·论著·

乙酰唑胺对万古霉素耐药肠球菌体内外抗菌活性作用和机制*

庞茜茜[1]　刘云宁[1]　张艺[1]　姜爱雯[1]　刘斐[2]　汤建华[1]

(河北北方学院附属第一医院 1. 药学部;2. 危重病医学,河北 张家口 075000)

【摘要】 目的 探讨乙酰唑胺对万古霉素耐药肠球菌(VRE)体内外抗菌活性作用和可能的作用机制。**方法** 实验菌株为医院临床分离的肠球菌菌株,经鉴定为 VRE 菌株,分别进行体外和体内抗菌活性研究。采用琼脂平板稀释法测定乙酰唑胺对 VRE 的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC),杀菌曲线实验测定待测菌株的时间杀菌变化曲线,检测胞外碱性磷酸酶(AKP)含量评估对细胞壁的破坏作用,计算相对电导率测定评估细胞膜渗透性。使用临床分离的 VRE 菌株建立腹膜炎小鼠模型,分为对照组(正常小鼠),模型组(腹膜炎小鼠)和乙酰唑胺组(30 mg/kg/5 h 干预),每组 10 只。干预 30 h 后统计各组小鼠死亡情况,进行腹膜液、脾脏、肝脏菌落计数,HE 染色观察脾脏、肝脏病理改变。**结果** 乙酰唑胺对 VRE 的抑菌活性检测显示,MIC 和 MBC 分别为 1.45 mg/L 和 4.62 mg/L。Time-Kill 曲线分析乙酰唑胺杀菌动力学显示,乙酰唑胺杀菌活性与时间和浓度呈正相关,乙酰唑胺浓度越大,细菌死亡率越高,时间越长,杀死的细菌越多。当乙酰唑胺浓度达到 16×MIC,作用时间达到 12 h 时,VRE 细菌生长被完全抑制。干预 30 h 后,对照组小鼠均存活,存活率 100%;模型组小鼠 7 只陆续死亡,存活率 30%;乙酰唑胺组小鼠 2 只出现死亡,存活率 80%,存活率明显高于模型组($P<0.05$)。相较于对照组,模型组小鼠腹膜液、肝脏、脾脏菌载量均明显提高($P<0.05$);相较于模型组,乙酰唑胺组小鼠腹膜液、肝脏、脾脏菌载量均明显降低($P<0.05$)。与对照组比较,1×MIC 组和 4×MIC 组 AKP 含量显著升高($P<0.05$);与 1×MIC 组比较,4×MIC 组 AKP 含量显著升高($P<0.05$),乙酰唑胺对 VRE 细胞壁的破坏作用呈现剂量依赖。与对照组比较,1×MIC 组和 4×MIC 组电导率显著升高($P<0.05$);与 1×MIC 组比较,4×MIC 组相对电导率显著升高($P<0.05$),乙酰唑胺对 VRE 细胞渗透性的提高作用呈剂量依赖。**结论** 乙酰唑胺对 VRE 具有较好的体内、体外抗菌活性,其作用机制可能与破坏细胞完整性有关。

【关键词】 乙酰唑胺;万古霉素耐药;肠球菌;抗菌活性;作用机制

【中图分类号】 R915;R965　**【文献标志码】** A　**DOI**:10.3969/j.issn.1672-3511.2024.07.006

Study on the antibacterial activity and mechanism of acetazolamide against Enterococcus in vitro and in vivo

PANG Xiqian[1], LIU Yunning[1], ZHANG Yi[1], JIANG Aiwen[1], LIU Fei[2], TANG Jianhua[1]

(1. *Pharmacy Department, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou* 075000, *Hebei, China*;
2. *Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou* 075000, *Hebei, China*)

【Abstract】 Objective To explore the in vitro and in vivo antibacterial activity of acetazolamide against vancomycin resistant enterococci, and investigate its possible mechanism of action. **Methods** The study object was Enterococcus (N1520), which was clinically isolated from the hospital and identified as vancomycin resistant Enterococcus (VRE). The antibacterial activity in vitro and in vivo were studied respectively. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of acetazolamide on VRE using agar plate dilution method. Determination of the Time Sterilization Change Curve of the Strain to be Tested through the Sterilization curve experiment. Detection of extracellular alkaline phosphatase (AKP) content to evaluate the destructive effect on cell walls, cal-

基金项目:张家口市市级科技计划自筹经费项目(2221070D)

通讯作者:汤建华,主任药师,E-mail:qavtari008@126.com

引用本文:庞茜茜,刘云宁,张艺,等.乙酰唑胺对万古霉素耐药肠球菌体内外抗菌活性作用和机制[J].西部医学,2024,36(7):968-973.DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2024.07.006

culation of relative conductivity measurement to evaluate cell membrane permeability. Establishing a mouse model of peritonitis using clinically isolated VRE strains, divided into a control group (normal mice), a model group (peritonitis mice), and an acetazolamide group (30mg/kg/5h intervention). After 30 hours of intervention, the death status of each group of mice was counted, and bacterial colonies in peritoneal fluid, spleen, and liver were counted. HE staining was used to observe pathological changes in the spleen and liver. **Results** The antibacterial activity test of acetazolamide on VRE showed that MIC and MBC were 1.45 mg/L and 4.62 mg/L, respectively. Time Kill curve analysis showed that the bactericidal activity of acetazolamide was positively correlated with time and concentration. The higher the concentration of acetazolamide, the higher the bacterial mortality rate. The longer the time, the more bacteria were killed. When the concentration of acetazolamide reaches 16 × MIC, when the action time reaches 12 hours, the growth of VRE bacteria was completely inhibited. After 30 hours of intervention, the survival rate of the blank control group was 100%, the model group was 30%, and the acetazolamide group was 80%. The survival rate of mice in the acetazolamide group was significantly higher than that in the model group, with a statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the bacterial load in the peritoneal fluid, liver, and spleen of the model group mice was significantly increased, with a statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the model group, the bacterial load in the peritoneal fluid, liver, and spleen of the acetazolamide group mice were significantly reduced, with a statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the control group, the AKP content in the 1×MIC group and 4×MIC group significantly increased ($P<0.05$). Consistent with 1×MIC group comparison, the AKP content in the 4×MIC group significantly increased ($P<0.05$), and the destructive effect of acetazolamide on VRE cell wall showed a dose-dependent manner. Compared with the control group, the conductivity of 1×MIC group and 4×MIC group significantly increased ($P<0.05$). And with 1×MIC group comparison, the relative conductivity of 4×MIC group significantly increased ($P<0.05$), and the increase in VRE cell permeability by acetazolamide showed a dose-dependent effect. **Conclusion** Acetazolamide has good antibacterial activity against Enterococcus in vivo and in vitro, and its mechanism may be related to the destruction of cell integrity.

【Key words】 Acetazolamide; Vancomycin resistance; Enterococcus; Antibacterial activity; Mechanism

肠球菌属细菌属于革兰阳性菌，是人和动物胃肠道常见正常菌群，也是一种重要的条件致病菌[1]。作为一种耐药性和耐强碱性的厌氧菌，肠球菌可以长期在饥饿等不良环境中存活[2]，能引起感染性内膜炎、伤口感染、尿路感染、脑膜炎、菌血症等多种感染性疾病[3-5]，也是引起医院内获得性感染的主要致病菌之一。随着抗生素的广泛及不合理使用，肠球菌对左氧氟沙星、帕拉西林以及阿奇霉素等临床多种常用抗生素都产生了耐药性[6-7]，其所致的医院感染也呈逐年上升趋势[8]，因肠球菌感染死亡的人数也逐年增加[9]。肠球菌感染率的升高和多耐药菌株的出现给临床治疗带来了重大挑战。因此，迫切需要寻找和开发新的抗菌药物。肠球菌具有复杂的耐药特征，其坚厚的细胞壁使其对头孢菌素、氨基糖苷类等多种抗菌药物天然耐药[10]，同时还极易产生获得性耐药，尤其是万古霉素耐药肠球菌（Vancomycin resistant enterococcus，VRE）对抗感染治疗来说是巨大的挑战。VRE 导致的严重感染目前尚无满意的治疗方法，通常是根据药敏试验结果和临床情况选择联合用药[11]。近年来，多种具有较好抗菌活性的药物如利奈唑胺、达托霉素、泰利霉素等被开发出来，但国内上市的仅有利奈唑胺[12-13]。万古霉素作为多种难治感染的首选药物，尤其对革兰阳性菌具有良好的抗菌效果。VRE 自首次在英国报道以来，已经在多个国家爆发。我国虽然 VRE 分离率较低，也近年来部分医院流行爆发的趋势较为明显[14]。VRE 严重威胁患者生命安全，其实验室检测及医院感染防控具有重大意义。本研究通过 Time-Kill 曲线研究乙酰唑胺对 VRE 的体外抗菌活性，利用 VRE 菌株建立腹膜炎小鼠模型研究乙酰唑胺对 VRE 的体内抗菌活性，旨在研究乙酰唑胺对 VRE 抗菌活性和机制，为新型抗菌药物研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株 本次研究所使用的实验菌株来自医院临床分离的肠球菌菌株，编号 N1520，来自血液标本。培养过夜后，全部通过 30%甘油将其冻存于−20 ℃冰箱中。质控菌株由 ATCC 提供（ATCC15336）。

1.2 实验动物 不含病原菌清洁型（SPF 级）C57BL/6 小鼠 30 只，周龄 6～8 周，体重在 20～25 g，由河北医科大学提供，许可证号：SCXK（冀）2020-001。实验开始前于 SPF 级饲养房隔离 1 周，环境和用具均经消毒灭菌处理。每笼饲养不超过 10 只，自由饮水和进食。所有实验内容和操作均获得医院动物实验伦理审查委员会的批准（批准号：20230012）。

1.3　主要药品、试剂和仪器　乙酰唑胺粉末(美国 SIGMA 公司);万古霉素标准品(中国药品生物制品检定所);MH 琼脂培养基、BHI 琼脂培养基(英国 OXOID 公司);DDSJ-319L 电导率仪(上海仪电科学仪器股份有限公司);VITEK-2 Compact 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司);KH20R 高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);DHP-9272 细菌电热恒温震荡培养箱(常州金坛良友仪器有限公司);KH01-DEN-1 细菌比浊仪(北京海富达科技有限公司)。

1.4　实验方法

1.4.1　体外抗菌活性检测

1.4.1.1　菌悬液配制　待测菌株从冻存液中取出后放置于超净工作台,灭菌后接种于无菌 MH 琼脂培养平板,待干燥后置于 37 ℃恒温箱中孵育 24 h。次日将新鲜生长的单个菌落转移至 5 mL 玻璃试管(含无菌 MH 肉汤培养基),在电热恒温震荡培养箱中过夜。次日经 100 倍稀释后加入 20 μL 过夜菌到玻璃试管中培养 5 h。采用比浊仪矫正菌液浓度,使其达到 1.5×10^8 CFU/mL 左右(0.5 麦氏浓度),备用。

1.4.1.2　VRE 菌株鉴定　采用万古霉素琼脂筛选法确定待测菌株是否为 VRE 菌株。将待测菌株和质控菌株调成 0.5 麦氏浓度,使用无菌棉签棒接种脑心浸出液琼脂(BHIA)平板上,直径 10～15 cm,37 ℃恒温孵育 24 h。透射光下查看平板上是否出现细菌生长。万古霉素耐药:平板上出现 1 个以上的菌落生长。

1.4.1.3　最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定　96 孔板上进行抗微生物药敏试验。取对数生长周期待测菌,稀释到 2×10^5 CFU/mL。取 50 μL菌悬液加入 96 孔板,乙酰唑胺储备液分别稀释成 256、128、64、32、16、8、4 μg/mL 加入到 96 孔板中,37 ℃孵育 24 h。不含药物的培养基和稀释菌液共培养作为阳性对照孔,只含稀释用培养基作为阴性对照孔。24 h 后观察实验结果,以透射光下无肉眼可见细菌生长的孔的最小药物浓度为该药物的 MIC 值[15]。无菌条件下,吸取 50 μL 96 孔板中没有细菌生长孔中的菌液到 MH 琼脂培养平板,之后在 37 ℃静置培养 24 h,无菌落生长所对应的最低药物浓度视为 MBC 值。

1.4.1.4　杀菌曲线实验　取对数生长周期待测菌(1.5×10^8 CFU/mL),根据 1.4.1.3 中 MIC 检测结果分别加入浓度为 1、4、8 和 16 倍 MIC 的乙酰唑胺,分别在培养 30 min,1、2、4、8 及 12 h 时取培养物离心(3 500 r/min)15 min,稀释到适当浓度后取稀释液涂在空白 MH 琼脂板上,37 ℃培养过夜后对平板上菌落进行计数。悬菌液和无菌 MH 肉汤培养作为对照。所有试验均重复操作 3 遍取平均数。以时间点为横坐标,菌落数为纵坐标绘制杀菌曲线。杀菌效果定义:24 h 后以初始接种量相比,细菌数减少超过 3 log10 CFU/mL[16]。

1.4.1.5　胞外碱性磷酸酶(AKP)含量评估对细胞壁的破坏作用　3 份菌悬液分别加入 1×MIC、4×MIC 的乙酰唑胺和等量混合表面活性剂,37 ℃,220 rpm 震荡培养,3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液,用于 AKP 测定,步骤按照试剂盒说明书,每组均重复测量 3 次。

1.4.1.6　相对电导率测定评估细胞膜渗透性　5%葡萄糖溶液洗涤并重悬离心得到的菌体,直到其电导率与葡萄糖溶液基本一致,作为等渗透液。沸水处理 5 min 后的电导率记作 L0,5%葡萄糖溶液、1×MIC 和 4×MIC 乙酰唑胺混合后的溶液电导率记作 L1。将 1×MIC、4×MIC 乙酰唑胺分别加入等渗透液,37 ℃培养 6 h,每小时均取样测定电导率记作 L2。相对电导率=(L2−L1)/L0×100%[17]。

1.4.2　体内抗菌活性检测

1.4.2.1　建立腹膜炎模型[18]　将 1.4.1 菌悬液(0.5 麦氏浓度)转移至 50 mL 离心管离心,无菌生理盐水洗涤菌落沉淀物 3 次,加入事先配制好的 25 mL 无菌生理盐水溶液(含 5%生物粘液素),混匀后菌液浓度达到 10^9 CFU/mL,获得接种菌悬液。采用酒精擦拭小鼠腹部皮肤,无菌注射器腹腔注射接种 0.5 mL 接种菌悬液。接种后观察小鼠活动变化,并于 2 h 后随机抽取 5 只小鼠麻醉,腹腔注射 2 mL 生理盐水并按摩腹部 1 min,颈椎脱臼处死后打开腹部抽取腹膜液,涂抹在 MHA 平板上进行细菌计数。肝脏和脾脏分离后进行菌落计数并进行病理切片检查,采用全自动微生物分析仪鉴定 MHA 平板上的细菌。综合证实了腹膜炎模型的成功建立。

1.4.2.2　动物分组和干预　取 10 只正常小鼠不做任何处理作为空白对照组,10 只腹膜炎模型小鼠给予乙酰唑胺 30 mg/kg/5 h 干预(参考人体给药剂量和现有药代动力学分析)作为乙酰唑胺组,10 只腹膜炎模型小鼠给予等量生理盐水作为模型组。模型组和乙酰唑胺组均在造模成功后 2 h 经皮下给药干预,干预周期为 30 h,小鼠死亡则停止干预。

1.4.2.3　观察并记录生存情况　从给药干预开始到干预周期结束,观察并记录描述症状、体重、生命状态,计算存活率。

1.4.2.4　不同组织细菌数量测定　干预 30 h 后腹膜内注射 2 mL 生理盐水,按摩腹部并进行腹膜洗涤。

颈椎脱臼处死小鼠，打开腹部后抽取腹膜液，摘取脾脏和肝脏，置于 1 mL 生理盐水（冰）中匀浆，10 倍稀释。将稀释样品和未稀释样品置于 MHA 平板，37 ℃孵育 24 h 后测量细菌数量。

1.4.2.5　病理变化　小鼠处死后从肝脏和脾脏切下厚度不超过 0.5 cm 的组织，采用 4%多聚甲醛固定，使组织保持原本的形态和结构。完成固定后修剪组织放入包埋盒并使用脱水剂脱水，石蜡包埋，切片机切成薄块（5～8 μm），贴纸载玻片后放入恒温箱烘干。常规 HE 染色后在显微镜下观察肝脏和脾脏病理变化。

1.5　统计学分析　采用 SPSS 24.0 软件进行分析，计量资料以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较数据符合正态分布且方差齐则采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　VRE 菌株鉴定结果　24 h 后，待测菌和质控菌均在 BHIA 平板上生长，均出现 1 个以上的菌落，成片分布，证实临床分离的待测菌为 VRE。

2.2　MIC 和 MBC 测定结果　乙酰唑胺对 VRE 的抑菌活性检测显示，MIC 和 MBC 分别为 1.45 mg/L 和 4.62 mg/L，说明乙酰唑胺对 VRE 具有较好的抗菌活性。同时，只含稀释用培养基的对照孔细菌生长未受到影响，证实乙酰唑胺发挥了抗菌作用。

2.3　杀菌曲线实验结果　利用 Time-Kill 曲线分析乙酰唑胺杀菌动力学，结果显示，乙酰唑胺杀菌活性与时间和浓度呈正相关。乙酰唑胺浓度越大，细菌死亡率越高；时间越长，杀死的细菌越多。当乙酰唑胺浓度达到 16×MIC，作用时间达到 12 h 时，VRE 细菌生长被完全抑制。见图 1。

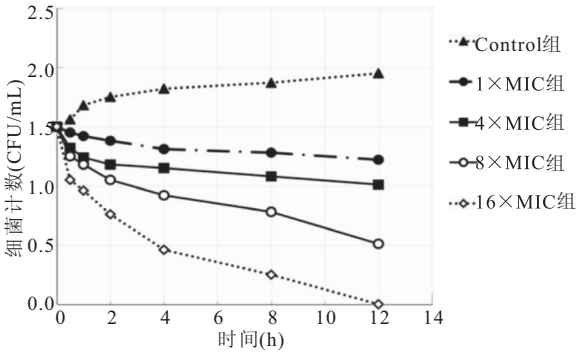

图 1　乙酰唑胺杀菌动力学曲线

Figure 1　Acetazolamide sterilization kinetics curve

2.4　腹膜炎小鼠模型建立结果　腹膜炎模型小鼠接种 VRE 后精神倦怠，闭眼时间增多，活动量大幅度减少，出现寒颤、卷缩不安等症状，12 h 后有小鼠陆续出现死亡。接种 2 h 后解剖显示腹膜液、脾脏、肝脏涂板显示长出成片肠球菌，经鉴定为 VRE 菌株。小鼠脾脏暗红、充血脓肿，脾脏发白、肿大。HE 染色结果显示，模型组小鼠脾脏、肝脏组织渐进性坏死，组织结构消失并出现大量炎性细胞浸润。所有表现均证实腹膜炎小鼠模型成功建立。见图 2。

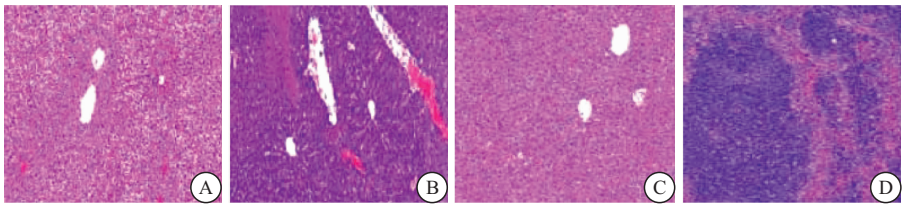

图 2　腹膜炎模型小鼠脾脏、肝脏病理结果（HE 染色，200×）

Figure 2　Pathological results of spleen and liver in peritonitis model mice

注：A. 正常肝组织结构；B. 模型小鼠肝组织结构；C. 正常小鼠脾组织结构；D. 模型小鼠脾组织结构。

2.5　各组小鼠存活率和各部位菌载量比较　干预 30 h后，对照组小鼠均存活，存活率 100%；模型组小鼠 7 只陆续死亡，存活率 30%；乙酰唑胺组小鼠 2 只出现死亡，存活率 80%。乙酰唑胺组小鼠存活率明显高于模型组（$P<0.05$）。相较于对照组，模型组小鼠腹膜液、肝脏、脾脏菌载量均明显提高（$P<0.05$）；相较于模型组，乙酰唑胺组小鼠腹膜液、肝脏、脾脏菌载量均明显降低（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　各组小鼠存活率和各部位菌载量比较［（$\bar{x}\pm s$），$n=10$］

Table 1　Comparison of survival rate and bacterial load in different parts of mice in each group

组别	存活率（%）	菌载量（log10CFU/mL）		
		腹膜液	肝脏	脾脏
对照组	100	4.86±0.84	5.02±0.75	5.15±0.58
模型组	30①	9.20±1.05①	9.12±1.12①	8.87±0.96①
乙酰唑胺组	80②	6.12±0.78②	6.65±0.69②	6.02±0.83②

注：与对照组比较，①$P<0.05$；与模型组比较，②$P<0.05$。

2.6　乙酰唑胺对 VRE 细胞壁的影响　对照组 AKP 浓度始终处于较低水平且无显著变化；与对照组比较，1×MIC 组和 4×MIC 组 AKP 含量显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺对 VRE 细胞壁具有破坏作用；

与 1×MIC 组比较，4×MIC 组 AKP 含量显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺对 VRE 细胞壁的破坏作用呈现剂量依赖。1×MIC 组和 4×MIC 组 AKP 含量在 2 h 以内快速提高而后趋于稳定。见图 3。

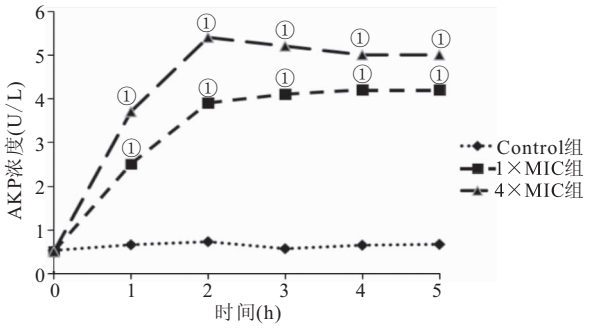

图 3　乙酰唑胺对 VRE 细胞壁的影响

Figure 3　Effect of acetazolamide on VRE cell wall

注：与对照组比较，①$P<0.05$。

2.7　乙酰唑胺对 VRE 细胞渗透性的影响　对照组相对电导率处于较低水平且波动并不明显；与对照组比较，1×MIC 组和 4×MIC 组电导率显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺会提高 VRE 细胞渗透性；与 1×MIC 组比较，4×MIC 组相对电导率显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺对 VRE 细胞渗透性的提高作用呈现剂量依赖。见图 4。

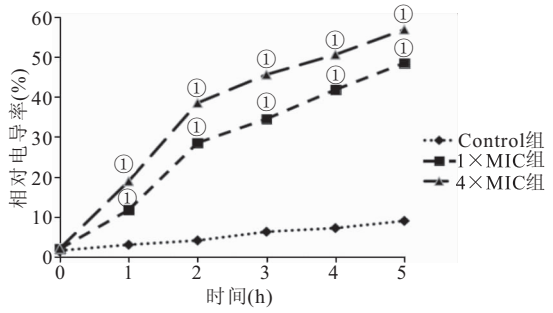

图 4　乙酰唑胺对 VRE 细胞渗透性的影响

Figure 4　Effect of acetazolamide on the permeability of VRE cells

注：与对照组比较，①$P<0.05$。

3　讨论

乙酰唑胺主要用作利尿药、碳酸酐酶抑制剂，也有研究证实其能通过改善血流动力学，降低肺循环阻力升高，从而保护循环功能和心脏功能，对细胞缺氧损伤具有较好的保护作用，还对卵巢癌细胞具有一定的抑制作用[19-20]。在临床实践中发现乙酰唑胺对部分 VRE 所感染患者具有一定的干预效果，但关于乙酰唑胺的抗菌活性作用的研究不多，因次本研究从乙酰唑胺对肠球菌体内外的抗菌活性展开，并探讨其可能的作用机制。

本研究中乙酰唑胺对 VRE 的抑菌活性检测显示，MIC 和 MBC 分别为 1.45 mg/L 和 4.62 mg/L，说明乙酰唑胺对 VRE 具有一定的抗菌活性；为更好确认乙酰唑胺作用，采用杀菌曲线实验进行研究，该实验常被用来评价抗菌药物随时间变化对病原体的动态杀菌过程。Time-Kill 曲线分析乙酰唑胺杀菌动力学显示，乙酰唑胺杀菌活性与时间和浓度呈正相关，乙酰唑胺浓度越大，细菌死亡率越高，时间越长，杀死的细菌越多。当乙酰唑胺浓度达到 16×MIC，作用时间达到 12 h 时，VRE 细菌生长被完全抑制，证明乙酰唑胺对 VRE 具有杀菌效果，可以有效阻止细菌生长。

本研究通过接种 VRE 建立的腹膜炎小鼠模型，受感染的大鼠出现倦怠、萎靡、发抖、活动减少等类似感染的症状，且通过细菌学、病理学等检查综合确认成功建立模型。模型组仅 30%的存活率证实 VRE 菌株的毒力，并进一步证实模型建立成功。研究显示经过乙酰唑胺干预后大鼠存活率相比模型组有显著提高，证实乙酰唑胺能发挥抗菌效果，提高存活率，但是仍发现 2 只大鼠死亡，提示乙酰唑胺单药治疗可能无法满足临床需求。对小鼠腹膜液、肝脏、脾脏菌载量测定发现，乙酰唑胺干预后小鼠各部位菌载量相较模型组明显降低，其中腹膜液菌载量降低超过 3log10 CFU/mL，而这被认为治疗是杀菌的，表明对 VRE 大鼠具有治疗作用。从体外和体内的抗菌活性研究发现，乙酰唑胺均具有一定的抗菌活性，但其治疗作用可能需要进一步的证明。

当细胞壁的完整性遭到破坏时，存在于细菌细胞壁和细胞膜之间的 AKP 才会被检测到[21]。测量 AKP 的含量可以一定程度上反映细胞壁的完整性。本研究中，对照组 AKP 浓度始终处于较低水平且无显著变化；与对照组比较，1×MIC 组和 4×MIC 组 AKP 含量显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺对 VRE 细胞壁具有破坏作用；与 1×MIC 组比较，4×MIC 组 AKP 含量显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺对 VRE 细胞壁的破坏作用呈现剂量依赖。1×MIC 组和 4×MIC 组 AKP 含量在 2 h 以内快速提高而后趋于稳定。细菌细胞内部的电解质渗透到培养液中会导致培养液的电导率发生变化，因此可以通过测定电导率来反应 VRE 细胞膜渗透性的变化[22]。本研究结果显示，对照组相对电导率处于较低水平且波动并不明显；与对照组比较，1×MIC 组和 4×MIC 组电导率显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺会提高 VRE 细胞渗透性；与 1×MIC 组比较，4×MIC 组相对电导率显著升高（$P<0.05$），提示乙酰唑胺对 VRE 细胞渗透性的提高作用呈现剂量依赖。

4 结论

乙酰唑胺对 VRE 具有较好的体内、体外抗菌活性，其作用机制可能与破坏细胞完整性有关。

【参考文献】

[1] 刘云宁，李小凤，姜爱雯，等. 磷霉素对肠球菌体外抗菌活性的实验研究[J]. 药学与临床研究，2020，28(5)：367-369.

[2] 于淑颖，肖盟，杨文航，等. 评估国产利奈唑胺对葡萄球菌和肠球菌体外抗菌活性[J]. 中国感染与化疗杂志，2019，19(4)：400-404.

[3] 白冰，余治健，徐广健，等. 粪肠球菌临床株对泰利唑胺体外抗菌活性的研究[J]. 中国感染控制杂志，2019，18(11)：1009-1013.

[4] 徐双丽. 利奈唑胺联合磷霉素对耐万古霉素肠球菌的体外抗菌活性及小鼠腹膜炎模型的活性研究[D]. 合肥：安徽医科大学，2019.

[5] 张彩虹，张学忠. 儿童肠球菌耐万古霉素表型和耐药基因检测分型的研究[J]. 西部医学，2018，30(5)：711-715，719.

[6] 李肖寒，程雪丹，张智博，等. 绿原酸缀合物 HA-CGA 的抗菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志，2023，48(1)：49-53.

[7] 陈修华，刘丽君，黄朝漫，等. 新型氟喹诺酮类似物的合成及抗菌活性[J]. 合成化学，2021，29(8)：661-666.

[8] 邓丽，李杰，刘保国，等. 牛血红蛋白 β 亚基片段衍生抗菌肽的分子设计及其抗菌活性分析[J]. 中国畜牧兽医，2022，49(9)：3589-3598.

[9] 马玉莹，芦昕，张利娟，等. 基于重水拉曼技术评价次氯酸钠对粪肠球菌抑菌效能的研究[J]. 华西口腔医学杂志，2022，40(1)：86-92.

[10] 郭彬，史晗，封海波，等. 复方双黄连制剂体外抗菌抗病毒活性研究[J]. 中国畜牧兽医，2022，49(12)：4832-4842.

[11] 韩翔鹏，陈清莹，张杏果，等. 粪肠球菌 Z096 对副溶血弧菌生物被膜及群体感应的抑制作用[J]. 食品工业科技，2022，43(19)：167-176.

[12] 许来俊，袁鹤，李继遥. 负载氯己定的可注射水凝胶对粪肠球菌及生物膜的体外抑菌效果[J]. 口腔医学研究，2022，38(1)：45-50.

[13] 汪晓辉，郭溶，聂晓彬，等. 佛手抗菌活性及其药效成分橙皮苷对金黄色葡萄球菌的作用机制研究[J]. 中国抗生素杂志，2021，46(5)：437-441.

[14] 朱娟，余鹏飞，伍勇. 硫氯酚联用庆大霉素对粪肠球临床菌株体外抗菌活性的研究[J]. 中华检验医学杂志，2021，44(2)：121-125.

[15] 李维佳，佟书娟，尚卓，等. 靶向 UPP 合成酶的抗耐药性粪肠球菌药物筛选及其抗菌机制探究[J]. 中国抗生素杂志，2021，46(12)：1102-1108.

[16] 尚德静，赵蕾，王野，等. 含色氨酸系列抗菌肽对多药耐药粪肠球菌的抗菌作用[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版)，2021，44(3)：353-364.

[17] 姜芯，文畅，李清寒. 含嘧啶、苯并噻唑基团的异噁唑衍生物的合成及抗菌活性研究[J]. 化学研究与应用，2020，32(9)：1569-1579.

[18] 张世微，程雁鸿，徐章，等. 黄芪多糖对表皮葡萄球菌感染诱发的腹膜炎大鼠炎症因子的影响[J]. 中国老年学杂志，2022，42(1)：178-181.

[19] 齐彩芬. 利奈唑胺联合磷霉素对万古霉素敏感肠球菌和万古霉素耐药肠球菌的体外和大蜡螟体内药效学研究[D]. 合肥：安徽医科大学，2019.

[20] 庞富华，冯启柱，周异欢，等. 1，2，3-三唑磺胺类化合物的合成及抗菌活性[J]. 精细化工，2019，36(1)：106-110.

[21] 林文，黄凯峰，杨涵，等. 泰地唑胺对革兰阳性球菌的体外抗菌活性研究[J]. 检验医学，2019，34(5)：428-432.

[22] 吴文能，姜阳明，张卜艳，等. 新型 1，2，4-三唑硫醚取代乙酰胺类化合物的合成及抗菌活性[J]. 化学通报(印刷版)，2019，82(12)：1115-1120.

(收稿日期：2023-06-08；修回日期：2024-02-28；编辑：刘灵敏)

(上接第 967 页)

[12] 罗详冲，王周清，李琼艳，等. PD-1 抑制剂替雷利珠单抗治疗晚期恶性肿瘤的药理作用与临床评价[J]. 协和医学杂志，2022，13(4)：679-686.

[13] 胡春兰，周龙，田玲，等. 高良姜素通过巨噬细胞极化及抑制锌指蛋白 Zbed3 诱导大鼠肝癌细胞凋亡的研究[J]. 西部医学，2022，34(7)：973-978，984.

[14] 董婧，邹宏岩，陈静，等. 调控纳米载体和肿瘤相关巨噬细胞用于肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. 中国肿瘤，2021，30(9)：689-694.

[15] 李疆芬，梁伟华，谢玉芳，等. 肿瘤干细胞与肿瘤相关巨噬细胞的交互作用[J]. 现代免疫学，2020，40(4)：325-328.

[16] HE W, HU Y, CHEN D, *et al*. Hepatocellular carcinoma-infiltrating γδ T cells are functionally defected and allogenic Vδ2+γδ T cell can be a promising complement[J]. Clin Transl Med, 2022, 12(4): e800.

[17] 曾林梅，龙金华，金凤. 树突状细胞在肿瘤免疫治疗中的临床应用进展[J]. 医学综述，2020，26(23)：4629-4633，4642.

[18] 王建，任秀宝. 不同亚型树突状细胞之间的作用在肿瘤免疫中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床，2022，49(18)：952-957.

[19] DE AZEVEDO-SANTOS A P S, ROCHA M C B, GUIMARÃES S J A, *et al*. Could increased expression of Hsp27, an "Anti-Inflammatory" chaperone, contribute to the monocyte-derived dendritic cell bias towards tolerance induction in breast cancer patients?[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 8346930.

[20] 蔡晨，徐沈倩，杜婷婷，等. 黄芪通过促进滤泡辅助性 T 细胞活性抑制小鼠肾细胞癌生长[J]. 第二军医大学学报，2021，42(6)：651-656.

[21] ROHR-UDILOVA N, TSUCHIYA K, TIMELTHALER G, *et al*. Morphometric Analysis of Mast Cells in Tumor Predicts Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Liver Transplantation[J]. Hepatol Commun, 2021, 5(11): 1939-1952.

[22] 秦凯，程熠，黄露露，等. 基于 TCGA 数据库探讨宫颈癌免疫细胞浸润模式与临床特征和预后的相关性[J]. 海南医学院学报，2021，27(11)：861-867.

(收稿日期：2023-03-16；修回日期：2024-04-29；编辑：刘灵敏)