

不同暴露方式下利奈唑胺联合磷霉素 对金黄色葡萄球菌抗菌效应研究

张贵军¹, 黄宏¹, 沈陈林¹, 刘艳艳², 谢娜¹, 江丽芳¹, 李家斌², 黄晓晖¹

摘要 目的 体外以金黄色葡萄球菌为受试菌,研究利奈唑胺联合磷霉素在不同暴露顺序、间隔下对抗菌后效应(PAE)和24 h 杀菌的影响。方法 测定利奈唑胺和磷霉素单独或同时暴露于金黄色葡萄球菌1 h的PAE。分别在利奈唑胺诱导PAE的起始期(T_b)、中间期(T_m)和结束期(T_e)给予磷霉素暴露1 h测定PAE;调整给药顺序,即先暴露磷霉素后利奈唑胺,重复上述操作测定PAE。24 h 杀菌实验分3种暴露方式,即同时暴露、先暴露利奈唑胺1 h后联合磷霉素以及先暴露磷霉素1 h后联合利奈唑胺绘制杀菌曲线。结果 相较于单药PAE[利奈唑胺(1.2 ± 0.1)h,磷霉素(1.6 ± 0.1)h],两药同时暴露PAE为(2.9 ± 0.1)h,二者联合为

相加效应。利奈唑胺PAE相下,磷霉素的PAE明显减小甚至消失(T_b时-0.3h、T_m时0h、T_e时0.9h),提示产生了拮抗作用,并且越是在利奈唑胺PAE早期拮抗作用越明显;磷霉素PAE相下,利奈唑胺的PAE均无明显变化(T_b时1.2h、T_m时1.4h、T_e时1.3h),二者仍然表现为非时间依赖型的相加效应。24 h 杀菌实验中,给药4 h出现抗菌效应的分化,持续到24 h,先暴露磷霉素的抗菌效应明显强于(相差1 log₁₀)先暴露利奈唑胺和同时暴露方式,而后二者的抗菌效应相似。结论 利奈唑胺联合磷霉素对金黄色葡萄球菌的药效学行为受到药物暴露方式的影响,先暴露磷霉素的方式而不是同时暴露可能是更优的给药方案。因此,暴露方式可能是该抗菌联合在临床实践中不可忽视的重要因素之一。

关键词 暴露方式;利奈唑胺;磷霉素;金黄色葡萄球菌;抗菌联合

中图分类号 R 969.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1393-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.010

2021-12-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173133)

作者单位:¹安徽医科大学药学院基础与临床药理学研究室,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院感染病科,合肥 230022

作者简介:张贵军,男,硕士研究生;

黄晓晖,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:math2088@163.com

抗菌药物联合体外研究中绝大部分在实验设计时通常是以药物同时暴露于受试菌的方式进

Whole-brain transcriptome analysis of wool sterol synthase heterozygous knockout mice

Li Yanling, Li Yuhao, Sun Xiaomei, Zhang Jun, Zhang Sumei, Zhang Shengquan

(Dept of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract Objective To investigate the molecular changes of lanosterol synthase (LSS) gene dysfunction and cholesterol levels that may affect brain function. **Methods** The differentially expressed genes in LSS knockout (+/-) mice and WT C57BL/6 mice were analyzed by RNA-SEQ, and the signal pathways involved in the differentially expressed genes were analyzed by KEGG enrichment. The differential genes were detected by real-time quantitative PCR and the protein expression of differential genes was detected by Western blot. **Results** By RNA-SEQ analysis, LSS (+/-) heterozygous knockout resulted in the difference of 320 genes in the mouse brain, including 145 up-regulated genes and 175 down-regulated genes. KEGG enrichment analysis showed that these differentially expressed genes involved in neural-activated receptor and ligand pathways, hippocampal signaling pathways and glutamate synaptic pathways. Real-time quantitative PCR showed that CCKBR and Htr5b were up-regulated, respectively. Western blot results showed that CCKBR gene was highly expressed in the total protein of all brain tissues of LSS knockout (+/-) mice. **Conclusion** LSS heterozygous knockout may affect brain function and animal behavior.

Key words lanosterol synthase; gene knockout mice; RNA-Seq; enrichment analysis

行^[1-2]。而这并不一定与临床实践中的情况完全相符,如由于药物半衰期不同进而给药的频次不同^[3];或因为理化性质的差异并不能混合给药,如将氨基糖苷类和 β -内酰胺类混合给药时,会导致彼此丧失抗菌效应。故有些抗菌药物联合时会采用序贯给药方式。

利奈唑胺(linezolid, LZD)联合磷霉素(fosfomicin, FOS)对金黄色葡萄球菌在体内和体外均具有良好的抗菌效应^[4-5]。但是,蛋白合成抑制剂联合细胞壁合成杀菌药尚存在一定的不确定性^[6];且现有文献关于LZD联合FOS的研究均采用的是同时给药方式,尚未有研究二者在序贯给药下的药效学关系。因此,该研究重点探讨两药在不同暴露顺序、间隔下对抗菌后效应(post-antibiotic effect, PAE)和杀菌效应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 受试菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29213,由安徽细菌耐药监测中心提供。

1.2 药物与试剂 LZD购自美国Selleck Chemicals公司,FOS购自中国食品药品检定研究院。MH琼脂(mueller-hinton agar, MHA)购自英国Oxoid公司,MH肉汤(mueller-hinton broth, MHB)购自青岛高科园海博生物技术有限公司,6-磷酸葡萄糖购自北京索来宝科技有限公司。FOS的实验均添加6-磷酸葡萄糖(终浓度为25 mg/L),药物均配成合适浓度的应用液分装并储存在-20℃冰箱中备用(有效期2个月)。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液制备 从接种待测菌的培养皿上取2~3个大小相似的待测菌落于3 ml无菌肉汤中,37℃震荡培养箱中过夜培养后,取20 μ l细菌培养液于2 ml无菌肉汤中继续在37℃震荡培养箱中培养2~3 h,使细菌进入对数生长期。然后调整细菌浓度为 $(1\sim 2)\times 10^8$ CFU/ml,再以无菌肉汤稀释10倍得到细菌应用液(1×10^7 CFU/ml)。

1.3.2 最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定 参照美国临床与实验室标准委员会推荐的琼脂稀释法测定^[7]。所有实验均重复3次。

1.3.3 PAE测定 取上述细菌应用液0.5 ml加入含4 ml MHB的试管中(T管),再加入0.5 ml LZD或FOS应用液,此时试管中药物终浓度分别为4 mg/L和2 mg/L。最终细菌浓度在 1.5×10^6 CFU/

ml左右。另设未接触药物的空白对照组(C管),加0.5 ml浓度为 1×10^7 CFU/ml菌液和4.5 ml的MHB。混合均匀后均置于37℃恒温培养箱中同步震荡孵育1 h。

所有实验均重复3次。首先测定LZD与FOS单药及联合暴露1 h的PAE;再测定两药在不同的给药顺序及间隔下的PAE值。具体如下:将受试菌首先暴露于LZD 1 h,然后在其PAE起始期($T_b=0$ h,洗去LZD后立即加入FOS),中间期($T_m=0.5$ h,洗去LZD后间隔0.5 h)和结束期($T_e=2$ h,洗去LZD后间隔2 h)分别给予FOS暴露1 h后测定PAE。改变给药顺序和间隔,即先暴露FOS,在其PAE的起始期($T_b=0$ h),中间期($T_m=1$ h)和结束期($T_e=2$ h)分别给予LZD暴露1 h后测定PAE。本实验采用洗涤离心法除去药物,即在每个孵育终点时,用适量MHB冲洗培养物,以3 000 r/min离心5 min去除药物,连续洗涤3次,再用MHB稀释成所需体积。

于0、1、2、4、6、8、10 h分别采样0.1 ml,用无菌生理盐水进行10倍系列稀释后,取适当稀释度菌液涂布于空白琼脂板,倒置于37℃恒温培养箱中孵育18~24 h后进行菌落计数。PAE的计算根据标准公式:PAE = T - C,其中T为稀释后实验管中细菌增加1 log₁₀所需时间,C为稀释后对照管中细菌增加1 log₁₀所需时间。PAE运用于联合抗菌效应研判时,是指联合PAE比两药单药PAE之和更长、相似或更短时,则两药判断为协同、相加或拮抗作用。在间隔给药中,在PAE中间期和结束期,为防止对照组细菌过度生成,需分别进行10倍和100倍稀释处理。

序贯给药实验中,后暴露药物的净PAE值是从实际测得的PAE值减去先暴露药物的残留PAE。此外,先暴露药物和后暴露药物之间存在一个暴露时间差(T_b 、 T_m 和 T_e)。而残留PAE是通过在第一项实验中得到的单药PAE减去暴露时间差计算得出。以LZD的PAE中间期(T_m)暴露FOS为例,LZD的残留PAE等于单药LZD的PAE减去 T_m ,则FOS的净PAE等于实际测得的PAE减去LZD的残留PAE。

1.3.4 24 h杀菌实验 取上述细菌应用液和药液分别加入实验管中,最终细菌浓度在 1×10^6 CFU/ml左右,药物浓度均为 $2\times$ MIC。分3种暴露方案:①同时暴露;②先暴露LZD 1 h后再暴露FOS;③先暴露FOS 1 h后再暴露LZD。同步设空白对照

组,于0、2、4、8、10、24 h 分别取样 50 μ l,用无菌生理盐水进行 10 倍系列稀释后,取适当稀释度菌液涂布于空白琼脂板,倒置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 24 h 后进行菌落计数,绘制杀菌曲线。所有实验均重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 23.0 版统计软件进行数据分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较 4、8、10、24 h 细菌生长的变化,再进行 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIC LZD 和 FOS 对 ATCC29213 的 MIC 分别为 2 mg/L 和 1 mg/L。

2.2 PAE LZD 暴露 1 h 的 PAE 为(1.2 \pm 0.1)h, FOS 暴露 1 h 的 PAE 为(1.6 \pm 0.1)h,同时暴露 1 h 的 PAE 为(2.9 \pm 0.1)h,两药联合呈相加效应。3 种暴露方式下的细菌生长曲线见图 1。

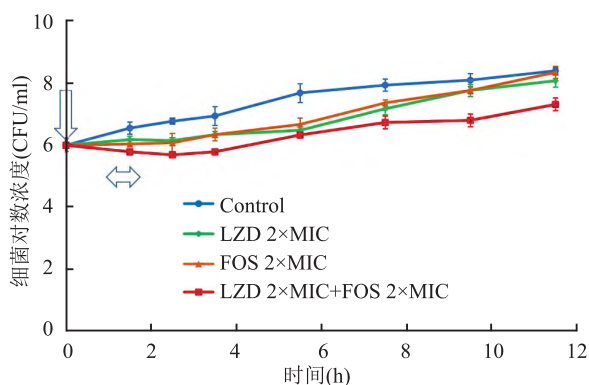


图1 ATCC29213 暴露于 LZD 和 FOS 单药及联合 1 h 的 PAE 细菌生长曲线

药物的暴露及去除时间分别用垂直和水平箭头表示

序贯给药实验中,先暴露 LZD 后,分别在其 PAE 的 Tb、Tm 和 Te 暴露 FOS,实测 PAE 值分别为(0.9 \pm 0.1)、(0.7 \pm 0.3)和(0.9 \pm 0.1)h;对应 LZD 的 PAE 残留值分别为 1.2、0.7 和 0 h,则 FOS 的净 PAE 平均值分别为 -0.3、0 和 0.9 h。3 种暴露条件下的细菌生长曲线见图 2。

当先暴露 FOS 时,在其 PAE 的 Tb、Tm 和 Te 暴露 LZD 后,分别测得 PAE 值为(2.8 \pm 0.1)、(2.0 \pm 0.2)和(1.3 \pm 0.1)h;对应 FOS 的 PAE 残留值分别为 1.6、0.6 和 0 h,则 LZD 的净 PAE 平均值分别为 1.2、1.4 和 1.3 h。3 种暴露条件下的细菌生长曲线见图 3。

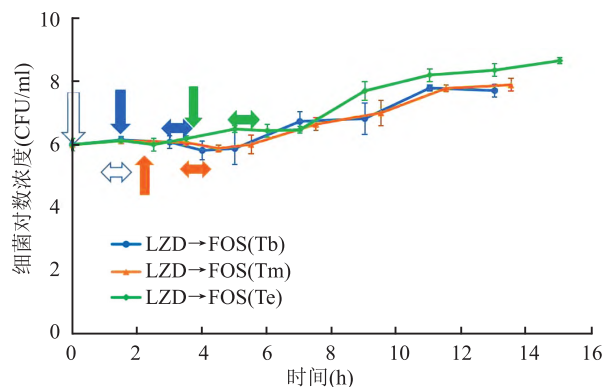


图2 ATCC29213 暴露于 LZD 1 h 后,分别在其 PAE 的 Tb、Tm 和 Te 给予 FOS 暴露 1 h 细菌生长曲线

药物的暴露和去除分别用相应颜色的垂直和水平箭头表示,第 1 次 LZD 暴露和去除箭头没有阴影,3 种情况下 FOS 的暴露和去除分别用相对应颜色的垂直和水平箭头表示

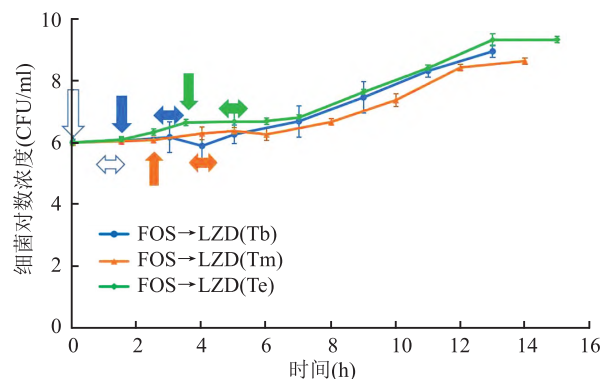


图3 ATCC29213 暴露于 FOS 1 h 后,分别在其 PAE 的 Tb、Tm 和 Te 给予 LZD 暴露 1 h 细菌生长曲线

药物的暴露和去除分别用相应颜色的垂直和水平箭头表示,第 1 次 FOS 暴露和去除箭头没有阴影,3 种情况下 LZD 的暴露和去除分别用相对应颜色的垂直和水平箭头表示

2.3 24 h 杀菌实验效果分析 先暴露 LZD 和同时暴露时,给药 10 h 时二者细菌减少的程度几乎一致,持续 24 h 后差异无统计学意义($P = 0.198$)。而相较于先暴露 FOS,给药 4 h 后,细菌下降的程度即出现了明显分化,即先暴露 FOS 后细菌减少明显强于先暴露 LZD ($P = 0.002$) 和同时暴露 ($P = 0.012$),且持续至 24 h 的差异更为明显,相差 1 log₁₀ 左右。统计分析结果显示给药方式不同,24 h 杀菌效果差异有统计学意义($F = 13.325$, $P = 0.006$),见图 4。

3 讨论

PAE 作为一种时间药效学参数,在单药中进行了广泛而深入的研究,但其在抗菌联合中的相关研究文献较少。据 Li et al^[8] 研究发现 PAE 反映的抗菌联合药效学关系取决于药物的暴露模式、顺序

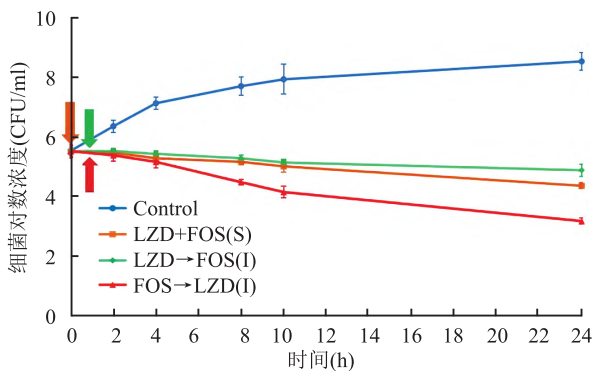


图4 LZD联合FOS三种暴露方式下对金黄色葡萄球菌ATCC29213的杀菌曲线

三种暴露药物方式的时间分别用相应颜色的垂直箭头表示;S:同时暴露;I:间隔暴露

和间隔。这表明暴露方式对某些抗菌联合的药效学行为起着不可忽视的作用;如在利福平或红霉素的PAE相内, β -内酰胺和氨基糖苷类对大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的杀菌活性明显降低,且与PAE的持续时间相关^[9]。

本研究序贯给药下,在LZD的PAE相内给予FOS暴露,其几乎没有产生PAE,这表明受试菌在受到LZD的作用后,对FOS的敏感性降低,前者对后者产生了拮抗作用;并且这种拮抗越是在LZD的PAE早期越明显。有学者提出蛋白质合成抑制剂产生的停滞作用可能会抑制需在细胞分裂期发挥作用来阻断细胞壁合成的抗菌药物的活性^[10-12]。LZD是一种恶唑烷酮类蛋白合成抑制剂,其首先接触受试菌后,对受试菌的繁殖行为产生了停滞作用,导致受试菌处于细胞分裂静止期;而破坏细胞壁合成的杀菌剂FOS发挥杀菌作用需要受试菌处于细胞分裂繁殖期时达到最佳^[13]。这可能导致FOS与受试菌的结合能力下降,使得进入菌体内的FOS量减少,而PAE的持续时间是细胞内有效抗菌药物残存的量度^[14]。这表明先暴露LZD的给药方式在二者联合时可能不是一种可取的选择。

据体外和临床研究报道,先暴露FOS的给药方式可以显著提高联合药物的抗菌效应^[15-16]。而在本研究的24h杀菌实验中,先暴露FOS给药方式比同时暴露和先暴露LZD产生更早更强的抗菌作用;而同时暴露方式在联合抗菌时间更长的情况下并未体现杀菌优势。推测产生这种差异的原因可能是由于FOS具有独特的阻断细胞壁合成的抗菌机制^[17-18];当首先接触受试菌后,在早期抑制肽聚糖的合成,破坏了细菌的外部结构,并最终阻断细菌细

胞壁的合成,这使得LZD更容易进入菌体内发挥抗菌作用,进而两药联合产生了增强的抗菌效应。

综上所述,本研究的结果支持LZD联合FOS的药效学行为与药物的暴露方式密切相关。同时暴露可能并未发挥最佳抗菌效应,而先暴露FOS的方式可能是更优的给药方案。进一步的研究包括耐药菌、体内实验以及临床研究等来探讨序贯给药对联合药动学和药效学的影响可能是需要的。

参考文献

- [1] Beitdaghar M, Ahmadrajabi R, Karmostaji A, et al. *In vitro* activity of linezolid alone and combined with other antibiotics against clinical enterococcal isolates [J]. *Wien Med Wochenschr*, 2019, 169 (9/10): 215-21.
- [2] Barber K E, Werth B J, Mc Roberts J P, et al. A novel approach utilizing biofilm time-kill curves to assess the bactericidal activity of ceftaroline combinations against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58 (5): 2989-92.
- [3] Miró J M, Entenza J M, Del Río A, et al. High-dose daptomycin plus fosfomicin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56 (8): 4511-5.
- [4] Chen H, Li L, Liu Y Y, et al. *In vitro* activity and post-antibiotic effects of linezolid in combination with fosfomicin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. *Infect Drug Resist*, 2018, 11: 2107-15.
- [5] Li L, Chen H, Liu Y Y, et al. Synergistic effect of linezolid with fosfomicin against *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in an experimental *Galleria mellonella* model [J]. *Microbiol Immunol Infect*, 2020, 53 (5): 731-8.
- [6] Usery J B, Vo N H, Finch C K, et al. Evaluation of the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia [J]. *Am J Med Sci*, 2015, 349 (1): 36-41.
- [7] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. 29th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [8] Li R C, Tang M C. Post-antibiotic effect induced by an antibiotic combination influence of mode, sequence and interval of exposure [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54 (5): 904-8.
- [9] Gudmundsson S, Vogelman B, Craig W A. Decreased bactericidal activity during the period of the post-antibiotic effect [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1994, 34 (6): 921-30.
- [10] Luther M K, La Plante K L. Observed antagonistic effect of linezolid on daptomycin or vancomycin activity against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (12): 7790-4.
- [11] Singh S R, Bacon A E, Young D C, et al. *In vitro* 24-hour time-kill studies of vancomycin and linezolid in combination versus methicil-

- lin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(10):4495-7.
- [12] Livermore D M. Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(Suppl 2):ii9-16.
- [13] Munchhof W J, Giles C, Turnidge J D. Post-antibiotic growth suppression of linezolid against Gram-positive bacteria [J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 47(6):879-83.
- [14] Mac Kenzie F M, Gould I M. The post-antibiotic effect [J]. J Antimicrob Chemother, 1993, 32(4):519-37.
- [15] Monden K, Ando E, Iida M, et al. Role of fosfomicin in a synergistic combination with ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm [J]. J Infect Chemother, 2002, 8(3):218-26.
- [16] Otsuka M, Sawahata T, Nakai T, et al. Efficacy of combination therapy against MRSA in Ibaraki Prefecture [J]. Jpn J Antibiot, 1994, 47(6):781-9.
- [17] Skarzynski T, Mistry A, Wonacott A, et al. Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomicin [J]. Structure 1996, 4(12):1465-74.
- [18] Cai Y, Fan Y, Wang R, et al. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomicin on *Pseudomonas aeruginosa in vitro* and biofilm infections in a rat model [J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(3):563-6.

Effect of different exposure regimens of linezolid and fosfomicin against *Staphylococcus aureus*

Zhang Guijun¹, Huang Hong¹, Shen Chenlin¹, Liu Yanyan², Xie Na¹, Jiang Lifang¹, Li Jiabin², Huang Xiaohui¹
(¹Dept of Basic and Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;
²Dept of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective The purpose of this study was to investigate the effect of different exposure sequence and interval on the post-antibiotic effect (PAE) and 24-hour time-kill produced by linezolid and fosfomicin in combination against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). **Methods** PAEs were evaluated by exposing *S. aureus* to linezolid and fosfomicin individually and simultaneously for 1 h. Further assess of PAEs with the organism exposed first to linezolid for 1 h, followed by a second 1 h fosfomicin exposure at the beginning (Tb), middle (Tm) and end (Te) of the PAE phase induced by linezolid. The next study was similar to the above, but with the sequence of the two antibiotics reversed, i. e. fosfomicin then linezolid. The 24-hour time-kill studies were performed with three exposure regimens: simultaneous exposure of the two antibiotics; first exposure to linezolid for 1 h and then combined with fosfomicin, and first exposure to fosfomicin for 1 h and then combined with linezolid to draw the sterilized curve. **Results** Compared with the PAE of individual antibiotics [linezolid (1.2 ± 0.1) h, fosfomicin (1.6 ± 0.1) h], the PAE produced by simultaneous exposure of the combination (2.9 ± 0.1) h presented additive interaction. However, the PAE of fosfomicin decreased or even disappeared (-0.3 h for Tb, 0 h for Tm and 0.9 h for Te) during the PAE phase of linezolid, and with a stronger antagonism at the beginning. Differently, an additive interaction was observed again when the test organism was exposed to fosfomicin first. In the 24-hour time-kill assays, the antibacterial effect of the first exposure to fosfomicin regimens was significantly stronger (difference of 1 log₁₀) than that of the simultaneous exposure and the first exposure to linezolid, while the latter two were similar. **Conclusion** The pharmacodynamic behaviour of linezolid combined with fosfomicin against *S. aureus* was influenced by exposure regimen. The first exposure to fosfomicin regimens rather than simultaneous exposure may exert the optimal antibacterial activity. Therefore, the exposure regimen is one of the important factors to be considered for the clinical application of this combination.

Key words exposure regimen; linezolid; fosfomicin; *Staphylococcus aureus*; combination