

· 临床论著 ·

还原型谷胱甘肽下调亚胺培南对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的抗菌活性

于亮 王梅

【摘要】 目的 探讨还原型谷胱甘肽对亚胺培南抗耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌活性的影响及其机制。

方法 采用PCR方法检测6株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶(OXA-23、IMP、VIM、OXA-24)的基因携带情况。采用微量肉汤稀释法检测亚胺培南对6株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌最低抑菌浓度(MIC)值及不同浓度还原型谷胱甘肽(15 mg/ml、7.5 mg/ml、1.5 mg/ml、0.75 mg/ml)干预后亚胺培南MIC值的变化。采用四唑氮蓝检测还原型谷胱甘肽干预后细菌细胞内外活性氧的变化。结果 6株细菌均携带OXA-23碳青霉烯酶基因,不同浓度的还原型谷胱甘肽(15 mg/ml、7.5 mg/ml、1.5 mg/ml、0.75 mg/ml)干预后,亚胺培南的MIC值分别为4096 mg/L、1024 mg/L、512 mg/L和128 mg/L,较未干预组(64 mg/L)显著提高;经1.5 mg/ml还原型谷胱甘肽干预后,细菌细胞内外活性氧均增加。结论 还原型谷胱甘肽可降低亚胺培南对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的杀菌活性,与活性氧引起的抗菌效应无关。

【关键词】 亚胺培南; 还原型谷胱甘肽; 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌; 活性氧

Reduced glutathione decreased the antibacterial activity of imipenem against the carbonpenem-resistant *Acinetobacter baumannii* YU Liang, WANG Mei. Respiratory ICU of Taian Central Hospital, Taian 271000, China
Corresponding author: YU Liang, Email: liangy1996@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanism of reduced glutathione on the antibacterial activity of imipenem against carbonpenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Methods The carbapenemases (OXA-23, IMP, VIM and OXA-24) gene of 6 carbonpenem-resistant *Acinetobacter baumannii* were analyzed by PCR. The imipenem minimum inhibitory concentration (MIC) values against *Acinetobacter baumannii* were detected by the broth micro-dilution assay. The changes of MIC values after reduced glutathione (15 mg/ml, 7.5 mg/ml, 1.5 mg/ml and 0.75 mg/ml) intervention were recorded, respectively. The intracellular and extracellular reactive oxygen species were measured by tetrazolium detection before and after glutathione intervention. Results Total of 6 strains of bacteria carried OXA-23 carbapenemase gene, and MIC values of the imipenem were 4096 mg/L, 1024 mg/L, 512 mg/L, 128 mg/L and 64 mg/L, respectively, after different concentrations of glutathione (15 mg/ml, 7.5 mg/ml, 1.5 mg/ml, 0.75 mg/ml and 0 mg/ml) intervention. The extracellular and intracellular reactive oxygen species increased after glutathione (1.5 mg/ml) intervention significantly compared with no-intervention. Conclusions The reduced glutathione decreased the antibacterial activity of imipenem against carbonpenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, which had nothing to do with the antibacterial effect caused by reactive oxygen species.

【Key words】 Imipenem; Glutathione; Carbonpenem-resistant; *Acinetobacter baumannii*; Reactive oxygen species

研究发现,还原型谷胱甘肽对不同菌株,不同抗菌药物的抗菌作用呈现增强或减弱现象^[1-2]。鲍曼不动杆菌是目前临床上较为常见的条件致病菌,近几年来其耐药性尤其是对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性增长

迅速^[3],目前对还原型谷胱甘肽对于碳青霉烯抗菌药物抗耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌活性的影响报道尚少,本研究对此进行了初步探讨,报道如下。

资料与方法

一、主要材料和仪器

收集2011年12月至2012年6月本院临床分离的6株

鲍曼不动杆菌,经VITEK重新鉴定均为仅对黏菌素敏感的多耐药鲍曼不动杆菌。质控菌为铜绿假单胞菌(ATCC27853)。亚胺培南-西司他丁(默沙东制药公司);还原型谷胱甘肽(意大利斯德大药厂)。水酞蛋白(MH)肉汤和MH琼脂(美国Difco),比浊仪(法国生物梅里埃),连续微量加样器、八道微量加样器(德国Eppendorf),96孔平板(美国Costar),酶标仪(芬兰雷勃),紫外分光光度计(上海棱光)。琼脂糖购自英国OXOID公司;2×Taq PCR MasterMix、核酸分子量标记(DNA size marker) II、III均购于北京天根生化科技公司;引物合成及PCR产物测序由上海英骏公司完成。主要仪器有PCR扩增仪(MJ公司PTC-200,美国),电泳仪(Bio Rad公司,美国),凝胶成像分析系统(美国UVP)。

二、方法

1. 质粒提取及碳青霉烯酶基因的检测:新鲜培养的细菌平板上挑取4~5个菌落,接种于MH肉汤中增菌12 h。菌液用3 ml MH肉汤,比浊仪下校正浊度至0.5麦氏单位,再用MH肉汤稀释至 1.5×10^8 CFU/L,根据试剂盒说明进行操作,分别提取细菌基因组DNA和质粒。采用PCR方法以基因组DNA为模板,扩增IMP型、VIM型及OXA型碳青霉烯酶基因,PCR产物纯化后测序。PCR反应总体积为20 μ l,其中引物各1.5 μ l,2×Taq PCR Master Mix 10 μ l,DNA模板1 μ l,加水补足体积至20 μ l。扩增产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳。扩增所用的引物、反应条件参考文献^[4-6]进行,见表1。

2. 微量肉汤稀释法检测最低抑菌浓度值:从已分纯并过夜新鲜培养的细菌平板上挑取4~5个菌落,接种于MH肉汤中增菌6 h。菌液用3 ml MH肉汤以比浊仪校正浊度至0.5麦氏单位,再用MH肉汤稀释至 1.5×10^5 CFU/ml。亚胺培南用无菌蒸馏水配制最终浓度为2096 mg/L的储备液、大蒜素为3 g/L。

将亚胺培南储备液以灭菌MH肉汤倍比稀释成11个阶梯浓度,分别为512 mg/L、256 mg/L、128 mg/L、64 mg/L、32 mg/L、16 mg/L、8 mg/L、4 mg/L、2 mg/L、1 mg/L和0.5 mg/L,将配好的抗菌药物加入96孔平板中,同时设置亚胺培南、亚胺培南+还原型谷胱甘肽15 mg/L、7.5 mg/L、1.5 mg/L和0.75 mg/ml组,再将 1.5×10^5 CFU/ml的菌液100 μ l加入孔中,37℃过夜培养。观察记录各组亚胺培南的MIC值。

3. 琼脂板K-B法检测药物的相互作用:将MH营养琼脂加热溶解后,在琼脂培养基冷却冷却待用。分别取菌液浓度为 1.5×10^8 CFU的菌株0.2 ml,用医用棉签均匀涂布琼脂培养基表面,置室温3~5 min

表1 IMP型、VIM型和OXA型碳青霉烯酶基因的PCR引物序列

名称	引物序列	长度 (bp)
bimp FR ^[4]	5' -CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	587
bimp RV	5' -AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'	
bVIM FR ^[5]	5' -AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'	261
bVIM RV	5' -ATGAAAGTGCCTGGAGAC-3'	
boxa23 FR ^[6]	5' -GATGTGTCATAGTATTCGTCG-3'	1067
boxa23 RV	5' -TCACAACAATAAAAGCACTG-3'	
boxa24 FR ^[6]	5' -GTACTAATCAAAGTTGTGAA-3'	1067
boxa24 RV	5' -TTCCCTAACATGAATTGT-3'	

后,用无菌镊子贴加亚胺培南和自制的300 μ g还原型谷胱甘肽滤纸片,间距5 mm,然后将平皿置于37℃恒温培养箱培养24 h后,测定亚胺培南纸片周围抑菌环直径的大小。

4. 四唑氮蓝(nitroblue tetrazolium, NBT)采用文献^[7]报道方法,培养皿培养细菌,收集后离心,用PBS液(pH7.0)重新悬浮细菌,调整细菌浓度为 $A_{600nm}=1$,取100 μ l细菌悬液与500 μ l的1 mg/ml NBT分别和100 μ l 1.5 mg/ml还原型谷胱甘肽、100 μ l PBS(对照组)、100 μ l 1.5 mg/ml还原型谷胱甘肽+10 mg/L的亚胺培南、10 mg/L的亚胺培南混匀,37℃放置30 min,后加入100 μ l的0.1 mmol/L HCl,放置5 min后。4000 r/min离心10 min,取上清,分光光度计在波长575 nm下检测光密度值,即为细胞外活性氧检测值。离心后沉淀用600 μ l二甲基亚砷重悬,加入800 μ l PBS,充分混匀,室温放置5 min,分光光度计在波长575 nm下,检测光密度值(A),即为细胞外活性氧检测值。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,两组间均数比较用t检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、6株耐药鲍曼不动杆菌质粒的琼脂糖电泳结果
6株耐药鲍曼不动杆菌的质粒经琼脂糖电泳分离后,分子量均大于4500 bp,见图1。

二、碳青霉烯酶OXA-23 PCR的扩增结果

6株泛耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶OXA-23 PCR均可扩增出1067 bp条带,目的条带测序结果与OXA-23基因序列相同,见图2。

三、还原型谷胱甘肽对亚胺培南MIC值的影响

6株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌对亚胺培南的MIC值均为64 mg/L,分别采用不同浓度的还原型谷胱甘

表2 药物干预后细菌细胞内外活性氧的变化

组别	样本数	$A_{575nm} (\bar{x} \pm s)$	
		细胞外活性氧	细胞内活性氧
对照组	6	0.073 ± 0.001	0.242 ± 0.002
还原型谷胱甘肽	6	0.158 ± 0.003	0.507 ± 0.003
还原型谷胱甘肽+亚胺培南	6	0.189 ± 0.003	0.567 ± 0.005
亚胺培南	6	0.098 ± 0.004	0.289 ± 0.002
<i>F</i>		1951.31	14593.67
<i>P</i>		0.0000	0.0000

注：还原型谷胱甘肽药物浓度为1.5 mg/ml，美罗培南药物浓度为10 mg/ml

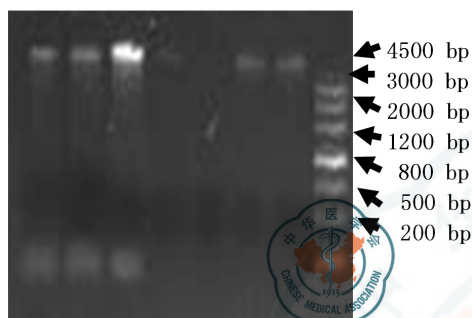
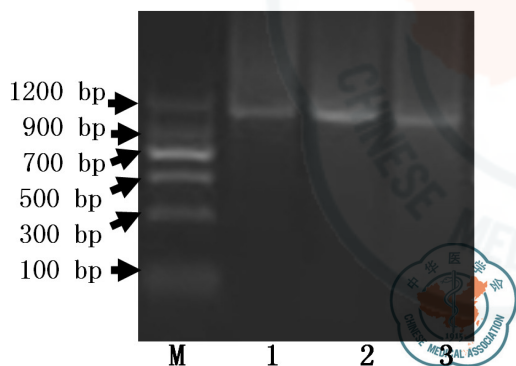


图1 泛耐药鲍曼不动杆菌提取质粒琼脂糖电泳结果



注：M：分子量标记1~3为泛耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶OXA-23 PCR扩增结果，目的条带1067 bp

图2 碳青霉烯酶OXA-23 PCR扩增琼脂糖电泳结果

肽（15 mg/ml、7.5 mg/ml、1.5 mg/ml和0.75 mg/ml）干预后，MIC值分别为4096 mg/L、1024 mg/L、512 mg/L和128 mg/L，较未干预组显著增加。

四、K-B法检测还原型谷胱甘肽对亚胺培南抗菌活性的影响

还原型谷胱甘肽使亚胺培南抑菌圈明显减小，见图3。纸片上有字迹者为亚胺培南药片（10 μg），纸片空白者为还原型谷胱甘肽（300 μg）纸片。

五、还原型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽+亚胺培南、亚胺培南对细菌细胞内外活性氧的影响

与未用药物干预组相比，10 mg/L亚胺培南、1.5 mg/ml还原型谷胱甘肽，10 mg/L亚胺培南+ 1.5 mg/ml还原型谷胱甘肽分别作用于细菌后，细菌内外活性氧均增加，分别为：10 mg/L亚胺培南+ 1.5 mg/ml

还原型谷胱甘肽 > 1.5 mg/ml还原型谷胱甘肽 > 10 mg/L亚胺培南，见表2。

讨 论

还原型谷胱甘肽是人类细胞质中自然合成的一种多肽，具有维持细胞生物功能的重要作用。能激活多种酶，如巯基酶等^[8]，从而促进糖、脂肪及蛋白质代谢，并能影响细胞的代谢过程；通过巯基与体内的自由基结合，可转化成容易代谢的酸类物质从而加速自由基的排泄^[9]。细菌抗氧化系统能够清除过多的自由基和活性氧，并能防止活性氧对生物结构进行破坏^[10]。还原型谷胱甘肽可对多种氧化物如过氧化氢、超氧阴离子、羟基自由基等引起的氧化损伤起到防护作用，保护生物膜，避免脂质过氧化损伤^[11]。同时，在活性氧存在的条件下，谷胱甘肽自身氧化，中和活性氧。

国外学者研究发现，还原型谷胱甘肽可以使耐药的金黄色葡萄球菌对环丙沙星、庆大霉素的耐药性降低，并与细胞内活性氧生成相关^[1]，本研究结果却与其相反，还原型谷胱甘肽可以使耐药鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药性增强，分析与所选细菌种类差别有关。本研究中耐药鲍曼不动杆菌在补充外源性还原型谷胱甘肽的条件下，对亚胺培南的耐药性明显增强，MIC值增高可达几十倍。还原型谷胱甘肽低于0.5 mg/ml的条件下，亚胺培南对细菌MIC值无明显影响，由于干预所用的还原型谷胱甘肽浓度远高于临床上所用的常用浓度，因此，临床上使用还原型谷胱甘肽和亚胺培南时，并未发现有降低抗菌药物疗效的现象。

本研究发现耐药鲍曼不动杆菌在亚胺培南与还原型谷胱甘肽联合干预下，细胞内外活性氧较单独还原型谷胱甘肽干预均有不同程度增加，而活性氧对细菌的杀伤作用是抗菌药物作用的部分机制^[12]。理论分析提示，细菌细胞内外活性氧增加更有利于增强抗菌疗效。但在加入外源性还原型谷胱甘肽

后,细菌的耐药性明显增加,提示泛耐药鲍曼不动杆菌在补充外源性还原型谷胱甘肽后,出现对亚胺培南耐药性增强的现象与引起细菌细胞内外活性氧增加所产生的抗菌作用无关。

综上所述,还原型谷胱甘肽可降低亚胺培南对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的杀菌活性,与活性氧引起的抗菌效应无关。

参 考 文 献

- 1 Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*,2006,50(3):949-954.
- 2 Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*,2007,51(3):1119-1122.
- 3 于亮,王梅,姜梅杰,等.大蒜素对耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌体外抑菌作用的研究. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2012,7(1):50-55.
- 4 Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *J Clin Microbiol*,1996,34(12):2909-2913.
- 5 Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, et al. Outbreak of infectious caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*,2000,38(3):1290-1292.
- 6 Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*,2001,45(2):583-588.
- 7 Páez PL, Becerra MC, Albesa I. Effect of the association of reduced glutathione and ciprofloxacin on the antimicrobial activity in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*,2010,303(1):101-105.
- 8 Wu G, Fang YZ, Yang S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*,2004,134(3):489-492.
- 9 Wisniewski AV, Liu Q, Liu J, et al. Glutathione protects human airway proteins and epithelial cells from isocyanates. *Clin Exp Allergy*,2005,35(3):352-357.
- 10 Manfredini V, Duarte Martins V, et al. Adaptive response to enhanced basal oxidative damage in sod mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem*,2005,276(1-2):175-181.
- 11 刘振威,高风英,樊帆,等.还原型谷胱甘肽对慢性肺源性心脏病急性加重期患者血中脂质过氧化物及抗氧化酶活性的影响. *中国临床医学*,2007,3(3):310-312.
- 12 Drlica K, Malik M, Kerns RJ, et al. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother*,2008,52(2):385-392.

(收稿日期: 2012-09-17)

(本文编辑: 孙荣华)

于亮,王梅.还原型谷胱甘肽下调亚胺培南对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的抗菌活性[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*,2013,7(2):408-411.