

测定法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(5): 764-766.

[3] 贾璋林, 杨发达, 谢煜楠, 等. 溶血液标本制备后的放置时间对 G6PD 酶活性测定的影响[J]. 医学检验与临床, 2007, 18(03): 69-70.

[4] 贾璋林, 杨发达, 谭桂彩, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性浓度检测法的初步研究[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(2): 65-67.

[5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 南京: 东南大学出版社, 2006: 175-177.

[6] 黎卓华, 李鄂, 王希平, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶三种测定方法的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(7): 663.

[7] 陈运生, 蒋玮莹, 李长钢, 等. G6PD 比值法检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变女性杂合子影响因素的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(5): 385-390.

(收稿日期: 2010-07-22)

• 检验技术与方法 •

胞内代谢指纹分析在推断新化合物抗菌作用机制中的应用评价

施锦杰, 范列英, 马红霞

(同济大学附属上海市东方医院检验科, 上海 200120)

摘要:目的 探讨利用胞内代谢指纹分析推断化合物抗菌作用机制的应用价值。方法 4 种胍类化合物和 13 种常用抗生素作用于金黄色葡萄球菌的培养物, 利用气相色谱-质谱对不同刺激下菌体细胞内代谢物进行全面检测即代谢指纹分析, 通过聚类分析推断菌体代谢指纹相似性及化合物可能的作用机制。结果 合成的 4 种化合物与常用的抗生素相比较, 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRSCoN)具有显著的抗菌活性, 其相应的 MIC 值在 0.125~8.000 $\mu\text{g/mL}$ 之间; 气相色谱-质谱对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 在不同化合物存在条件下的代谢指纹分析, 结果显示 4 种化合物具有相似的作用机制($P>0.05$); 4 种化合物与克林霉素关系最近, 它们之间可能具有相似的作用机制。结论 利用气相色谱-质谱代谢指纹分析, 能够相对容易地推断抗菌药物的作用机制。

关键词:气相色谱-质谱法; 胞内代谢指纹分析; 抗菌作用机制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)03-0374-02

细菌耐药性的广泛传播是感染治疗中的 1 个十分棘手的问题^[1]。目前, 新抗生素的开发主要集中在规避已知的耐药机制或者针对新的靶点^[2], 因此确定新药的确切作用机制或靶点在先导化合物筛选和新药研制方面是十分重要的一环。但目前抗生素研发中的瓶颈就是缺乏有效的筛选候选化合物的方法^[3]。随着高通量分析技术的出现, 制药工业也开始发生着变革^[4-6]。本研究中, 利用气相色谱-质谱对 4 种合成的胍类化合物和 13 种常用抗生素刺激下的菌体细胞内代谢物进行全面检测即代谢指纹分析, 通过聚类分析代谢指纹的相似性来推断未知化合物可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 菌种来源 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、2 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)及 1 株耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRSCoN)均由同济大学附属上海市东方医院微生物实验室提供。

1.2 试剂 13 种抗生素来源于商品化产品, 4 种合成的胍类化合物由上海药物所提供^[7]。M-H 肉汤和琼脂购自法国 BioMerieux 公司。乙腈、乙醇、丙酮和甲醇为 TEDIA(Fairfield, OH)产品。含 1% 二甲基叔丁基氯硅烷的 N-(叔丁基二甲基硅烷基)甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA)、吡啶和四氢呋喃购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养与药敏试验^[8] 微量稀释法和纸片扩散法药敏试验按照 CLSI2005 年标准执行。金黄色葡萄球菌在 35 $^{\circ}\text{C}$ M-H 肉汤中培养 24 h, 新鲜培养物稀释到 1.5×10^8 CFU/mL。每种药物分别与 10 mL M-H 肉汤混匀加菌液到细菌浓度为 5×10^5 CFU/mL。35 $^{\circ}\text{C}$ 需氧培养 10 h 以保证代谢变化为抗生素直接影响所造成^[9]。

1.3.2 气相色谱-质谱分析 气相色谱-质谱条件: Shimadzu QP 2010 GC-MS 系统。毛细管柱为 DB5-MS 固定相的石英柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm)。进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 分流比 10:1。35.0 cm/s He 为载气, 采用程序升温, 初始柱温 70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 然后以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 提高到 280 $^{\circ}\text{C}$ 并维持 5 min, 柱平衡时间 3 min, 质谱扫描范围为 m/z 40~ m/z 600, 检测器电压 0.9 kV, 离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$, 接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 溶剂切割时间 6 min。样品处理: 冻干样品溶解于 50 μL 吡啶溶液内混匀 10 min, 加 BSTFA 60 μL 60 $^{\circ}\text{C}$ 衍生 30 min, 取 1 μL 用于气相色谱-质谱分析。

1.4 统计学处理 气相色谱-质谱数据转换成 NetCDF 格式后 XCMS 处理^[10]。对已知作用机制的抗生素每峰做 t 检验, 对未知化合物的作用机制判断采用聚类分析法。

2 结果

2.1 4 种合成的胍类化合物和 13 种常见抗生素的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 见表 1。

表 1 4 种化合物和常见抗生素的 MIC 比较 ($\mu\text{g/mL}$)				
药物	ATCC25923	MRSA-1	MRSA-2	MRSCoN
庆大霉素	0.25	32	32	0.125
阿米卡星	2	128	128	0.125
环丙沙星	0.5	4	8	8
四环素	1	32	16	32
氯霉素	8	8	8	64
青霉素	2	8	8	4
万古霉素	1	2	4	2
红霉素	0.5	16	32	32
苯唑西林	0.25	32	64	8
克林霉素	0.25	8	8	1

续表 1 4 种化合物和常见抗生素的 MIC 比较				
药物	ATCC25923	MRSA-1	MRSA-2	MRSCoN
氨苄西林	1	16	32	16
头孢西丁	2	64	128	64
头孢曲松	4	128	128	256
A12	0.125	8	8	2
B13	1	4	8	2
TG44	8	4	8	8
NE-2001	4	2	2	8

2.2 气相色谱-质谱对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 在不同化合物存在条件下的代谢指纹分析结果 对 13 种常用抗生素和合成的 4 种化合物存在下 ATCC25923 的代谢指纹的两两比较结果显示: TG44、B13 和 NE-2001 与 CLN 之间没有统计学差异。只有碎片离子 m/z 101(保留时间 585 s)在 A12 和 CLN 之间差异有统计学意义($P=0.01$)。按照 P 值的升序排列,该碎片的下 2 个 P 值为 0.06(A12 的 m/z 101)和 0.07(m/z 55 和 m/z 73),这几个离子保留时间相同,通过 NIST 查询(相似性 96%)和标准品鉴定确认,它们都是丙酸的碎片。进一步对所得到的所有数据进行聚类分析表明,所研究的 4 种化合物与克林霉素关系最近,因此它们之间可能具有相似的作用机制,见图 1。

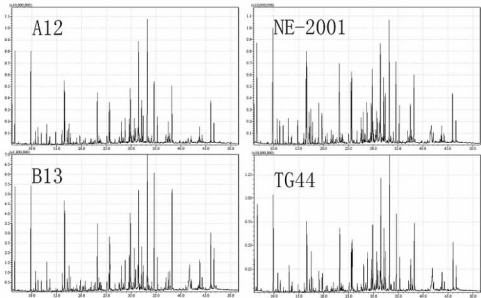


图 1 4 种胍类化合物存在下的金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的典型气相色谱-质谱代谢指纹图

3 讨论

前期研究结果证实,此 4 种化合物对革兰阳性菌的效果要比革兰阴性菌强^[7],因此本研究以金黄色葡萄球菌为对象,对于临床常见的 MRSA 和 MRSCoN,合成的 4 种化合物具有显著的抗菌活性。XCMS 对数据分析的结果显示仅仅 A12 和 TG44 的代谢指纹有些差异($P=0.03$),差异化合物为甘油(大约相差 1.7 倍)。由于本组所用细菌保存在甘油环境中,所以上述差异被认为是偶然误差造成,其余 4 种化合物存在环境下的 ATCC25923 胞内代谢物均无统计学意义差异($P>0.05$),因此认为这 4 种化合物之间具有相似的作用机制,且与克林霉素关系最近。克林霉素为大环内酯类抗生素,MRSA 和 MRSCoN 对其耐药的主要机制是由于 *msrA* 基因编码的流出泵机制或核糖体甲基化造成的对大环内酯类、链阳菌素 B 类和林可酰胺类耐药^[11],上述机制都与 *erm* 基因有关。红霉素是林可酰胺类耐药的最好诱导剂,在 K-B 法中,当红霉素与克林霉素比较接近时,可使林可酰胺类的抑菌环呈现 D 型^[12]。4 种化合物随后都通过该试验验证其是否会同样导致该效应,结果发现并没有 D 环出现。这一结果提示合成的 4 种化合物可能与克林霉素具有不同的结合位点,或者是现有的林可酰胺类耐

药机制并不影响其抗菌活性^[13]。利用气相色谱-质谱代谢指纹分析,未知抗生素的作用机制能够被相对容易地推断出来,与传统的方法相比较具有廉价、快速的优点,虽然 4 种化合物作用的确切靶点仍待进一步的证实,但是作为一种初筛的手段,本研究阐述的方法能够使研究范围缩小到一定程度,便于后续的进一步探索。

参考文献

[1] Olofsson SK, Cars O. Optimizing drug exposure to minimize selection of antibiotic resistance[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(Suppl2): S129-136.

[2] Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(5): 1060-1075.

[3] Schmidt FR. The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 63(4): 335-343.

[4] Freiberg C, Brunner N, Macko L, et al. Discovering antibiotic efficacy biomarkers: toward mechanism-specific high content compound screening[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(12): 2326-2335.

[5] Yu Y, Yi ZB, Liang YZ. Main antimicrobial components of *Tinospora capillipes*, and their mode of action against *Staphylococcus aureus*[J]. FEBS Lett, 2007, 581(22): 4179-4183.

[6] Allen J, Davey HM, Broadhurst D, et al. Discrimination of modes of action of antifungal substances by use of metabolic footprinting[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(10): 6157-6165.

[7] Yu WY, Yang LX, Xie JS, et al. Derivatives of aryl-4-guanidinomethylbenzoate and N-aryl-4-guanidinomethylbenzamide as new antibacterial agents: synthesis and bioactivity[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(2): 267-277.

[8] Tian J, Shi C, Gao P, et al. Phenotype differentiation of three *E. coli* strains by GC-FID and GC-MS based metabolomics[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 871(2): 220-226.

[9] Allen J, Davey HM, Broadhurst D, et al. Discrimination of modes of action of antifungal substances by use of metabolic footprinting[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(10): 6157-6165.

[10] Smith CA, Want EJ, O'Maille G, et al. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification[J]. Anal Chem, 2006, 78(3): 779-787.

[11] Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, et al. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4740-4744.

[12] Weisblum B, Demohn V. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*; survey of antibiotic classes involved[J]. J Bacteriol, 1969, 98(2): 447-452.

[13] Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, et al. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(12): 2823-2830.