

## 呋苄西林对大肠杆菌 K 12 青霉素结合蛋白的亲合力<sup>1</sup>

雷 雨、李家泰 (北京医科大学临床药理研究所, 北京 100034)

*Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Mar; 10 (2) : 177-180

### Affinity of penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 for furbenicillin and other $\beta$ -lactam antibiotics<sup>1</sup>

LEI Yu, LI Jia-Tai

(Institute of Clinical Pharmacology, Beijing Medical University, Beijing 100034)

**Abstract** Penicillin-binding proteins (PBP) are vitally important targets in relation to the killing of bacteria by  $\beta$ -lactams. The affinities of PBP of *Escherichia coli* K 12 for ampicillin, mecillinam and for ureidopenicillins were studied by sodium dodecylsulphate polyacrylamide slab gel electrophoresis and fluorography. The results showed that furbenicillin, a semisynthetic ureidopenicillin developed in China, bound to all 3 essential target proteins of *E. coli*. The  $IC_{50}$  values of furbenicillin to PBP 1b, PBP 2 and PBP 3 were 4.55 mg/L, 0.37 mg/L and 0.06 mg/L, respectively. The affinities of the 3 proteins of *E. coli* for furbenicillin were 2.5-, 3.5-, and 2.5- fold, respectively higher than that of azlocillin. Mecillinam bound exclusively to PBP 2 ( $IC_{50}$ : 0.16 mg/L). Mezlocillin and piperacillin showed higher affinities for PBP 3 than furbenicillin, but their affinities for PBP 1b and PBP 2 were much lower than furbenicillin.

**Key words** lactams; antibiotics; *Escherichia coli*; penicillin-binding proteins; furbenicillin; azlocillin; mezlocillin; piperacillin; mecillinam; ampicillin

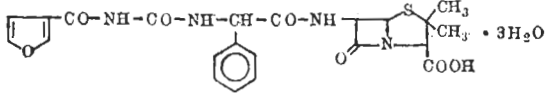
<sup>1</sup>Project supported by National Natural Science Foundation of China, No 3870900

**提要** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 荧光放射自显影技术及竞争性分析法对呋苄西林在大肠杆菌 K 12 进行青霉素结合蛋白亲和力研究, 并与其它  $\beta$ -内酰胺类抗生素进行比较, 探讨呋苄西林强大杀菌作用的分子学基础。结果表明呋苄西林对大肠杆菌几种主要青霉素结合蛋白均有较强亲和作用, 其亲和力超过同类品种阿洛西林。

**关键词** 内酰胺类; 抗生素类; 呋苄西林; 大肠杆菌; 青霉素结合蛋白; 阿洛西林; 美洛西林; 哌拉西林; 氮苄西林; 美西林

青霉素结合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 是位于细菌细胞内膜能特异性地与  $\beta$ -内酰胺类抗生素结合的蛋白质<sup>(1)</sup>。  $\beta$ -内酰胺类抗生素与 PBP 结合, 使细菌细胞壁糖肽合成受阻, 导致细菌溶解死亡<sup>(2,3)</sup>。

酰胺类青霉素以抗菌谱广、抗菌作用强、对绿脓杆菌有特效为特点, 在抗感染化疗中具有重要地位。呋苄西林 (呋苄青霉素, 呋苄西林, furbenicillin) 是我国研究开发并首先上市的酰胺类青霉素<sup>(4,5)</sup>。由于本品并不具有  $\beta$ -内酰胺酶稳定的特点<sup>(6)</sup>, 其强大抗菌作用可能与其对 PBP 的亲合力有关。本文报告呋苄西林对大肠杆菌 K 12 的青霉素结合蛋白的亲合力研究结果, 并与其它  $\beta$ -内酰胺类抗生素进行比较, 旨在分子水平基础上探讨呋苄西林杀菌作用机理。



Furbenicillin

## Materials and methods

呋苄西林(太原制药厂);阿洛西林(苯唑唑青霉素, azlocillin, 西德 Bayer);美洛西林(甲苯唑唑青霉素, mezlocillin, 西德 Bayer);哌拉西林(氧哌嗪青霉素, piperacillin, 上海第三制药厂);氨苄西林(氨苄青霉素, ampicillin, 上海第四制药厂);美西林(氮唑脒青霉素, mecillinam, 美国 Roche 公司);6-苯基[1- $^{14}\text{C}$ ]乙酰胺青霉烷酸钾(potassium 6-phenyl [1- $^{14}\text{C}$ ]acetamidopenicillanate, 简称[ $^{14}\text{C}$ ]青霉素 G 钾, 美国 Amersham 同位素公司)。

超速离心机(MSE Prepsiu 50);超声处理机(Soniprep 50);直立式电泳仪(美国 Bio-Rad);凝胶干燥器(224 型, 美国 Bio-Rad);显微光密度扫描仪(MPM 163, 日本联合光学有限公司)。

国际标准菌株大肠杆菌 K 12 J 62-1 为英国伦敦医院医学院微生物科赠品。

**青霉素结合蛋白亲和力** 采用竞争性分析法(competition assay)<sup>(7)</sup>。将系列稀释的待测抗生素与大肠杆菌细胞膜液作用 10 min 后,与 [ $^{14}\text{C}$ ]青霉素 G 继续作用 10 min 终止反应后经含十二烷基硫酸钠的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离膜蛋白。在经过电泳的凝胶中参入闪烁剂 PPO,

以 X 光片为感光材料进行荧光放射自显影(fluorography)。X 光片上自显影像的黑度反映了抗生素与 PBP 的亲和力,黑度越深,亲和力越弱;反之,亲和力越强。使用光密度扫描仪对影像黑度进行定量分析,以  $\text{IC}_{50}$ , 即抑制 50% [ $^{14}\text{C}$ ]青霉素 G 结合某种 PBP 所需要的待测抗生素浓度,代表抗生素与 PBP 的亲和力。 $\text{IC}_{50}$  值越小,亲和力越大。

**杀菌曲线** 在普通液体培养基中加入大肠杆菌过夜菌原液和待测抗生素,使细菌终浓度为  $10^5$  CFU/ml, 抗生素浓度为 16 mg/L。孵育一定时间后,取样 0.1 ml, 稀释后在不含抗生素的平皿中用 5 点计数法计算活菌数/ml。

## Results

呋苄西林对大肠杆菌 PBP 2 和 PBP 3 有高度亲和力,即在较低浓度时能够结合 PBP 2 和 PBP 3;呋苄西林对大肠杆菌 PBP 1 a 和 PBP 1 b 也有较强的亲和力(见 Fig 1 A, Tab 1)。阿洛西林与呋苄西林同属酰胺类青霉素,两者与 PBP 结合类型相同(见 Fig 1 A, B),但阿洛西林对大肠杆菌 3 种致死性 PBP(PBP 1 b、PBP 2 和 PBP 3)的亲和力不如呋苄西林强。呋苄西林对 PBP 1 b、PBP 2 和 PBP 3 的亲和力分别是阿洛西林的 2.5、3.5 和 2.5 倍。

酰胺类青霉素中美洛西林和哌拉西林对大肠杆菌 PBP 3 有较强的亲和力(见 Fig 1 C, D),但对大肠杆菌 PBP 1 a、PBP 1 b 和 PBP 2 的亲和力均不如呋苄西林。

Tab 1. Affinities of  $\beta$ -lactam antibiotics for the penicillin-binding proteins of *E. coli*.

	$\text{IC}_{50}$ for penicillin binding proteins (mg/L)						
	1 a	1 b	2	3	4	5	6
Fur	1.94	1.81	0.37	0.06	6.42	8.82	6.04
Azl	1.81	11.44	1.30	0.15	>20	>20	>20
Pip	1.67	9.09	5.40	0.024	>20	>20	>20
Mez	5.55	7.34	2.05	0.025	>20	>20	>20
Amp	1.64	4.81	0.53	1.70	>10	>10	>10
Mec	>500	>500	<0.16	>500	>500	>500	>500

Fur: furbenicillin; Azl: azlocillin; Pip: piperacillin; Mez: mezlocillin; Amp: ampicillin; Mec: mecillinam

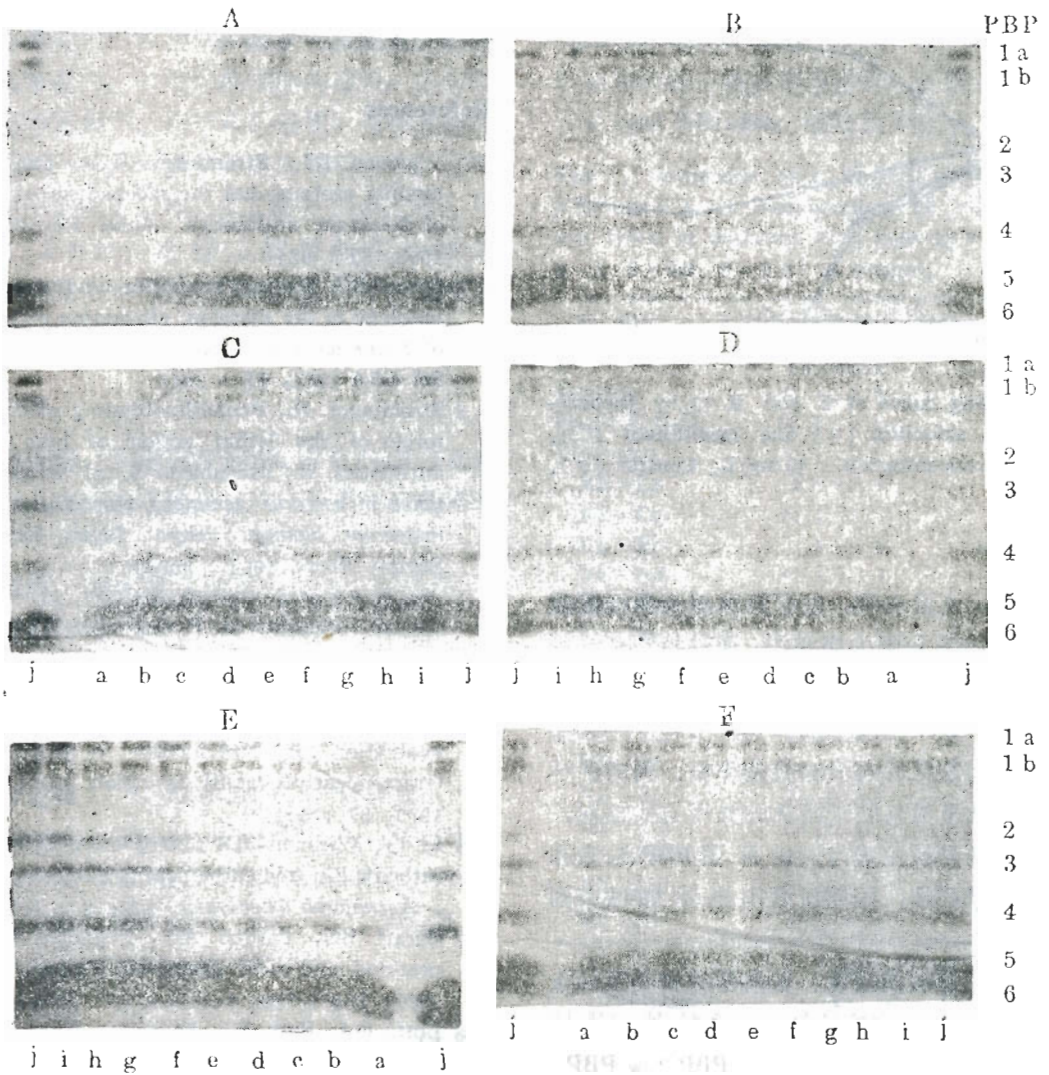


Fig 1. Competition of 6  $\beta$ -lactam antibiotics for *E. coli* K 12. Furbenicillin (A), azlocillin (B), mezlocillin (C) and piperacillin (D) concentrations; 3 times dilution from a (20 mg/L) to i. Ampicillin (E) concentrations; twice dilution from a (10 mg/L) to i. Mecillinam (F) concentrations; 5 times dilution from a (500 mg/L) to i. j. control.

氨苄西林为哌苄西林的母体化合物，与大肠杆菌 K 12 PBP 结合类型与哌苄西林相同（见 Fig 1 E），但氨苄西林对大肠杆菌 K 12 的 PBP 2 和 PBP 3 的亲合力均不如哌苄西林强。

美西林是含脲基的青霉素，对大肠杆菌 PBP 2 有特异性高度亲和力，但对大肠杆菌其它类型 PBP 则无亲和力作用（参见 Fig 1 F，

Tab 1）。

**3 种青霉素对大肠杆菌 K 12 体外抗菌作用** 哌苄西林、阿洛西林和美西林对大肠杆菌 K 12 的杀菌曲线见 Fig 2。结果表明：在 16 mg/L 浓度时，哌苄西林和阿洛西林对大肠杆菌有相同的杀菌作用，在同样浓度下美西林的杀菌作用不明显。

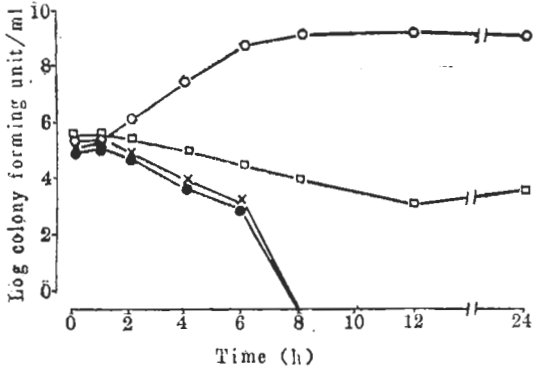


Fig 2. Killing curve of *E. coli* K 12 by furbenicillin (●), azlocillin (×) and mecillinam (□). Antibiotic concentration; 16 mg/L. Control (○).

## Discussion

本实验结果表明：呋苄西林对大肠杆菌致死性 PBP 均有较强的亲和力，通过与所有的致死性靶位蛋白的强有力的结合作用终止细菌生长和繁殖，显示出呋苄西林具有多靶位结合的特点，从而发挥其强大的抗菌作用。阿洛西林和氨苄西林虽然与呋苄西林的作用方式相同，但由于这两种抗生素与大肠杆菌 PBP 的亲和力不及呋苄西林，因而抗菌作用不如呋苄西林。

本文关于哌拉西林、美洛西林和美西林大肠杆菌 PBP 亲和力实验结果与文献结果<sup>(8-10)</sup>一致。这些抗生素对大肠杆菌 PBP 2 或 PBP 3 有较强的亲和能力，但与呋苄西林相比，这 3 种抗生素均不具有多靶位结合的特点。

从杀菌曲线结果可见美西林的杀菌作用不如两种酰胺类青霉素。因为单一抑制一种 PBP，虽然能有效抑菌，却不足以快速杀菌<sup>(9)</sup>，呋苄西林多位点结合大肠杆菌致死性 PBP 的作用特点，不仅是其强大抗菌作用的分子学基础，亦可延缓细菌对该药产生耐药性。因那些只作

用某一靶位蛋白的抗生素细菌较易通过改变靶位蛋白的结构产生耐药<sup>(7)</sup>。

## References

- 1 Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 1983; 52 : 825
- 2 Spratt BG. Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K 12. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72 : 2999
- 3 Strominger JL. Penicillin-binding proteins as target of the lethal action of beta-lactam antibiotics. In: Mitsuhashi S, ed. *Drug resistance in bacteria genetics, biochemistry and molecular biology*. Tokyo: Japan Scientific Society Press, 1982 : 289-95
- 4 北京医学院附属一院抗菌素研究室. 国产半合成青霉素-呋苄西林 (BL-P 1597) 体内外抗菌活性研究. *北京医学院学报* 1974; 7 : 180
- 5 Department of Antibiotics, First Teaching Hospital, Beijing Medical College. Clinical evaluation of furbenicillin in 35 cases of Gram-negative bacilli infection. *Chin Med J* 1979; 92 : 501
- 6 Li JT, Williams JD. Comparative activity of furbenicillin and carbenicillin-like compounds. *J Antimicrob Chemother* 1982; 9 : 171
- 7 Spratt BG, Pardee AB. Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 1975; 254 : 516
- 8 Botta GA, Park JT. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol* 1981; 145 : 333
- 9 Curtis NAC, Orr D, Ross GW, Boulton MG. Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16 : 533
- 10 Spratt BG. The mechanism of action of mecillinam. *J Antimicrob Chemother* 1977; 3 (Suppl B) : 13