

# 革兰氏阴性杆菌中 $\beta$ -内酰胺酶催化水解头孢噻肟动力学

阎淑雅、李家泰 (北京医科大学临床药理研究所, 北京 100034)

**提要** 采用分光光度法研究  $\beta$ -内酰胺酶催化水解头孢噻肟与头孢哌酮的动力学。采用 L-B 作图法求得  $K_m$ ,  $V_{max}$  及  $K_i$ 。结果表明: 头孢噻肟对质粒介导的 TEM-1 和 SHV-1 酶与染色体介导的 P 99 酶稳定,  $V_{max}$  均小于 0.10%。抑酶研究证明头孢噻肟对染色体介导的 P 99 酶具有抑制作用,  $K_i$  值为  $0.036 \mu\text{mol/L}$ 。说明本品对产酶耐药菌产生的  $\beta$ -内酰胺酶高度稳定。

**关键词** 酶动力学; 头孢噻肟; 质粒; 染色体;  $\beta$ -内酰胺酶

头孢噻肟为我国重点研制的第三代头孢菌素。具有广谱、高效、低毒、耐酶等特点, 尤其对革兰氏阴性菌的活性比过去的头孢菌素增强 10 倍至数百倍<sup>(1)</sup>。

目前临床上由染色体介导的酶造成的耐药是一个非常严重的问题, 而且, 现在的天然  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂, 如棒酸和青霉烷砜, 对质粒介导的  $\beta$ -内酰胺酶具有强大的抑制作用, 但对染色体介导的头孢菌素酶几乎没有或只有很弱的抑制作用<sup>(2,3)</sup>。

本文旨在比较头孢噻肟与其他三代头孢菌素的酶动力学结果, 以便对头孢噻肟的耐酶程度及抑酶作用作出评价。

## 材料与 方法

**药品与试剂** 头孢噻肟 (cefotaxime) 四川抗菌素工业研究所, 长征制药厂和东北制药厂联合研制产品。头孢噻啉 (cefaloridine) 英国 Glaxo 公司产品。头孢哌酮 (cefoperazone) 美国 Pfizer 公司产品。头孢三嗪 (ceftriaxone) 瑞士 Hoffmann-La Roche 产品。拉他头孢 (latamoxef) 日本盐野义制药株式会社产品。Nitrocefin  $\beta$ -内酰胺酶特异性鉴定试剂, 英国 Glaxo 研究所赠品。二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide) 北京化工厂出品。

**菌株** 染色体介导的产酶株 P 99,  $K_1$ , 质粒介导的产酶株 TEM-1 和 SHV-1 均由英国 Glaxo 研究所赠送。

**制备  $\beta$ -内酰胺酶提取液<sup>(2,4)</sup>** 过夜肉汤培养液 200 ml,  $5160 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min。弃上

清, 沉淀用 20 ml, pH 7.0, 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液洗 2 遍, 将沉淀悬浮于适量 0.01 mol/L, pH 7.0 磷酸盐缓冲液中, 用英国 MSE 超声处理机在冰浴条件下将菌体破碎. 破碎后菌液离心,  $38\ 600 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 1 h. 上清液即为  $\beta$ -内酰胺酶提取液,  $-70^\circ\text{C}$  保存.

**$\beta$ -内酰胺酶的鉴定** 4 株标准菌产生的  $\beta$ -内酰胺酶 TEM-1, SHV-1, K1 及 P99 均经本室用等电聚焦法鉴定证实<sup>(5)</sup>. 实验前再用显色头孢菌素 nitrocefin 定性检测  $\beta$ -内酰胺酶. 在  $\beta$ -内酰胺酶存在时, nitrocefin 的  $\beta$ -内酰胺环被水解打开, 颜色由浅黄色变为红色<sup>(6)</sup>. 此法简易快速, 而且特异<sup>(7)</sup>.

**$\beta$ -内酰胺酶水解动力学实验** (uv 分光光度法) 实验采用日立 557 型双波长双光束分光光度计, 安装恒温测定槽附件, 并外接超级恒温水浴.

1. 确定各头孢菌素的最佳测定波长 头孢菌素浓度为 0.1 mmol/L, 在加  $\beta$ -内酰胺酶前后分别于 200-340 nm 范围内进行波长扫描, 选取加酶后波长扫描中吸收度下降幅度最大并且稳定的波长确定为各头孢菌素的最佳测定波长<sup>(8)</sup>, 测定波长分别选择为: 头孢噻啉 255 nm; 头孢哌酮 265 nm; 头孢噻肟 257 nm.

2. 酶单位的确定 一个  $\beta$ -内酰胺酶活性单位为在  $37^\circ\text{C}$  及最佳 pH 条件下每分钟水解 1  $\mu\text{mol/L}$  底物所需的酶量, 选用头孢噻啉为底物, 首先确定在波长 255 nm 处 3 ml 头孢噻啉 (0.1 mmol/L) 于  $37^\circ\text{C}$ , pH 7.0 时, 在 15 min 内被酶充分水解的  $\Delta A$  值, 并沿加酶后 1 min 时的水解曲线作切线, 求出每分钟  $\Delta A$  值. 按下式计算酶活性单位:

$$\text{酶单位} = \frac{X}{\text{底物被充分水解的 } \Delta A} \times 0.3 \times v$$

$X = \Delta A / \text{min}$ , 0.3: 头孢噻啉的  $\mu\text{mol}$  数

$v$ : 校正因子, 使加入的酶提取液容量校正至 1 ml.

3. 测定酶水解反应的初速度<sup>(2,9)</sup> 头孢

菌素浓度为 0.1 mmol/L, 在  $37^\circ\text{C}$ , pH 7.0 加入  $\beta$ -内酰胺酶后, 立即在各抗生素最佳波长处进行时间扫描 15 min, 绘制反应-时间曲线 (图 1). 由于  $\beta$ -内酰胺酶的水解作用, 抗生素在最佳波长处的吸收度随时间下降, 选择吸收度下降和反应时间呈线性关系的区段, 作为酶反应的初速度.

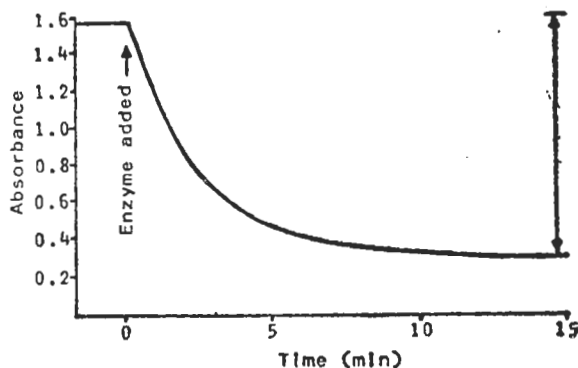


Fig 1. A typical progress curve of the complete hydrolysis of a cephalosporin by  $\beta$ -lactamase

4. 测定米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $V_{max}$ )<sup>(9,10,11)</sup> 采用 Lineweaver-Burk (L-B) 作图法测定  $V_{max}$  和  $K_m$ <sup>(10,12,13)</sup>.

5. 头孢噻肟对酶的抑制作用研究

5.1. 抑酶程度的比较 以定量头孢噻啉作为标准底物, 观察比较不同浓度的 4 种第三代头孢菌素抑制 P99 型酶水解底物的作用<sup>(2,8)</sup>.

5.2. 计算抑制常数  $K_i$ <sup>(14)</sup> 头孢噻啉作为底物, 头孢噻肟作为酶抑制剂. 按 L-B 作图法求出加抑制剂前后的  $K_m$  和  $V_{max}$ . 本实验条件下, 加入抑制剂后,  $K_m$  值增加,  $V_{max}$  减少, 可通过两条直线斜率的比值求出抑制常数 ( $K_i$ )<sup>(12)</sup>.

## 结 果

**头孢噻肟酶动力学** 4 种标准  $\beta$ -内酰胺酶对头孢噻肟和头孢哌酮的水解动力学结果见表 1. 结果表明: 质粒介导的 TEM-1 和 SHV-

1型酶与染色体介导的P99型酶对第三代头孢菌素头孢噻肟没有明显的水解作用,  $V_{max}$  小于0.1%。以上3种酶均能水解第三代头孢菌素头孢哌酮。染色体介导的K1酶对头孢噻肟, 头孢哌酮及头孢噻啉均有不同程度的水解作用。

Tab 1. Kinetic constants of  $\beta$ -lactamases

| Enzyme | Substrate    | $K_m$ (mmol/L) | $V_{max}$ (%) |
|--------|--------------|----------------|---------------|
| TEM-1  | Cefaloridine | 0.180          | 100           |
|        | Cefoperazone | 0.050          | 18.00         |
|        | Cefotaxime   | —              | 0.10          |
| SHV-1  | Cefaloridine | 0.096          | 100           |
|        | Cefoperazone | 0.050          | 48.36         |
|        | Cefotaxime   | —              | 0.10          |
| P 99   | Cefaloridine | 0.422          | 100           |
|        | Cefoperazone | 2.152          | 18.96         |
|        | Cefotaxime   | *0.036         | 0.10          |
| K1     | Cefaloridine | 0.064          | 100           |
|        | Cefoperazone | 0.014          | 2.29          |
|        | Cefotaxime   | 0.295          | 5.56          |

$K_m$  = Michaelis-Menten constant; \* $K_i$  = Inhibitory constant ( $\mu\text{mol/L}$ );  $V_{max}$  = Relative rate of maximal velocity

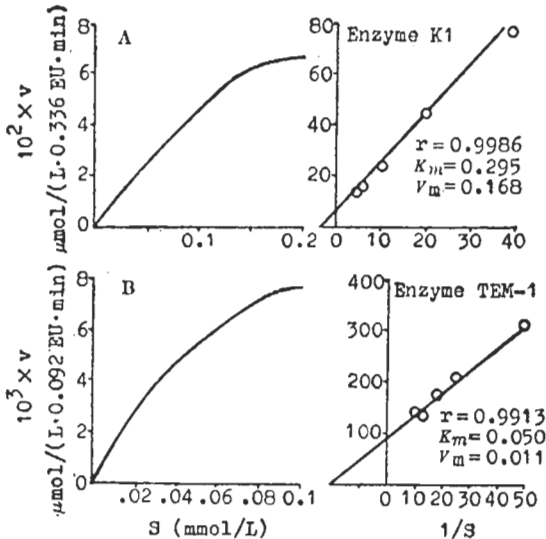


Fig 2. Substrate saturation curve with cefotaxime (A) or cefoperazone (B) and Lineweaver-Burk plot

图2(A)为K1酶水解底物头孢噻肟的底物饱和曲线和相应的L-B plot。从图2(A)看

出: 随着底物浓度增加, 酶被底物饱和, 酶水解反应速度( $v$ )加快。采用L-B作图法, 并通过线性回归分析求出: K1酶水解头孢噻肟的  $K_m = 295 \mu\text{mol/L}$ , 最大反应速度  $V_{max} = 168 \text{ nmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ,  $1/S$  与  $1/v$  的相关系数  $r = 0.9986$ 。

图2(B)为TEM-1酶水解头孢哌酮的底物饱和曲线和相应的L-B plot。采用作图法并通过线性回归分析得到: TEM-1酶水解头孢哌酮的  $K_m = 50 \mu\text{mol/L}$ ,  $V_{max} = 11 \text{ nmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ,  $1/S$  与  $1/v$  的相关系数  $r = 0.9913$ 。

头孢噻肟对 $\beta$ -内酰胺酶的抑制作用 头孢噻肟对P99酶催化水解头孢噻啉具有抑制作用(图3)。结果表明: P99酶对头孢噻啉具有水解作用。加入酶后, 在255 nm处, 头孢噻啉的吸收度明显下降, 吸收度变化值( $\Delta A$ )为0.52。加入抑制剂头孢噻肟  $1 \mu\text{mol/L}$ 后, 再加入P99酶, 在255 nm处, 酶水解头孢噻啉的幅度大大降低,  $\Delta A$ 由原来的0.52降为0.22。

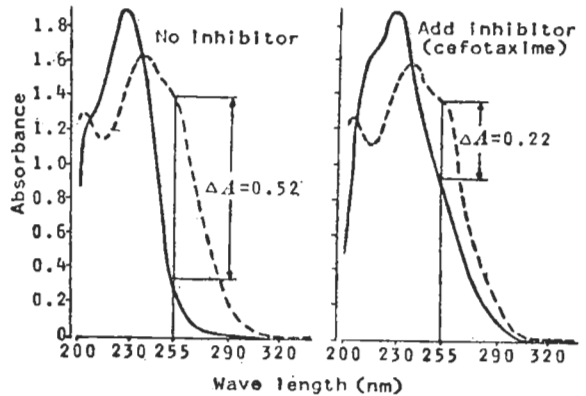


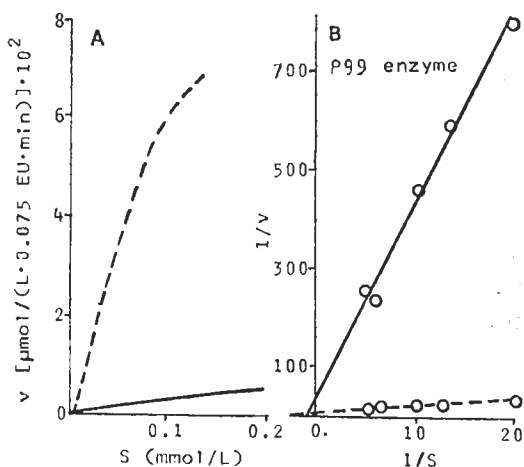
Fig 3. Absorption spectrum of cephaloridine before (---) and after (—) degradation by P99  $\beta$ -lactamase

实验中比较了4种第三代头孢菌素对P99酶的抑制程度(表2)。当抑制剂浓度不同时, 对P99酶水解头孢噻啉的抑制程度不等。抑制剂浓度愈高, 对P99酶的抑制作用愈强, 4种头孢菌素中, 头孢哌酮抑制P99酶水解底物的作用最弱, 其他3种头孢菌素抑酶程度相似。

**Tab 2. Inhibitory activity of cephalosporins to prevent enzyme P 99 from hydrolyzing cefaloridine (0.1 mmol/L)**

| Inhibitor<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | Inhibition of enzyme activity (%) |       |        |        |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------|--------|--------|
|                                    | 0.1                               | 1.0   | 10     | 100    |
| Cefotaxime                         | 79.48                             | 96.67 | 100.00 | 100.00 |
| Cefoperazone                       | 0.00                              | 0.00  | 36.32  | 90.15  |
| Ceftriaxone                        | 80.30                             | 96.92 | 100.00 | 100.00 |
| Latamoxef                          | 65.53                             | 97.23 | 100.00 | 100.00 |

头孢噻肟对 P 99 酶的抑制常数 ( $K_i$ ) 采用 L-B 作图法 (图 4)。P 99 酶水解头孢噻肟的  $K_m = 422 \mu\text{mol/L}$ ,  $V_{max} = 307 \text{ nmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。加入头孢噻肟  $1 \mu\text{mol/L}$  后, P 99 酶水解头孢噻肟的  $K_m$  即  $K_m^{app} = 1254 \mu\text{mol/L}$ ,  $V_{max}$  即  $V_{max}^{app} = 32 \text{ nmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。比较  $K_m$ ,  $V_{max}$  与  $K_m^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ , 可以看出: 加入抑制剂头孢噻肟后,  $K_m$  值增加,  $V_{max}$  减少。  $K_i = 36 \text{ nmol}/\text{L}$ 。



**Fig 4. Substrate saturation curve with cefaloridine and Lineweaver-Burk plot in the presence (—) or absence (---) of cefotaxime**

## 讨 论

一般进行抗生素耐酶能力评价时, 都用相对水解率作为指标。本文实验结果表明: 染色体介导的 K 1 型酶可以水解头孢噻肟和头孢哌酮, 相对水解速度常数分别是 5.37% 和 2.78%, 故将得出头孢哌酮对 K 1 酶的稳定性

优于头孢噻肟。但酶动力学结果表明: K 1 型酶对头孢噻肟的相对水解率仅比头孢哌酮大 1.2 倍, 而 K 1 型酶对头孢哌酮的亲和力则是头孢噻肟的 20 倍。因此, 在细菌体内, K 1 型酶对头孢哌酮的水解力可能要大于头孢噻肟。

头孢噻肟对染色体介导的 P 99 型酶具有相当高的亲和力 ( $K_i = 36 \text{ nmol/L}$ ), 可以在低浓度下抑制酶活性, 但 P 99 型酶对其水解力很弱, 说明头孢噻肟对 P 99 型酶具有强大耐酶作用和抑酶作用。这两点均具有重要临床意义。说明本品可用于产酶耐药菌引起的重症感染, 并可与对酶不稳定的  $\beta$ -内酰胺类抗生素联合应用, 以提高抗耐药菌感染的疗效。

## 参 考 文 献

- 1 阎淑雅、李家泰. 国产头孢噻肟对  $\beta$ -内酰胺酶稳定性研究. *抗生素* 1986; 11: 89
- 2 Li JT, Moosdeen F, Williams JD. The effect of inhibitors of  $\beta$ -lactamases on  $\beta$ -lactamase extracts and on intact cells. *J Antimicrob Chemother* 1982; 9: 287
- 3 Cole M. Inhibition of  $\beta$ -lactamases. In: Hamilton-Miller JMT, Smith JT, eds. *Beta-lactamases*. London: Academic Press, 1979: 205-89
- 4 Seeberg AH, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Chromosomal  $\beta$ -lactamases of *Enterobacter cloacae* are responsible for resistance to third-generation cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23: 918
- 5 Yang YJ, Li JT. A study of antibacterial activity of furbenicillin against  $\beta$ -lactamase producing Gram-negative organisms. *Chin Med J* 1984; 97: 345
- 6 O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 1: 283
- 7 Sykes RB, Matthew M. Detection, assay and immunology of  $\beta$ -lactamases. In: Hamilton-Miller JMT, Smith JT, eds. *Beta-lactamases*. London: Academic Press, 1979: 17-49
- 8 Richmond MH. The  $\beta$ -lactamase stability of a novel  $\beta$ -lactam antibiotic containing a 7  $\alpha$ -methoxyoxacephem nucleus. *J Antimicrob Chemother* 1980; 6: 445

- 9 Allison RD, Purich DL. Practical consideration in the design of initial velocity enzyme rate assays. In: Purich DL, ed. Enzyme kinetics and mechanism. Pt A. Initial rate and inhibitor methods. Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*; vol 63 (pt A). NY: Academic Press, 1979 : 3-22
- 10 Engel PC. *Enzyme kinetics. The steady-state approach*. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1981 : 14-25
- 11 Pechère JC, Guay R, Dubois J, Letarte R. Hydrolysis of cefotaxime by a beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17 : 1001
- 12 陈惠黎、李文杰. 分子酶学. 第1版. 北京 : 人民卫生出版社, 1983 : 177-312
- 13 蔡武城、李碧羽、李玉民. 生物化学实验技术教程. 上海 : 复旦大学出版社, 1982 : 183-209
- 14 Yamaguchi A, Hirata T, Sawai T. Kinetic studies on inactivation of *Citrobacter freundii* cephalosporinase by sulbactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24 : 23

*Acta Pharmacologica Sinica* 1988 Sep; 9 (5) : 448-452

## Enzyme kinetics of cefotaxime hydrolysed by $\beta$ -lactamases extracted from Gram-negative bacilli

YAN Shu-Ya, LI Jia-Tai

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

**ABSTRACT** The enzyme kinetics of cefotaxime and cefoperazone against plasmid- and chromosomal-mediated  $\beta$ -lactamases were studied with double-wavelength and double-beam spectrophotometer.  $\beta$ -Lactamases were extracted from Gram-negative bacilli and identified by isoelectric focusing method with the special reagent nitrocefin. Michaelis constant ( $K_m$ ), maximal velocity ( $V_{m,ax}$ ) and inhibition constant ( $K_i$ ) values were obtained from Lineweaver-Burk plots. The results showed that cefotaxime was more stable than cefaloridine and cefoperaz-

one against the hydrolysis of  $\beta$ -lactamases.  $V_{m,ax}$  of cefotaxime to TEM-1, SHV-1, P99 enzymes were  $<0.10\%$ . Cefotaxime demonstrated a high affinity to chromosomal-mediated P99 enzyme. The  $K_i$  of cefotaxime was  $0.036 \mu\text{mol/L}$ . Cefoperazone exhibited less enzyme inhibitory activity and was unstable to most of the  $\beta$ -lactamases tested.

**KEY WORDS** enzyme kinetics; cefotaxime; plasmids; chromosomes; beta-lactamases