗应用; 头孢曲松; 环丙沙星; 头孢他啶; 阿米卡星; 亚胺培南-西司他丁; 内毒素类/药理学

中图分类号 R 435.2

Antibiotic-induced Release of Endotoxin from Escherichia Coli in Vitro

Wu Zhaohui Zhang Kouxing Tang Yingchun

(Department of Respiratory Disease, the 3rd Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Abstract Objective: To study the differences in the rate and extent of endotoxin release by different classes of antimicrobial agents. **Methods:** Free endotoxin release in time from cultures of Escherichia coli by different types and combinations of antimicrobial agents was studied in vitro for 4 h. Viable counts were obtained simultaneously. The morphology of the bacteria was examined during antibiotic exposure. **Results:** The most rapid fall in viable counts and release LPS were seen after treatment with imipenem, but less increase in the level of free endotoxin. Ceftizadime induced release of endotoxin at faster rate and in greater amounts. Ciprofloxacin caused a late and modest endotoxin liberating. Amikacin induced a late and the least amounts of endotoxin release. Treatment with ceftriaxone killed bacteria and induced a relatively late but the greatest release of endotoxin, which was due to conversion of bacteria to long filamentous forms. Combination of amikacin and ceftriaxone has obvious synergism, and resulted in a significant decrease in endotoxin liberation in comparison with that ceftriaxone monotherapy. **Conclusion:** The amount and rate of LPS release from bacteria was dependent upon antibiotic class.

Subject headings antibiotics/pharmacology; antibiotics/therapeutic use; ceftriaxone; ciprofloxacin; ceftizadime; amikacin; imipenem; endotoxins/pharmacology

内毒素是存在于革兰阴性细菌胞壁外膜中的一种生物活性成份—脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),在革兰阴性菌感染的发病机制中起十分重要的作用^[1]。抗菌药物治疗革兰阴性菌感染时会导致内毒素释放增加,促使内毒素休克的发生和发展,因不同的抗菌药物诱导内毒素释放的潜能不

同,而引起国外学者的关注,但实验结果不一致^[2]。国内未见这方面研究的报道。我们选择不同类型的抗菌药物作用于大肠杆菌,进行菌落数和游离内毒素量比较,结合细菌形态学检查,探讨内毒素释放和抗菌药物作用机制的关系,为合理选择抗菌药物治疗革兰阴性菌感染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标准菌株液的制备

将 *E. coli* ATCC 25922 (本室保存株) 接种于 Muell Hinton (M-H) 平板上, 置培养箱中 35 °C 孵育过夜, 挑取单个菌落接种于 5 mL M-H 肉汤 (美国 BBL 公司) 中, 35 °C 孵育至混浊, 麦氏比浊后用肉汤稀释至含菌量约 1×10^9 CFU/L。

1.2 体外药物敏感实验 (MIC)^[3]

按对倍稀释法测得 5 种药物对 *E. Coli* ATCC 25922 的 MIC 分别为: 亚胺培南-西司他丁 (imipenem, 美国默沙东公司) 0.25 mg/L; 头孢他啶 (ceftizadime, 英国葛兰素威康公司) 0.5 mg/L; 头孢曲松 (ceftriaxone, 上海罗氏制药公司) 0.25 mg/L; 阿米卡星 (amikacin, 上海信谊制药厂) 2.0 mg/L; 环丙沙星 (ciprofloxacin, 中美史克天津制药厂) 0.125 mg/L。

1.3 菌落计数

取 0.1 mL 待测标本用 M-H 肉汤连续 10 倍稀释到含菌量约 1×10^6 CFU/L, 分取 0.1 mL 均匀涂布接种到 3 个 M-H 平板上, 35 °C 孵育过夜, 次日计数菌落。

1.4 内毒素测定——偶氮显色法

取 0.1 mL 标本加 0.05 mL 鲎试剂混匀置 37 °C 水浴 25 min, 加入 0.05 mL 鲎三肽, 37 °C 水浴 3 min, 随即顺序加入亚硝酸钠、氨基磺酸铵及萘乙二胺各 0.5 mL 摇匀, 于波长 545 nm 比色读数, 同时设空白对照管和内毒素标准液管 (鲎试剂盒 II 和细菌内毒素标准参考品, 批号: 970101, 上海医学化验所提供)。

1.5 内毒素释放实验

分别将 3 mL 标准菌株液加入含抗菌药物的试管中, 5 种药物单独及头孢曲松和阿米卡星联合均为 $256 \times \text{MIC}$ 浓度, 设不含抗菌药物的对照管。置 35 °C 水浴恒温振荡培养, 分别于 0, 1, 2, 4 h 取 1 mL 通过 0.45 μm 滤膜, 测定游离内毒素, 同时作菌落计数。实验间隔 3 d 重复作 1 次, 共作 3 次。

1.6 细菌形态学检查

$256 \times \text{MIC}$ 浓度的抗菌药物作用于标准菌株液培养 1 h 和 2 h 涂片, 复红染色, 光镜下观察。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 做 *t* 检验或方差分析。

2 结果

2.1 菌落计数

对照培养 4 h 渐增至 2×10^{11} CFU/L, 头孢曲松和阿米卡星联合导致菌落计数下降迅速, 和两者单独比较均 $P < 0.05$ 。3 种 β -内酰胺类抗生素比较, 亚胺培南-西司他丁下降最快, 1 h 下降 22 倍, 其次是头孢他啶, 头孢曲松下降缓慢。见图 1。

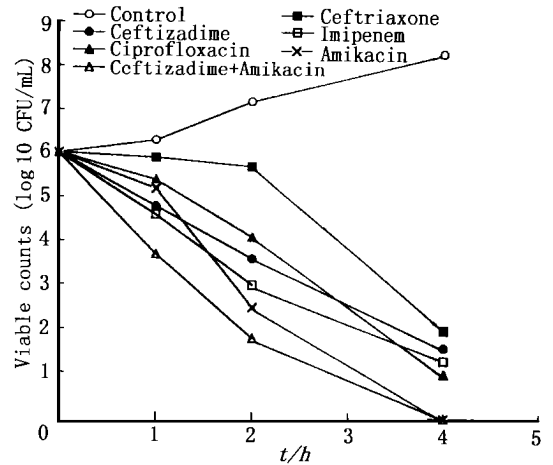


图 1 $256 \times \text{MIC}$ 抗菌药物作用 *E. Coli* ATCC 25922 4 h 期间的菌落计数 (3 次实验平均数)

Fig. 1 Viable counts of *E. Coli* ATCC 25922 in cultures treated with antibiotics at $256 \times \text{MIC}$ during 4h (The results are the means of three separate experiments)

2.2 内毒素释放

对照培养 0 h 的游离 LPS 为 $(10 \pm 3) \mu\text{g/L}$, 培养 4 h 游离 LPS 随菌落数增加而按比例增加。5 种药物 4 h 游离内毒素量比较: 头孢曲松明显高于其它药物 ($P < 0.01$); 头孢他啶、环丙沙星高于亚胺培南-西司他丁、阿米卡星 ($P < 0.01$); 亚胺培南-西司他丁高于阿米卡星 ($P < 0.05$); 头孢他啶与环丙沙星间无明显差异 ($P > 0.05$)。亚胺培南-西司他丁释放内毒素最快, 1 h 释放量占 4 h 的 65%, 其次是头孢他啶, 阿米卡星引起缓慢、少量的内毒素释放, 头孢曲松引起缓慢但大量的内毒素释放。头孢曲松和阿米卡星联合诱导内毒素释放量比头孢曲松明显减少 ($P < 0.01$), 和阿米卡星比较无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 抗菌药物作用于 *E. coli* 4 h 期间释放内毒素的比较

Table 1 Endotoxin release from exposure of *E. coli* to antibiotics during 4 h

Antimicrobial agents 256×MIC	Free LPS ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)			1 h LPS/4 h LPS
	1 h	2 h	4 h	% ¹⁾
Ceftizadime	42±7	78±14	118±10	29
Ceftriaxone	16±5	186±17	502±64	1
Imipenem	37±10	46±10	51±7	65
Ciprofloxacin	22±8	43±12	110±14	12
Amikacin	14±5	23±3	32±7	18
Ceftizadime + Amikacin	15±3	26±5	30±8	25
Control	12±3	24±2	167±23	

1) LPS induced by antimicrobial agents

2.3 细菌形态学检查

亚胺培南-西司他丁 1 h 快速杀菌; 头孢他啶 1 h, 快速杀菌及少许丝状体形成; 头孢曲松 2 h 丝状体形成, 环丙沙星和阿米卡星 2 h 无明显形态改变。见图 2。

3 讨论

革兰阴性菌感染治疗应消除两个致死因素: 菌血症和内毒素血症。在体外实验有高效的抗菌药物用于临床, 但与感染相关的内毒素休克的发生率和死亡率仍很高^[4], 抗菌药物诱导细菌内毒素释放进入血循环是其原因之一。近年来国外学者的实验中已证实^[2]。

我们选择对大肠杆菌敏感的不同类型的 5 种抗菌药物作用于大肠杆菌, 在对照培养, 菌落计数和内毒素水平按比例增加, 而所有抗菌药物作用培养中, 菌落计数均减少, 游离内毒素增加, 显示用抗菌药物治疗革兰阴性菌感染时可诱导内毒素释放。

不同抗菌药物诱导细菌内毒素释放的潜能是否不同? 本实验结果显示, 5 种抗菌药物释放内毒素量不同, 头孢曲松大于头孢他啶和环丙沙星大于亚胺培南-西司他丁大于阿米卡星。5 种抗菌药物内毒素释放速率也不同, 亚胺培南-西司他丁最快, 其次是头孢他啶, 阿米卡星缓慢, 头孢曲松最慢。

内毒素释放潜能和速率不同与抗菌药物作用机制有关, 一般认为杀菌剂及作用于细胞壁的抗菌药物较抑菌剂或作用于核蛋白、核酸的药物释放内毒素多^[5], β -内酰胺类抗生素诱导内毒素释放的差异与青霉素结合蛋白 (Penicillin-Binding Proteins, PBPs) 有关。与 PBPla 和 PBPlb 结合的抗生素快速

杀菌, 细胞壁裂解; 与 PBP2 结合的抗生素使细菌变成球形, 活性消失, 不伴细胞壁进一步降解及细菌成份的释放; 与 PBP3 结合的抗生素, 抑制细菌分裂, 导致细菌形成丝状体, 细菌死亡前继续生长数小时, 期间仅有有限杀菌活性和溶菌, 细菌生物量增加^[6]。亚胺培南-西司他丁主要和 PBP2 结合, 致细菌形成球状体, 内毒素释放量少, 有报道高浓度时亦与 PBPlb 结合^[2], 本实验显示其在 256×MIC 浓度 1 h 快速杀菌, 证实同时结合 PBPlb, 故释放内毒素快。实验观察到头孢曲松致细菌形成丝状, 示特异结合 PBP3, 内毒素含量增加, 最终释放增多, 呈现缓慢杀菌和内毒素缓慢释放, 但 4 h 后内毒素大量释放。头孢他啶主要和 PBP3 结合, 同时也与 PBPla 结合^[6], 实验显示快速杀菌并少量丝状体形成, 故释放内毒素量较头孢曲松少, 释放较快。

喹诺酮类抗菌药抑制 DNA 旋转酶, 不作用于细胞壁, 理论上应导致少量内毒素释放。但在本实验中发现有中等量内毒素释放, 可能与其限制或重置胞壁外膜中的 2 价阳离子 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+}), 影响 LPS 和外膜磷脂分子间的桥联和稳定^[7], 致内毒素释放有关。

氨基糖甙类抗生素作用于细胞膜和抑制核糖体, 细菌失活而无细胞壁裂解^[8]。本实验观察到阿米卡星在杀菌同时只缓慢地释放少量内毒素, 可能与其不破坏细胞壁, 致细菌内毒素被保留有关。

一般认为头孢菌素和氨基甙类抗生素联合用药有协同作用。本实验显示头孢曲松和阿米卡星联合应用杀菌效率明显提高, 菌落下降速度和两药单独应用差别明显 ($P < 0.05$), 且诱导内毒素释放量较头孢曲松单独应用明显减少 ($P < 0.05$)。可能与联合用药迅速杀菌, 抑制头孢曲松诱导细菌丝

状态形成有关。

结合本实验结果我们认为,治疗革兰阴性菌感染,特别是合并严重败血症时,选择抗菌药物在考虑它的杀菌活性同时,还应考虑该药致内毒素释放速率和潜能,以防止血浆内毒素水平进一步升高,诱发或加重休克。

(本文图2见插页2)

参 考 文 献

- 1 Rietschel E T, Brade L, Schade U, *et al*. Bacterial lipopolysaccharides; relationship of structure and conformation to endotoxic activity, serological specificity and biological function. *Adv Exp Med Biol*, 1990, 256(1):81
- 2 Hurley J C, Louis W J, Tosolini F A, *et al*. Antibiotic-induced release of endotoxin; reappraisal. *Clin Infect Dis*, 1992, 15(11):840
- 3 李影林. 临床微生物学及检验. 长春:吉林科学技术出版社, 1991. 292~294

- 4 Parrillo J E, Parker M M, Watanson C, *et al*. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Intern Med*, 1990, 113(3):227
- 5 Prins J M, Van Deventer S J H, Kuijper E J, *et al*. Clinical relevance of antibiotic-induced endotoxin release. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(6):1211
- 6 Neu H C. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med*, 1985, 79(suppl 2A):2
- 7 Hancock R E W. Antibiotic uptake into gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1988, 7(8):713
- 8 Vanden Berg C A, Neeling A J, Schot C S, *et al*. Delayed antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli* in vitro is correlated with enhancement of LPS release. *Scand J Infect Dis*, 1992, 24(8):619

(1998-10-09 收稿 1999-04-28 修回)

· 简 讯 ·

中山医科大学博士后吴忠道发现新的日本血吸虫基因

中山医科大学基础医学博士后吴忠道在站研究发现新的日本血吸虫基因,已被 GenBank 接受进入新序列号。

吴博士在站2年间由余新炳教授指导下开展研究工作。通过对已构建的日本血吸虫(中国大陆株)成虫 cDNA 文库(Sj cDNA)的免疫学筛选分离和鉴定血吸虫重组抗原 cDNA 克隆,应用对再感染具有抵抗力的个体混合血清,从 Sj cDNA 文库中筛选到5个日本血吸虫抗原基因(cDNA)克隆,1个为 Sj GST 基因克隆,另4个为日本血吸虫未知基因重组克隆,其 EST 序列均已被 GenBank 接受并获得进入新序列号,经初步的免疫学鉴定和动物实验结果表明,上述基因可能是新的疫苗候选抗原基因。进一步用 EST-PCR 直接序列分析获得了21个血吸虫表达基因 EST 序列,其中19个已被 GenBank 接受并登录。

日本血吸虫病是严重危害人体健康的寄生虫病,我国的血防形势仍较严峻、防治任务长期而艰巨,在实施以吡喹酮人群化疗为主的现有防治措施的同时,积极开展血吸虫疫苗研究,寻找更加持续有效的防治手段十分重要。吴博士的研究为血吸虫基因组计划提供了未知基因的 EST 序列资料,为进一步开展日本血吸虫(中国大陆株)表达基因 EST 的研究,为 Sj 疫苗候选抗原基因的筛选提供了科学依据,此项研究也为开展国际合作研究打下了基础。

在吴博士7月5日的出站工作报告会上,以卫生部血吸虫病专家(咨询委员会副主任委员郑江研究员为评议主席的专家组对该研究给予了极高的评价,认为吴博士的出站报告是一篇优秀的报告。

(冯世容)

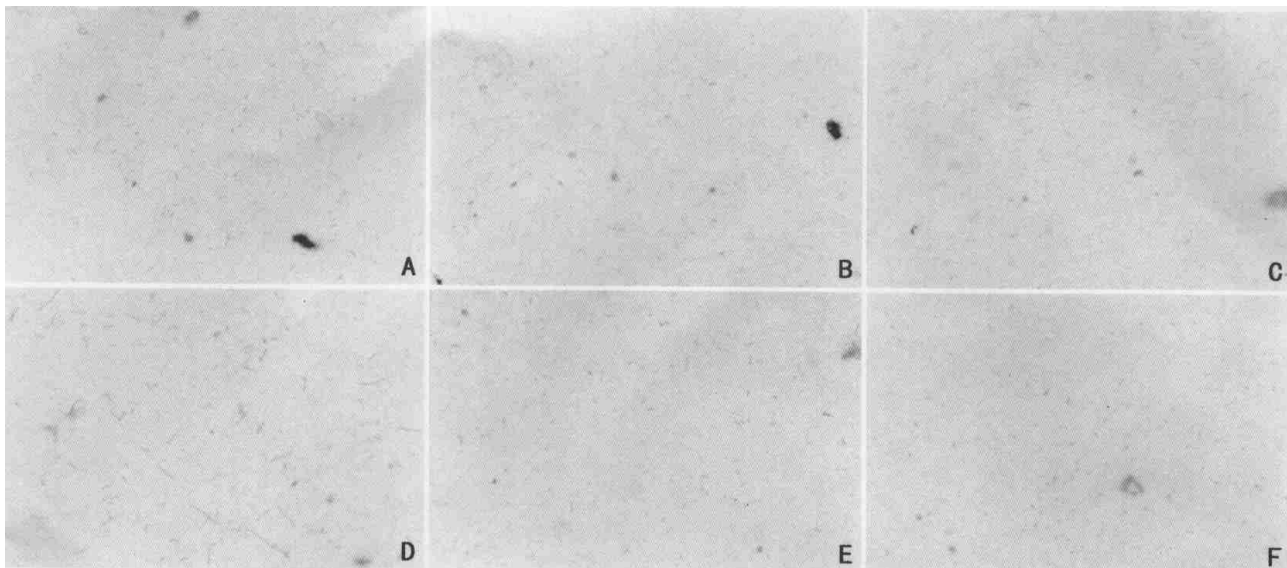


图 2 抗菌药物对 *E. coli* 形态学的影响 ($\times 100$)

Fig. 2 Effect of antibiotics on morphology of *E. coli*

A. Control (no antibiotics); B. Imipenem ($256 \times \text{MIC}$) 1 h; C. Ceftizadime ($256 \times \text{MIC}$) 1 h
D. Ceftriaxone ($256 \times \text{MIC}$) 2 h; E. Ciprofloxacin ($256 \times \text{MIC}$) 2 h; F. Amikacin ($256 \times \text{MIC}$) 2h

丽丝胺罗丹明 B 脂质体两种制备方法的比较 (正文见封 3)

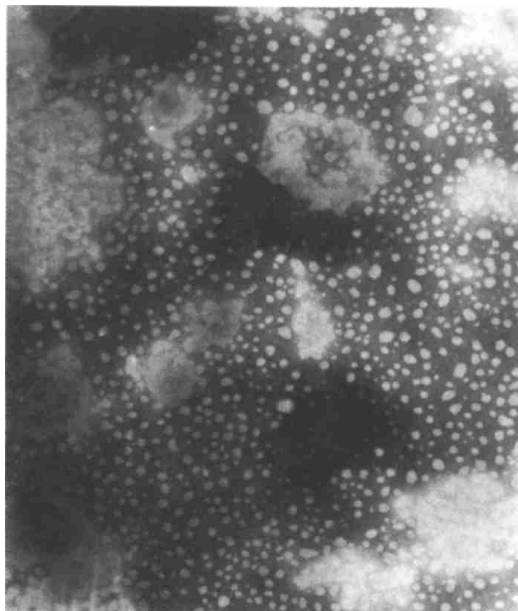


图 1 DUT 法 LESB 负染电镜
照片 ($\times 40\ 000$)

Fig. 1 Electronograph of LESB
with DUT method

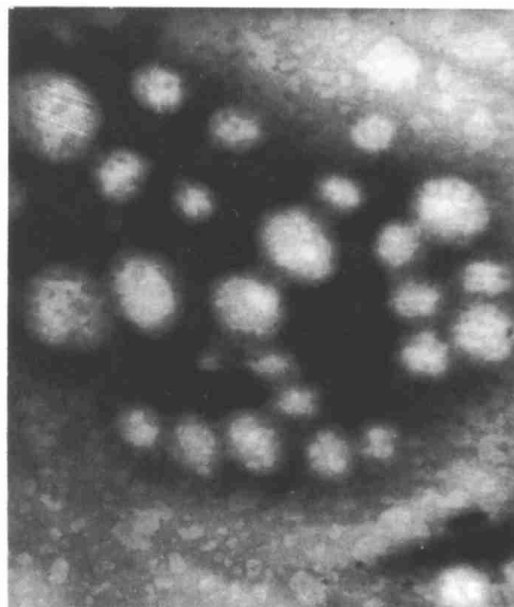


图 2 RPE 法 LESB 负染电镜
照片 ($\times 30\ 000$)

Fig. 2 Electronograph of LESB
with RPE method