技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)07-1040-03

β-内酰胺酶抑制剂抑酶动力学研究

李勇涌,黄文祥,朱卫民
(重庆医科大学附属第一医院感染科 重庆市传染病寄生虫病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究舒巴坦、克拉维酸和他唑巴坦3种抑制剂对临床上产酶菌株的抑制作用,来比较3种抑制剂的抑酶方式和抑酶效果。方法:分光光度法研究3种抑制剂对8株产酶菌所产 β-内酰胺酶的抑酶效力,Dixon 作图法求取抑制常数 Ki,并计算相关抑制动力学参数。结果:3种抑制剂对8株细菌所产 β-内酰胺酶均为竞争性抑制方式,3种抑制剂里舒巴坦抑制效果相对最弱,他唑巴坦最强。结论:3种抑制剂对不同产酶菌株所产 β-内酰胺酶抑制效果有较大差异。

【关键词】β-内酰胺酶;酶动力学;β-内酰胺酶抑制剂
【中国图书分类法分类号】R977.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-16

Study of inhibitory kinetics of lactamase inhibitors

LI Yong-yong, et al
(*Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Chongqing Infectious and Parasitic Diseases*)

【Abstract】*Objective*: To study the inhibitory activity of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam on the clinical bacterium which produces β-lactamase. Compare the inhibitory ways and inhibitory effects of three inhibitors. *Methods*: Study of inhibitory activity of these three β-lactamase on the 8 bacteria producing β-lactamase by spectrophotometry. Inhibition constant (Ki) were obtained from dixon plot and the relevance kinetic parameters of inhibition were calculated. *Result*: All inhibition modality of 3 β-lactamase inhibitors are the competitive inhibition. Sulbactam is the weakest of the relative inhibitory effect of three inhibitors, and the strongest is tazobactam. *Conclusion*: There were differences between inhibitory effects of three enzyme inhibitors on different strains producing β-lactamase.

【Key words】β-lactamase; Enzyme kinetic; β-lactamase inhibitors

细菌产生 β-内酰胺酶是细菌产生获得性耐药的主要机制之一,为了有效控制耐药菌感染,除了发展耐酶抗生素以外,发展酶抑制剂也是一个主要方向。舒巴坦、克拉维酸和他唑巴坦是临床长期以来广泛使用的 β-内酰胺酶抑制剂,均为化学合成。它们通过抑制 β-内酰胺酶活性而达到保护 β-内酰胺抗生素的目的。这3种抑制剂均为不可逆竞争性抑制剂,它们在正常的水解反应过程中,不同程度地出现一些次级反应稳定酶—底物中间体,导致 β-内酰胺酶不可逆地抑制[1]。本文通过研究三种抑制剂的抑酶动力学,对临床合理使用抗生素及抑制剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

经 Nitrocefin 鉴定的我院 2008 年 1 月至 2008 年 12 月临床分离的产 β-内酰胺酶的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中各4株,分别为大肠埃希菌(Ec)617、618、521、546 和肺炎克雷伯菌(Kp)377、453、456、479。所选菌株均用 Bio-Merieux 公司 VITEK-AMS 系统鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC70060。

1.2 药品与试剂

头孢噻吩(Cephalothin,CLT,Sigma 公司);舒巴坦(Sulbactam,Sul)、克拉维酸(Clavulanic acid,CLA)及他唑巴坦(Tazobactam,Taz)购自中国药品生物制品检定所;所用药敏试验抗生素头孢噻吩、哌拉西林、头孢唑啉、头孢噻肟、头孢哌酮、头孢吡肟、头孢呋辛、头孢他啶、亚胺培南均购自中国药品生物制品鉴定所;nitrocefin(β-内酰胺酶特异性鉴定试剂,英国 Glaxo 公司);PBS 缓冲液(北京中杉)。

1.3 仪器

超声细胞破碎仪(Soniprep 150 型,日本 Sanyo 公司);UV-265 型紫外分光光度计(日本 Kyoto 公司);低温超速离心机(3K30 型,Sigma 公司);SHA-C 型水浴恒温振荡器(江苏金坛中大仪器厂)。

作者介绍:李勇涌(1985-),男,硕士,
研究方向:感染性疾病的基础与临床研究。
通讯作者:朱卫民,女,副教授,E-mail:zwmcyc@sina.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2007BB5317);重庆市教委科学技术研究项目基金资助项目(编号:KJ070308)。

1.4 抗菌药物最低抑菌浓度（Minimal inhibitory concentration，MIC）测定

采用琼脂稀释法检测 9 种常见抗生素对 8 株细菌的最低抑菌浓度，操作方法参照美国实验室标准化委员会（Clinical and laboratory standards institute，CLSI）的法规进行，结果解释标准参照 2007 年 CLSI 的临界值判定[2]。

1.5 β-内酰胺酶的制备及鉴定

β－内酰胺酶粗提液的制备采用超声细胞破碎法，nitrocefin 检测酶的活性，蛋白定量后 -20℃保存，具体方法参见文献[3]。

1.6 抑制剂抑酶方式的比较[4]

将舒巴坦、克拉维酸和他唑巴坦用 pH 7.0，0.05 mol/L 的 PBS 缓冲液配制成 1 μmol/L，分别与不同浓度的头孢噻吩在 37℃，pH 7.0 条件下平衡后，加入定量酶液，在 265 nm 处测定酶反应的初速度，L-B 作图法求出加抑制剂前后的米氏常数（Km）和最大反应速度（Vmax），判断 3 种抑制剂的抑酶方式。

1.7 抑制常数 Ki 的求取

以 Dixon 作图法求取抑制常数 K[4]。

2 结 果

2.1 药敏结果

临床常用的 9 种抗生素对 8 株细菌药敏结果见表 1。由表可知，除 Ec617、Ec521、Kp479 对头孢他啶敏感，Ec618 对头孢他啶中介，Kp479、Kp453 对头孢吡肟敏感，Ec617、Ec521、Kp377、Kp456 对头孢吡肟表现为中介外，对 β－内酰胺类抗生素 8 株细菌基本均表现为耐药，而所有菌株对碳氢霉烯类抗生素亚胺培南均敏感。

2.2 3 种抑制剂的抑酶作用

3 种抑制剂的抑制动力学参数见表 2、表 3、表 4。由表可知，3 种抑制剂对 8 株细菌所产 β－内酰胺酶均具有抑制活性，但是抑制常数 Ki 都比较大，说明抑制活性较弱，所有抑制剂的 K^{app}_m/V^{app}_{max} 均大于 K_m/V_{max}，说明 3 段抑制剂对 β－内酰胺酶的亲和力大于酶对底物头孢噻吩的亲和力。而加入抑制剂前后酶水解底物的最大速度没有明显变化，即 V^{app}_{max}/V_{max} 均基本等于 1，符合竞争性抑制剂的动力学特点[4]，说明 3 段抑制剂均为竞争性抑制剂。

3 讨 论

产生 β－内酰胺酶是细菌对 β－内酰胺类抗生素耐药最重要和最常见的机制。碳青霉烯类抗生素是抗菌谱最广的一类 β－内酰胺类抗生素，具有抗菌活性强、对革兰氏阴性菌有抗生素后效应，对多数 β－内酰胺酶稳定的特点。临床上目前对抗产 β－内酰胺酶耐药菌感染主要使用碳氢霉烯类抗生素，本实验结果显示所选取 8 株产 β－内酰胺酶菌株对碳氢霉烯类抗生素亚胺培南均高度敏感，说明碳氢霉烯类

表 1 8 株产 β－内酰胺酶菌株对 9 种抗生素的药敏结果（MIC，mg/L）

药物	Ec617	Ec618	Ec521	Ec546	Kp377	Kp479	Kp453	Kp456
哌拉西林	256	128	128	256	>256	256	128	>256
头孢唑啉	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
头孢噻吩	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
头孢呋辛	>256	>256	>256	>256	>256	256	256	>256
头孢噻肟	64	256	128	256	128	32	32	128
头孢哌酮/舒巴坦	16	128	16	32	64	32	32	64
头孢他啶	2	16	1	64	64	8	128	64
头孢吡肟	16	128	16	64	16	8	2	16
亚胺培南	0.125	0.25	0.06	0.125	0.25	0.125	0.06	0.125

2 克拉维酸对 8 株细菌所产 β－内酰胺酶的抑制动力学参数

酶	K^{app}_m/K_m	V^{app}_{max}/V_{max}	K^{app}_m/V^{app}_{max}	K_m/V_{max}	K_i	K_i/K_m
Ec617	1.82	1	0.51	0.28	3.20	0.56
Ec618	3.85	1	0.42	0.11	0.30	1.35*10-2
Ec521	1.66	1	0.36	0.22	5.50	1.1
Ec546	1.96	1	0.41	0.21	2.30	0.36
Kp377	2.12	1	0.86	0.41	0.90	0.10
Kp479	1.78	1	0.36	0.20	1.20	0.23
Kp453	1.54	1	0.41	0.27	1.70	0.25
Kp456	2.21	1	0.40	0.18	0.80	4.50*10-2

K_m、V_{max}：为未加抑制剂时各酶水解头孢噻吩的米氏常数和最大反应速度（下同）；K^{app}_m、V^{app}_{max}：为加入 1 μmol/L 抑制剂后各酶水解头孢噻吩的米氏常数和最大反应速度（下同）；K_i：所加抑制剂对各酶的抑制常数（下同）

表 3 舒巴坦对 8 株细菌所产 β－内酰胺酶的抑制动力学参数

酶	K^{app}_m/K_m	V^{app}_{max}/V_{max}	K^{app}_m/V^{app}_{max}	K_m/V_{max}	K_i	K_i/K_m
Ec617	1.30	1	0.36	0.28	5.80	1.02
Ec618	2.23	1	0.24	0.11	1.10	$4.95*10^{-2}$
Ec521	1.54	1	0.34	0.22	3.30	0.66
Ec546	1.47	1	0.31	0.21	3.70	0.58
Kp377	1.38	1	0.57	0.41	4.10	0.47
Kp479	1.55	1	0.31	0.20	5.50	1.05
Kp453	1.13	1	0.30	0.27	8.60	1.25
Kp456	1.88	1	0.34	0.18	2.60	0.15

表 4 他唑巴坦对 8 株细菌所产 β－内酰胺酶的抑制动力学参数

酶	K^{app}_m/K_m	V^{app}_{max}/V_{max}	K^{app}_m/V^{app}_{max}	K_m/V_{max}	K_i	K_i/K_m
Ec617	2.38	1	0.67	0.28	3.50	0.63
Ec618	4.15	1	0.46	0.11	0.20	0.90×10^{-2}
Ec521	1.67	1	0.37	0.22	4.30	0.86
Ec546	2.53	1	0.53	0.21	1.80	0.28
Kp377	2.88	1	1.18	0.41	1.70	0.20
Kp479	2.32	1	0.46	0.20	2.20	0.42
Kp453	1.86	1	0.50	0.27	3.40	0.50
Kp456	2.43	1	0.44	0.18	1.70	9.6×10^{-2}

仍是治疗产 β－内酰胺酶细菌的最可靠的药物[5]。要解决产 β－内酰胺酶细菌耐药性的主要途径是开发 β－内酰胺酶抑制剂，目前已有 3 种化学合成的 β－内酰胺酶抑制剂（舒巴坦、他唑巴坦和克拉维酸）广泛应用于临床并曾取得良好效果。根据将酶抑制剂与抗生素联合使用的目的，组方后应能使产酶菌由对抗生素耐药转为敏感[6]。随着抗生素临床耐药菌种类的不断增多，抑制剂的研究与利用将为临床克服细菌耐药性发挥重要作用。

本实验 3 种抑制剂对 8 株细菌所产 β－内酰胺酶均为竞争性抑制方式，3 种抑制剂的抑制常数差异较大，这跟不同菌株所产 β－内酰胺酶的类型有关。整体上舒巴坦的抑制作用要弱于其它 2 种抑制剂，舒巴坦的抑酶谱与克拉维酸相似，活性稍差，但稳定性较克拉维酸强[7]。克拉维酸是强力、广谱且不可逆的 β－内酰胺酶抑制剂，可抑制广谱和超广谱酶。但不能抑制Ⅰ类酶[8]。从实验结果可以看出他唑巴坦的抑制作用要强于其它两种抑制剂，因为其对Ⅰ～Ⅴ类型产酶菌有良好的抑酶作用，尤对Ⅰ型酶的抑制作用远强于克拉维酸和舒巴坦。他唑巴坦钠具有毒性低、抑酶活性强、稳定性好等优点，是目前临床上使用的最有前途的一种 β－内酰胺酶抑制剂。他唑巴坦比克拉维酸稳定且不会产生诱导酶，它比舒巴坦抑酶作用强，但对 B 类及大部分 C 类酶抑制作用弱。本实验结果也与文献报道基本一致[9,10]。

参 考 文 献

[1] Niki Y.Fundamental and clinical studies on beta-lactamase inhibitors[J].Nippon-Ronsho,2001,59(4):771-776.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute.Performance standards for antimiembial susceptibility testing document M100-S17 [S].CLSI,2007.

[3] 朱卫民，钱元恕.TEM 型 β－内酰胺酶动力学研究[J].中国抗生素杂志，2001，26(6)：460-463.

[4] 陈惠黎，李文杰.分子酶学[M].北京：人民卫生出版杜，1983.177-312.

[5] 胥 飚，曹 何，余显书.肠杆菌科产超广谱 β－内酰胺酶菌株的耐药性及基因型分析[J].重庆医科大学学报，2004，29(6)：781-783.

[6] Buynak J D.Understanding the longevity of the beta-lactam antibiotics and of antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations [J].Biochem Pharmacol,2006,71(7):930-940.

[7] 张建民，冯玲玲，李 勇，等.抗菌药的增效剂[J].中国药师，2003，6(3)：172-173.

[8] Finlay J,Miller L,Poupard J A.A review of the antimicrobial antivity of clavulanate[J].J Amimlerob Chemother,2003,52(1):18-23.

[9] Bush K. Classification of beta- lactamases:groups1,2a,2b,and 2b' [J]. Antimicrob Agents Chemother,1989,33(3):264-270.

[10] Bush K, Macalintal C, Rasmussen B A,et al.Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes[J].Antimicrob Agents Chemother,1993,37(4):851-858.

（责任编辑：冉明会）