

钙通道阻断剂维拉帕米对耐恩诺沙星大肠杆菌的体外增敏试验

田勇 乔健 赵立红 张建军 徐彤 利凯 王慧煜

(中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要 为评价钙通道阻断剂维拉帕米对耐抗菌药物恩诺沙星鸡源大肠杆菌体外增敏作用,采用试管倍比稀释法测定恩诺沙星、维拉帕米对临床分离的耐恩诺沙星、非耐恩诺沙星、标准大肠杆菌 O2 和 O78 共 96 株菌的最小抑菌质量浓度;恩诺沙星与维拉帕米联合药敏试验采用试管棋盘法,用部分抑菌浓度指数判断增敏效果。结果表明:维拉帕米单独使用对 96 株菌的最小抑菌质量浓度值均大于 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$;维拉帕米与恩诺沙星联用后对 77 株耐恩诺沙星大肠杆菌中 20 株表现为协同作用,46 株表现为相加作用;对其余 11 株临床耐药菌、17 株临床敏感菌和 2 株标准敏感菌表现为无关作用,拮抗作用的为零。说明维拉帕米本身无抗菌活性,但对耐恩诺沙星鸡源大肠杆菌的耐药性具有一定程度的增敏作用。

关键词 大肠杆菌;恩诺沙星;耐药性;维拉帕米;阻断剂

中图分类号 S 852.612; S 858.31

文章编号 1007-4333(2006)06-0079-04

文献标识码 A

Effect of verapamil on the resistance of enrofloxacin-resistant *Escherichia coli* in vitro

Tian Yong, Qiao Jian, Zhao Lihong, Zhang Jianjun, Xu Tong, Li Kai, Wang Huiyu

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The objective of this study was to determine the effect of verapamil on the activities of enrofloxacin against enrofloxacin-resistant *Escherichia coli* in vitro. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of enrofloxacin and verapamil on 96 strains of *E. coli* (including standard O2, O78) were tested with the method of broth two-fold dilution. Then the check-board system was used to determine the fractional inhibitory concentration (FIC) index of enrofloxacin combined with verapamil. The combined sensitivity test indicated that the synergic effect was 26% (20/77), addition effect was 60% (46/77) and indifferent effect was 14% (11/77) of enrofloxacin-resistant *E. coli*. The indifferent effect was also observed in all enrofloxacin-sensitive strains (including two standard O2, O78). No antagonistic effect was found in vitro. Verapamil can reduce the resistance of *E. coli* to enrofloxacin in vitro. The MICs of verapamil against 96 *E. coli* strains revealed that the efflux pump inhibitor had little effect on the *E. coli* itself.

Key words *Escherichia coli*; enrofloxacin; resistance; verapamil; blocking agent

恩诺沙星(enrofloxacin, EN)又称乙酰环丙沙星,是第一个畜禽专用的氟喹诺酮类抗菌药物,具有抗菌谱广、杀菌力强、体内分布广泛、生物利用度高和使用方便等优点^[1],自 1994 年农业部批准以来,在兽医临床上得到广泛的使用;但由于不合理使用,使禽源大肠杆菌对其产生了较为普遍的耐药性,并有逐年增加的趋势,严重影响了其疗效和临床应

用^[2-3],解决这一问题已成为研究人员急需探索的课题。维拉帕米(verapamil, VP)是一种钙通道阻断剂,是人医临床最常用抗心率失常药。早在 1982 年, Tsuruo 等^[4]就证实了维拉帕米对肿瘤细胞多药耐药(multi drug resistance, MDR)表型具有逆转作用。目前,VP 作为 MDR 的逆转剂在人医抗肿瘤方面研究较多^[5],作为细菌、真菌、原虫等微生物的耐

收稿日期: 2006-03-23

作者简介: 田勇, 博士研究生, 现工作单位河北北方学院, E-mail: tianyzn@163.com; 乔健, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事细胞信号转导和细胞生物学研究, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

药性的增敏剂也有报道^[6-8],但增敏结论并不一致;其对大肠杆菌多重耐药性的影响尚未见报道。本研究旨在探索维拉帕米对耐恩诺沙星鸡源大肠杆菌耐药性的影响,为寻找大肠杆菌有效的多重耐药抑制剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品及药液配制

恩诺沙星。由浙江新昌制药有限公司提供,批号:20021103,纯度>98%。盐酸维拉帕米。由天津中央药业有限公司提供,批号:20020301,纯度>99%。无菌操作配制成1.28 mg/mL的标准储备液,4℃冰箱保存备用。

1.2 培养基

Muller-hinton培养基,杭州天和微生物试剂有限公司生产,批号20020524。

1.3 试验菌种

77株耐恩诺沙星和17株非耐恩诺沙星大肠杆菌分离自河北某肉鸡公司发病鸡群,并经K-B法筛选;标准菌O2、O78购自中国兽医监测检验所。

1.4 最小抑菌质量浓度(MIC)的测定

采用试管两倍稀释法^[9],分别测定恩诺沙星、维拉帕米单独对94株临床筛选大肠杆菌和标准菌株O2、O78的最小抑菌质量浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC),细菌接种量约为 10^5 cfu/mL,试验时每种药物质量浓度作3个平行。

1.5 联合药敏试验

采用棋盘试管法^[9],恩诺沙星药物最高浓度为被检菌株MIC的2倍,对倍稀释到其MIC的1/16。维拉帕米最高质量浓度64 μg/mL,对倍稀释到4 μg/mL。每株菌重复3次棋盘试验。以部分抑菌质量浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)作为联合药敏试验的判断依据。FICI=甲药联用MIC值/甲药单独使用MIC值+乙药联用MIC值/乙药单独使用MIC值(FICI=0.5时为协同作用;0.5<FICI<1为相加作用;1<FICI<2为无关作用;FICI>2为拮抗作用)。

2 结果与分析

2.1 恩诺沙星和维拉帕米单独使用对试验菌株MIC的测定

恩诺沙星单独对耐恩诺沙星 *E. coli* 的 MIC 在

8~1 024 μg/mL 之间,平均为 190.76 μg/mL;恩诺沙星单独对敏感菌的 MIC 在 0.015 6~0.007 8 μg/mL 之间,平均为 0.037 4 μg/mL,可见耐药菌的 MIC 是敏感菌的 5 100.5 倍;维拉帕米单独对耐药和敏感大肠杆菌的 MIC 都大于 640 μg/mL(表 1)。

2.2 恩诺沙星和维拉帕米联合药敏试验结果

96 株 *E. coli* 包括 2 株标准菌株(O2、O78)对恩诺沙星和维拉帕米联合药敏试验结果表明,30 株表现为无关作用,占被检菌株的 31.3%;20 株表现为协同作用,占被检菌株的 20.8%;46 株表现为相加作用,占被检菌株的 47.9%;拮抗作用的为 0(表 1)。

3 结论与讨论

1) 维拉帕米(VP)本身无抗菌活性。VP作用是协同抗菌药物,阻止细菌对抗菌药物的外排作用,增加药物在菌体内的集聚,因此其本身无抗菌活性。本试验中VP单独对94株临床筛选耐恩诺沙星和敏感大肠杆菌以及2株标准菌O2和O78的MIC值都>640 μg/mL,与EN联合药敏试验时,未加EN抗菌药物的各质量浓度的VP肉汤培养液中细菌生长良好,说明VP本身对大肠杆菌没有抑菌作用或其抑菌作用很弱,这与文献[10]报道一致。

2) 体外VP对耐药性大肠杆菌具有一定的增敏作用。大肠杆菌产生多重耐药的基本原因之一,就是细菌能把药物有效地排出细胞外,使细菌体内药物蓄积质量浓度低于有效范围。该外排作用是由细胞膜上NorA、AcrAB或其他蛋白在能量支持下完成的。VP可阻断细菌膜蛋白NorA、AcrAB等介导的对喹诺酮类药物的主动外排系统而增加药物的敏感性^[11]。本试验中77株耐药性大肠杆菌的肉汤培养物中加入VP后,有66株*E. coli*的MIC减少2~4倍,表明VP对对大肠杆菌的耐药性具有一定的逆转作用,但耐药性不能完全消失。其机制是否和肿瘤细胞一样通过竞争抑制能量依赖的主动外排系统而增敏,尚需深入研究。有11株耐药大肠杆菌,EN与VP合用后表现无关作用,表明该菌株的耐药性可能由gyrA等单个或多个基因的突变所造成,与外排泵蛋白关系不大。耐药性大肠杆菌对EN的MIC不随VP在肉汤中浓度的增大而减小,提示VP对恩诺沙星耐药性*E. coli*的增敏作用没有剂量依赖性。

表 1 恩诺沙星和维拉帕米联合药敏试验结果

Table 1 MIC of enrofloxacin and the effect of combinations with verapamil against *E. coli*

菌株来源	菌株数	(恩诺沙星)/ (μg/ mL)		(维拉帕米)/ (μg/ mL)		部分抑菌 浓度指数	相关 作用	占被检菌 百分率/ %
		单用 MIC	联合 MIC	单用 MIC	联合 MIC			
临床敏感菌	4	0.015 6	0.015 6	> 640	> 64	> 1~2	无关	
	6	0.031 3	0.031 3	> 640	> 64	> 1~2	无关	
	7	0.062 5	0.062 5	> 640	> 64	> 1~2	无关	
标准菌 O2/ O78	1	0.015 6	0.015 6	> 640	> 64	> 1~2	无关	
	1	0.007 8	0.007 8	> 640	> 64	> 1~2	无关	31.3 %
临床耐药菌	7	8	8	> 640	> 64	> 1~2	无关	
	3	32	32	> 640	> 64	> 1~2	无关	
	1	64	64	> 640	> 64	> 1~2	无关	
	13	8	4	> 640	16	< 0.525	相加	
	12	16	8	> 640	16	< 0.525	相加	
	7	32	16	> 640	16	< 0.525	相加	47.9 %
	8	64	32	> 640	16	< 0.525	相加	
	6	128	64	> 640	16	< 0.525	相加	
	1	128	8	> 640	16	< 0.088	协同	
	5	256	32	> 640	16	< 0.150	协同	20.8 %
6	512	64	> 640	16	< 0.150	协同		
8	1 024	256	> 640	16	< 0.275	协同		

3) VP 对非耐药性大肠杆菌无增敏作用。标准菌株 O2 和 O78 以及临床分离非耐 EN 大肠杆菌, VP 与 EN 合用后菌株对 EN 的 MIC 无变化, 表明 VP 对非耐药 *E. coli* 没有增敏抗菌药物的作用。提示大肠杆菌对 EN 的主动外排泵不是 *E. coli* 所固有的, 正常情况下 *norA*、*acrAb* 等基因或其相关基因没有过量表达或弱表达, 当长时间受到环境中的作用底物诱导时, 泵系统的基因被激活, 表达增加, 细菌外排药物的功能显著增强而发生耐药^[12], 是否如此还需采用分子生物学方法进一步研究证实。

朱雯等^[12]报道 20 μg/ mL 的 VP 没有使临床分离的 86 株铜绿假单胞菌对氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星和诺氟沙星的耐药性降低; 潘炜华等^[10]报道, VP 在体外 25 μg/ mL 时, 30 株耐药性淋球菌对阿米卡星、哌拉西林、红霉素、链霉素和四环素均有不同程度的增敏作用; 本试验中 VP 大于 16 μg/ mL 时, 66 株临床分离的耐恩诺沙星性大肠杆菌对恩诺沙星的耐药性都有不同程度的降低。因此, 维拉帕米

逆转多重耐药的表型与本身的质量浓度、抗菌药物的种类及耐药菌的耐药机制三者有关, 影响或完全改变其中任一因素都会不同程度地影响逆转效果。

参 考 文 献

- [1] Moellering, Jr B C. The place of quinolones in ever day clinical practice[J]. *Chemotherapy*, 1996, 42: 54~61
- [2] 杨汉春, 陈声, 吴清明, 等. 鸡源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的多重耐药性[J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(4): 398~404
- [3] 陈鲜花, 李跃龙, 张健, 等. 广东鸡致病性大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的敏感性分析[J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(11): 10~12
- [4] Tsuruo T, Tida H, Tsukagoshi S, et al. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drugresistance P3 83 tumour cells following incubation with calcium antagonist and calmodulin inhibitors [J]. *Cancer Res*, 1982, 42: 4730
- [5] Keisuke Y, Takashi T. Reversal mechanism of mutidrug

- resistance by verapamil: direct binding of verapamil to p-Glycoprotein on specific site and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cell [J]. *Cancer Res*, 1989, 49(15):5002
- [6] Cunic G N, Motohashi L, Amaral S, et al. Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 14: 239-242
- [7] Calvert C M, Sanders D. Inositol trisphosphate and independent Ca^{2+} mobilization pathways at the vacuolar membrane of *Candida albicans* [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:7777-7780
- [8] Martin S K, Oduola A M J, Milhous W K. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil [J]. *Science*, 1987, 235:899-901
- [9] 戴自英. 临床抗菌药理学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1985
- [10] 潘炜华, 廖万清, 李志刚. 维拉帕米、利舍平在淋球菌多重耐药性中的逆转作用 [J]. *第二军医大学学报*, 1999, 20(2):87-89
- [11] Nikaido H. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(20):5853-5859
- [12] 朱雯, 贾文祥, 马巨辉, 等. 铜绿假单胞菌临床分离株对喹诺酮类药物的耐药性研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2001, 26(1):54-57

科研简讯

我校“国家动物海绵状脑病实验室”建设项目通过验收

2006年10月29日,“中国农业大学国家动物海绵状脑病实验室”建设项目通过了以中国药品生物制品检定所贺争鸣研究员为组长的专家组的检查和验收。

该实验室由生物安全三级实验室(BSL-3实验室)、动物生物安全三级实验室(ABSL-3实验室)和基础实验室组成,总面积960平方米,购置仪器设备93台套,是农业部指定的国家动物传染性海绵状脑病检测实验室,承担我国北方地区疯牛病的检测任务和羊痒病的流行病学调查研究任务。通过该项目的实施,建立了动物传染性海绵状脑病检测技术平台,申请并承担了19项国家级、部级研究课题,开展了动物传染性海绵状脑病和牛结核病的致病机理和诊断方法的研究,克隆并表达了多种动物朊蛋白和牛结核分枝杆菌蛋白,初步建立了多种诊断试剂盒,为科研成果的转化奠定了基础。

该项目的建设与运行,极大地促进了学科建设和人才培养。已培养硕士、博士研究生54名,在国内、外期刊上发表论文60余篇,其中SCI收录论文19篇。编译著作4部,获省部级奖1项,“牛朊病毒抗体及其制备方法”荣获国家专利。该实验室曾多次接待美国、英国等国家的动物海绵状脑病实验室及国际动物卫生组织的有关专家,积极开展对外交流与合作,促进了我国动物海绵状脑病检测技术和研究水平的提高。

(科学技术处供稿)

征稿启事

中国农业大学学报2005年影响因子为0.672(据《中国期刊引证报告(扩展版)》(中国科技信息研究所·万方数据股份有限公司));在教育部2006年“首届中国高校精品·优秀·特色科技期刊评比活动”中获得“精品期刊”称号。

本刊实行开放办刊,向校内外广大农业科技工作者诚征涉及农业相关学科的科研论文,欢迎投稿。

有关投稿事项请参考本刊网页(设在本校校园网的“学术刊物”中,或者进入<http://xuebao.cau.edu.cn>);本刊业已随纸刊同期全文上网,欢迎浏览。

本刊编辑部

2006-12