

## AmpC 酶抑制剂筛选方法的建立及 136 种中药材活性评价

罗满平<sup>1</sup>, 孟瑛瑛<sup>1</sup>, 李德民<sup>1</sup>, 王康旭<sup>1</sup>, 李媚媛<sup>1</sup>, 张新国<sup>1\*</sup>, 王宗元<sup>2</sup>

1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃省中藏药筛选评价及深加工重点实验室, 甘肃 兰州 730050

2. 兰州市动物疫病预防控制中心, 甘肃 兰州 730050

**摘要:** **目的** 建立一种 AmpC 酶抑制剂的快速筛选方法, 为治疗由耐药菌传播引起的感染提供筛选依据。 **方法** 以阿维巴坦钠为阳性对照, 采用紫外分光光度法检测反应体系的吸光度变化, 通过 6 种不同底物的筛选比较及反应条件的优化, 并对 136 种中药提取物进行筛选评价。 **结果** 最佳体系为波长 489 nm、底物质量浓度 0.1 mg/mL、酶浓度 400 U/mL、温度 30 °C、反应时间 300 s。136 种中药水提取物中有 12 种中药水提取物对 AmpC 酶的抑制率大于 70%, 其中桑寄生、赤芍、红景天、千斤拔、石见穿 5 种中药水提取物的抑制率大于 80%; 添加桑寄生可明显提高青霉素的协同抗菌效应, 最低抑菌浓度 (minimal inhibit concentration, MIC) 由 2 mg/mL 降低至 0.8 mg/mL。 **结论** 建立的 AmpC 酶抑制剂筛选方法快速、高效、可信度高, 中药是抗耐药菌感染治疗的重要资源。

**关键词:** 耐药菌; AmpC 酶; 抑制剂; 筛选方法; 桑寄生; 赤芍; 红景天; 千斤拔; 石见穿

**中图分类号:** R285.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)19-6351-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.016

## Establishment of screening method for AmpC enzyme inhibitors and activity evaluation of 136 Chinese medicinal materials

LUO Man-ping<sup>1</sup>, MENG Ying-ying<sup>1</sup>, LI De-min<sup>1</sup>, WANG Kang-xu<sup>1</sup>, LI Mei-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Xin-guo<sup>1</sup>, WANG Zong-yuan<sup>2</sup>

1. Key Laboratory of Screening and Deep Processing in New Tibetan Medicine of Gansu Province, School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

2. Lanzhou Animal Disease Prevention and Control Center, Lanzhou 730050, China

**Abstract: Objective** To establish a rapid screening method for AmpC enzyme inhibitors to provide a basis for screening drugs in treatment of infections caused by spread of drug-resistant bacteria. **Methods** Avibactam sodium was used as a positive control, and the absorbance changes of reaction system were detected by UV spectrophotometry. Six different substrates were compared for screening, and the reaction conditions were optimized. A total of 136 Chinese medicinal materials extracts were screened and evaluated. **Results** The optimal system was wavelength 489 nm, substrate concentration 0.1 mg/mL, enzyme concentration 400 U/mL, temperature 30 °C, and reaction time 300 s. Among the 136 aqueous extracts of Chinese medicinal materials, 12 extracts showed AmpC enzyme inhibitory activities greater than 70%, and five extracts including *Taxillus chinensis*, *Paeonia veitchii*, *Rhodiola crenulata*, *Flemingia philippinensis* and *Salvia chinensis* had inhibitory activities greater than 80%, and the addition of *T. chinensis* significantly improved the synergistic antibacterial effect of penicillin, minimal inhibit concentration (MIC) was changed from 2 mg/mL to 0.8 mg/mL. **Conclusion** The established screening method for AmpC enzyme inhibitors is rapid, efficient and highly reliable, and traditional Chinese medicines are important resources for the treatment of infections caused by drug-resistant bacterial.

**Key words:** drug resistant bacteria; AmpC enzyme; inhibitors; screening method; *Taxillus chinensis* (DC.) Danser; *Paeonia veitchii* Lynch; *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba; *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolfe; *Salvia chinensis* Benth.

据世界卫生组织的资料显示, 全球每年约有 70 万人死于耐药菌感染<sup>[1-2]</sup>, 由抗生素不合理使用甚至滥用引发的微生物耐药已成为全球性难题。β-内酰胺类抗生素以其良好的抗菌活性和选择性, 至今仍

收稿日期: 2023-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32160021); 甘肃省重点研发计划项目 (21YF5FA084, 22YF7NA176); 温州市科技局项目 (2022Y0883)

作者简介: 罗满平, 男, 硕士研究生, 从事中药材 AmpC 酶抑制活性的筛选评价。Tel: 17393129916 E-mail: 167609623@qq.com

\*通信作者: 张新国, 男, 博士, 教授, 从事中药发酵及微生物新药的发现。Tel: (0931)2976001 E-mail: biodrug@163.com

是临床抗感染的首选药物<sup>[3]</sup>。然而，就像迄今为止在临床环境中使用的任何其他抗菌药物一样，使用后很快都会出现耐药菌株<sup>[4]</sup>，β-内酰胺类抗菌药亦难逃耐药的困扰。研究显示，耐药菌产生的β-内酰胺酶能水解药物的β-内酰胺环，致使药物失活，失去其杀菌效应，是细菌耐药性最重要和临床相关的机制<sup>[5]</sup>。目前已知β-内酰胺酶可根据氨基酸序列分为4个不同的分子类别：A、B、C和D（Ambler分类）<sup>[6]</sup>。AmpC β-内酰胺酶属于 Ambler 分类中的 C 类酶<sup>[7]</sup>，对大多数头孢菌素产生耐药性，能引起青霉素类、头孢菌素类和单环β-内酰胺类的β-内酰胺环水解<sup>[8]</sup>。经典的超广谱β-内酰胺酶抑制剂尤其是克拉维酸对C类酶的抑制作用很差<sup>[9]</sup>。

研究显示，美国住院患者对广谱头孢菌素的耐药率从2009年的5.46%增加到2017年的12.97%<sup>[10]</sup>；另有资料显示国内患者不仅对头孢曲松、哌拉西林、头孢哌酮的耐药率已超过50%，而且对第4代头孢菌素类药物头孢吡肟的耐药率也呈上升趋势（由21.15%上升至40.63%）<sup>[11]</sup>。引发头孢类抗生素耐药的产AmpC酶菌株正在以罕见的速度增加，尤其持续高产AmpC酶和质粒介导的AmpC酶菌株以及产AmpC酶多重耐药细菌的出现和广泛传播<sup>[12-13]</sup>，导致大多数临床β-内酰胺酶抑制剂对AmpC酶均无效，临床对该类细菌感染的治疗愈发困难。

针对临床耐药较为严重的头孢类抗生素耐药问

题，除了加大力度进行新型抗生素的研发，如何使现有的具有优良抗菌活性头孢类抗菌药物继续发挥作用显得尤为重要。进行AmpC酶抑制剂的研究是延长现有头孢类抗生素生命周期的良好举措。目前临床应用最有效的AmpC酶抑制剂主要为阿维巴坦和法硼巴坦，但研究显示随着当前耐药性的发展，对阿维巴坦不敏感临床分离株的报道日渐增多<sup>[14]</sup>，因此进行新型AmpC酶抑制剂筛选和挖掘研究不仅迫切而且意义重大<sup>[15]</sup>。

良好的筛选方法是发现β-内酰胺酶抑制剂类药物的前提。尽管此前已有研究报道了A类β-内酰胺酶抑制剂的快速筛选方法<sup>[16]</sup>，但目前国内关于AmpC类酶抑制剂筛选方法的研究尚未见相关报道。中药不仅是新药发现的良好资源，更在治疗传染病方面具有天然而独特的优势，因此，进一步发展和利用中医药治疗耐药菌引起的临床感染具有重要意义。基于此，本研究建立了一种快速、高效、稳定的AmpC酶抑制剂筛选方法，并通过136种中药水提物的初步活性筛选及协同抗菌活性验证，以期AmpC酶抑制剂的筛选以及为从中药中挖掘耐药提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 药材

136种中药材（表1）购自甘肃省兰州市黄河药材市场，由兰州理工大学杨林副教授鉴定均符合《中国药典》2020年版规定。

表 1 136 种中药材信息

Table 1 Information of 136 Chinese medicinal materials

中药名（编号）	基原	药用部位
千里光（SsWA-1-54）	千里光 <i>Senecio scandens</i> Buch. -Ham.	地上部分
姜半夏（PtWA-3-8）	半夏 <i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breit.	块茎
马蓝（ScWA-2-11）	马蓝 <i>Baphicacanthus cusia</i> (Nees) Bremek.	根
木贼（EhWA-1-42）	木贼 <i>Equisetum hyemale</i> L.	干燥全草
苦丁茶（IlWA-1-57）	大叶冬青 <i>Ilex latifolia</i> Thunb.	叶
天龙（HtWA-1-57）	天龙 <i>Scolopendra subspinipes mutilans</i> L. Koch.	茎叶
龙脷叶（SrWA-3-6）	龙脷叶 <i>Sauropus spatulifolius</i> Beille.	叶
地黄（RgWA-2-27）	地黄 <i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey.	干燥块根
楮实子（BpWA-3-21）	构树 <i>Broussonetia papyrifera</i> (Linn.) L' Hér. ex Vent.	干燥成熟果实
草果（AtWA-2-25）	草果 <i>Amomum tsaoko</i> Crevost et Lemarie	果实
漏芦（SuWA-2-8）	漏芦 <i>Stemmacantha uniflora</i> (L.) Dittrich	根及根状茎
枇杷叶（EjWA-2-16）	枇杷 <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	叶
白薇（CaWB-2-29）	白薇 <i>Cynanchum atratum</i> Bunge	根及部分根茎
使君子（QiWA-1-9）	使君子 <i>Quisqualis indica</i> L.	果实
女贞子（LIWA-2-40）	女贞 <i>Ligustrum lucidum</i> Ait.	成熟果实
肉桂（CcWA-4-30）	肉桂 <i>Cinnamomum cassia</i> Presl	树皮
火炭母（PcWA-3-18）	火炭母 <i>Polygonum chinense</i> L.	根状茎
枳实（CaWA-2-22）	酸橙 <i>Citrus aurantium</i> L.	干燥幼果
马勃（LsWA-2-24）	大马勃 <i>Calvatia gigantea</i> (Batsch ex Pers.) Lloyd.	干燥子实体

续表 1

中药名(编号)	基原	药用部位
金樱子 (RIWA-2-15)	金樱子 <i>Rosa laevigata</i> Michx.	根
青天葵 (NfWA-1-52)	毛唇芋兰 <i>Nervilia fordii</i> (Hance) Schltr.	全草
荆芥 (NcWA-2-20)	荆芥 <i>Nepeta cataria</i> L.	全草
荆芥 (RcWA-3-14)	荆芥 <i>Nepeta cataria</i> L.	根茎
桑白皮 (MaWB-1-1)	桑 <i>Morus alba</i> L.	干燥根皮
瞿麦 (DsWA-2-24)	瞿麦 <i>Dianthus superbus</i> L.	全草
苦楝皮 (MtWA-2-53)	川楝 <i>Melia toosendan</i> Sieb. et Zucc.	干燥树皮和根皮
川木香 (VsWA-2-37)	川木香 <i>Vladimiria souliei</i> (Franch.) Ling.	根
白附子 (TgWA-2-33)	独角莲 <i>Typhonium giganteum</i> Engl.	干燥块茎
重楼 (PpWA-2-55)	云南重楼 <i>Paris polyphylla</i> Smith var. <i>yunnanensis</i> (Franch.) Hand. -Mazz.	干燥根茎
白前 (CgWA-2-29)	柳叶白前 <i>Cynanchum stauntonii</i> (Decne.) Schltr. ex Lévl.	根及根茎
猫爪草 (RtWB-2-38)	猫爪草 <i>Ranunculus ternatus</i> Thunb.	干燥块根
没药 (CmWA-3-6)	地丁树 <i>Commiphora myrrha</i> Engl.	干燥树脂
秦皮 (CmWA-2-47)	白蜡树 <i>Fraxinus chinensis</i> Roxb.	干燥枝皮
绵马贯众 (DcWA-2-6)	粗茎鳞毛蕨 <i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai	干燥根茎
玉簪花 (HpWA-2-9)	玉簪 <i>Hosta plantaginea</i> (Lam.) Aschers.	花
土牛膝 (AbWA-2-5)	土牛膝 <i>Achyranthes bidentata</i> Blume.	根及根茎
天花粉 (LjWA-2-13)	栝楼 <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	干燥根
穿山龙 (DnWA-2-48)	穿龙薯蓣 <i>Discorea nipponica</i> Makino.	根状茎
止叶老 (PtWA-1-3)	止叶老 <i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breit.	块茎
决明子 (CtWA-2-43)	决明子 <i>Cassia tora</i> Linn.	干燥成熟种子
刺五加 (AsWA-2-14)	刺五加 <i>Acanthopanax senticosus</i> (Rupr. Maxim.) Harms	根皮
泽泻 (ApWB-2-35)	泽泻 <i>Alisma plantago-aquatica</i> Linn.	干燥块茎
柏子仁 (PoWA-1-56)	侧柏 <i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco	干燥成熟种仁
忍冬藤 (CIWA-2-4)	忍冬 <i>Lonicera japonica</i> Thunb.	干燥藤茎
冬凌草 (RrWA-2-26)	碎米槿 <i>Rabdosia rubescens</i> (Hemsl.) Hara	干燥地上部分
薯蓣 (DpWA-2-30)	薯蓣 <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	块茎
川断 (DaWA-3-15)	川续断 <i>Dipsacus asperoides</i> C. Y. Cheng et T. M. Ai.	根
藤梨根 (AaWA-2-34)	软枣猕猴桃 <i>Actinidia arguta</i> (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq	干燥根
蒲公英 (TmWA-3-17)	蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i> Hand. -Mazz.	全草
党参 (CpWB-2-10)	党参 <i>Codonopsis pilosula</i> (Franch.) Nannf.	根
山银花 (LhWA-2-18)	灰毡毛忍冬 <i>Lonicera macranthoides</i> Hand. -Mazz.	干燥花蕾
铁皮石斛 (DoWA-1-7)	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i> Kimura et Migo	茎
山楂 (CpWA-2-31)	山楂 <i>Crataegus pinnatifida</i> Bge.	果实
赤小豆 (VuWB-1-13)	赤小豆 <i>Vigna umbellata</i> Ohwi et Ohashi.	干燥成熟种子
红景天 (RrWA-4-16)	大花红景天 <i>Rhodiola crenulata</i> (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba	根
桑叶 (MaWA-3-19)	桑 <i>Morus alba</i> L.	干燥叶
槐花 (SjWA-3-9)	槐 <i>Sophora japonica</i> L.	花蕾
高良姜 (AoWA-1-27)	高良姜 <i>Alpinia officinarum</i> Hance	根茎
辛夷 (YIWA-1-24)	望春花 <i>Magnolia biondii</i> Pamp.	干燥的花蕾
淡竹叶 (LgWB-1-7)	淡竹叶 <i>Lophatherum gracile</i> Brongn.	叶
橘核 (CrWA-4-56)	橘 <i>Citrus reticulata</i> Blanco	干燥成熟种子
石斛 (DnWA-4-59)	金钗石斛 <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	茎
大黄 (RpWA-3-13)	掌叶大黄 <i>Rheum palmatum</i> L.	根及根茎
泽漆 (EhWA-1-19)	泽漆 <i>Euphorbia helioscopia</i> L.	地上部分
猪牙皂 (GsWA-1-46)	皂荚 <i>Gleditsia sinensis</i> Lam.	果实
蛇六谷 (ArWA-4-54)	魔芋 <i>Amorphophallus rivieri</i> Durieu.	干燥块茎
桔梗 (PgWA-3-21)	桔梗 <i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A. DC.	根
仙茅 (CoWA-1-37)	仙茅 <i>Curculigo orchioidea</i> Gaertn.	根茎
仙鹤草 (ApWA-1-30)	龙芽草 <i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	全草
骨碎补 (DmWA-1-2)	槲蕨 <i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Sm.	根状茎
亚麻子 (LuWA-1-33)	亚麻 <i>Linum usitatissimum</i> L.	种子
墨旱莲 (EpWA-2-17)	鳢肠 <i>Eclipta prostrata</i> L.	干燥地上部分
合欢皮 (SaWA-4-59)	合欢 <i>Albizia julibrissin</i> Durazz.	干燥树皮
大血藤 (ScWA-2-13)	大血藤 <i>Sargentodoxa cuneata</i> (Oliv.) Rehd. et Wils.	根及茎
桑寄生 (TsWB-1-4)	桑寄生 <i>Taxillus chinensis</i> (DC.) Danser	干燥带叶茎枝
何首乌 (FmWA-1-50)	何首乌 <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	块根
土茯苓 (SgWA-1-9)	光叶菝葜 <i>Smilax glabra</i> Roxb.	干燥根茎

续表 1

中药名 (编号)	基原	药用部位
乳香 (BcWA-2-28)	乳香树 <i>Boswellia carterii</i> Birdw.	植物的树脂
川牛膝 (CoWA-1-37)	川牛膝 <i>Cyathula officinalis</i> Kuan	干燥根
茯神 (PcWA-3-20)	茯神 <i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	有松根的白色部分
淫羊藿 (EbWA-3-12)	淫羊藿 <i>Epimedium brevicornu</i> Maxim.	叶
夏枯草 (PvWB-2-17)	夏枯草 <i>Prunella vulgaris</i> L.	干燥的果穗
桃仁 (PdWB-1-39)	山桃 <i>Prunus davidiana</i> (Carr.) Franch.	干燥成熟的种子
罗汉果 (SgWB-1-31)	罗汉果 <i>Siraitia grosvenorii</i> (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang	果实
鸭跖草 (CcWA-1-61)	鸭跖草 <i>Commelina communis</i> L.	地上部分
龙胆 (GsWA-2-41)	龙胆 <i>Gentiana scabra</i> Bunge	根、根茎
两头尖 (ArWA-1-18)	多被银莲花 <i>Anemone raddeana</i> Regel.	根茎
沙苑子 (AcWA-1-51)	扁茎黄芪 <i>Astragalus complanatus</i> R. Br.	干燥成熟种子
半枫荷 (ScWA-1-19)	半枫荷 <i>Semiliquidambar cathayensis</i> Hung T. Chang	根
金荞麦 (FdWA-1-25)	金荞麦 <i>Fagopyrum dibotrys</i> (D. Don) Hara	块根
山药 (DpWB-2-15)	薯蓣 <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	块根
莱菔子 (RsWA-1-16)	萝卜 <i>Raphanus sativus</i> L.	成熟种子
海桐皮 (AcWB-1-37)	刺桐 <i>Erythrina variegata</i> Linn.	干皮或根皮
寻骨风 (AmWA-1-30)	绵毛马兜铃 <i>Aristolochia mollissima</i> Hance	全株
络石藤 (TiWA-1-1)	络石 <i>Trachelospermum jasminoides</i> (Lindl.) Lem.	干燥带叶藤茎
蕤仁 (PuWA-1-65)	蕤核 <i>Prinsepia uniflora</i> Batal.	干燥成熟果核
绵萆薢 (DsWA-3-10)	绵萆薢 <i>Dioscorea spongiosa</i> J. Q. Xi. M. Mizuno et W. L. Zhao	干燥块茎
千斤拔 (FpWA-2-7)	千斤拔 <i>Flemingia philippinensis</i> Merr. et Rolfe	根
黄药子 (DbWA-1-69)	黄独 <i>Dioscorea bulbifera</i> L.	根
枳壳 (CaWA-1-65)	酸橙 <i>Citrus aurantium</i> L.	未成熟果实
鬼箭羽 (EaWB-1-22)	卫矛 <i>Euonymus alatus</i> (Thunb.) Sieb.	带翅嫩枝或翅翅
红豆蔻 (AgWA-1-67)	大高良姜 <i>Alpinia galanga</i> Willd.	干燥成熟果实
叶下珠 (PuWB-1-26)	叶下珠 <i>Phyllanthus urinaria</i> L.	全草
山慈菇 (CaWA-1-50)	杜鹃兰 <i>Cremastra appendiculata</i> (D. Don) Makino	假鳞茎
蔓荆子 (FvWA-4-58)	蔓荆 <i>Vitex trifolia</i> L.	干燥成熟果实
石见穿 (ScWA-4-21)	华鼠尾草 <i>Salvia chinensis</i> Benth.	全草
萆薢茄 (LcWA-3-11)	山鸡椒 <i>Litsea cubeba</i> (Lour.) Pers.	干燥成熟果实
瓜蒌 (TkWA-3-22)	栝楼 <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	果实
蒺藜 (TtWA-4-20)	蒺藜 <i>Tribulus terrestris</i> L.	成熟的果实
天南星 (AhWA-4-17)	异叶天南星 <i>Arisaema heterophyllum</i> Blume	干燥块茎
葫芦茶 (TtWA-3-44)	葫芦茶 <i>Tadehagi triquetrum</i> (L.) Ohashi	地上部分
芦根 (PcWA-3-49)	芦苇 <i>Phragmites communis</i> Trin.	根茎
茺蔚子 (LjWA-4-10)	益母草 <i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	干燥成熟果实
枳椇子 (HdWA-4-12)	北枳椇 <i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	成熟种子
冬葵果 (McWA-3-41)	冬葵 <i>Malva verticillata</i> L.	干燥成熟果实
金钱草 (LcWA-4-1)	过路黄 <i>Lysimachia christinae</i> Hance	全草
棕榈炭 (TfWA-4-48)	棕榈 <i>Trachycarpus fortunei</i> (Hook.) H. Wendl.	叶柄及叶鞘纤维
独脚金 (SaWB-4-16)	独脚金 <i>Striga asiatica</i> (L.) O. Kuntze	全草
鬼针草 (BpWA-1-55)	鬼针草 <i>Bidens pilosa</i> L.	全草
车前子 (PaWA-1-45)	车前 <i>Plantago asiatica</i> L.	植物干燥的种子
远志 (PtWA-1-62)	远志 <i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	根
垂盆草 (SsWA-4-45)	垂盆草 <i>Sedum sarmentosum</i> Bunge	干燥全草
通草 (TpWA-1-66)	脱木 <i>Tetrapanax papyrifer</i> (Hook.) K. Koch	干燥茎髓
百部 (SjWA-1-31)	蔓生百部 <i>Stemona japonica</i> (Blume) Miq.	根
牛大力藤 (MsWA-1-2)	牛大力藤 <i>Millettia speciosa</i> Champ.	根
赤芍 (PvWA-1-5)	川赤芍 <i>Paeonia veitchii</i> Lynch	根
威灵仙 (CcWA-4-49)	威灵仙 <i>Clematis chinensis</i> Osbeck	干燥根和根茎
益智仁 (AoWA-1-63)	益智 <i>Alpinia oxyphylla</i> Miq.	果实
锁阳 (CsWA-1-60)	锁阳 <i>Cynomorium songaricum</i> Rupr.	除去花序的肉质茎
草豆蔻 (AkWA-1-59)	草豆蔻 <i>Alpinia katsumadai</i> Hayata	干燥近成熟种子
紫菀 (AtWA-2-19)	紫菀 <i>Aster tataricus</i> L. f.	根及根茎
地锦草 (EhWA-1-53)	地锦 <i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	干燥全草
白屈菜 (CmWA-1-18)	白屈菜 <i>Chelidonium majus</i> L.	全草
卷柏 (StWA-4-41)	卷柏 <i>Selaginella tamariscina</i> (Beauv.) Spring	干燥全草
降香 (DoWA-1-32)	降香檀 <i>Dalbergia odorifera</i> T. Chen	树干和根的干燥心材
法半夏 (PtWA-1-3)	法半夏 <i>Pinellia ternate</i> (Thunb.) Breit.	块茎

## 1.2 菌种

肺炎克雷伯氏菌(ATCC700603)来自实验室保藏菌种。

## 1.3 药品与试剂

头孢菌素酶(批号 F26HS176600)购自上海源叶生物科技有限公司; 头孢硝噻吩(批号 E2104156)购自长沙俄里翁生物科技有限公司; 阿维巴坦钠(批号 G2122030)、碘硝基氯化四氮唑蓝[2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride hydrate, INT, 批号 D2126248]、青霉素(批号 B2104061)、头孢唑啉钠(批号 I2107357)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 头孢呋辛钠(批号 2210612V)、头孢西丁钠(批号 21040231)、头孢曲松钠(批号 21093371)均购自扬子江药业集团有限公司; 盐酸头孢替安(批号 20210306)购自南京海辰药业股份有限公司; 克拉维酸钾(130429-201307)购自中国食品药品鉴定研究院;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、甲醇、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)等常规试剂均为分析纯。

## 1.4 仪器

UV2102PC 型紫外可见分光光度计(上海龙尼柯仪器有限公司); FA2104 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 中药水提物的制备

分别称取 136 种中药材各 100 g, 加入 10 倍量蒸馏水, 水浴回流提取 1 h, 提取 3 次。将滤液趁热滤过, 合并滤液, 减压浓缩后放入 50 °C 烘箱至完全干燥, 得到各药材水提物浸膏。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 PBS 缓冲液** 配制 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 4 °C 保存。

**2.2.2 酶溶液** 将 AmpC 酶用 PBS 溶液溶解配制成 400 U/mL, -4 °C 保存。

**2.2.3 头孢硝噻吩溶液** 精密称取头孢硝噻吩 1 mg, 用 PBS 配制成 0.1 mg/mL 的底物溶液, -20 °C 保存。

**2.2.4 阿维巴坦钠溶液** 精密称取阿维巴坦钠 1 mg, 用 PBS 缓冲液溶解配制成 1 mg/mL 的溶液后, 稀释为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液, -20 °C 保存。

**2.2.5 底物溶液** 精密称取 6 种底物各 1 mg, 用 PBS 溶液配制成 0.2 mg/mL 的溶液, -4 °C 保存。

**2.2.6 克拉维酸钾溶液** 精密称取克拉维酸钾 1

mg, 用 PBS 缓冲液溶解配制成 1 mg/mL 的溶液后, 分别稀释为 0.5、0.1 mg/mL 的溶液, -20 °C 保存。

### 2.3 最优底物的筛选及最佳波长的确定

为了得到筛选 AmpC 酶抑制剂的最优反应底物, 选取头孢唑啉钠、头孢呋辛钠、头孢西丁钠、盐酸头孢替安、头孢曲松钠和头孢硝噻吩 6 种具有  $\beta$ -内酰胺环与氢化噻嗪环联合结构母核的头孢类抗生素作为底物进行评价<sup>[17-20]</sup>。实验时, 分别将其配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的底物溶液, 添加 400 U/mL 的 AmpC 酶溶液振荡混匀, 待完全反应后, 全波长扫描分别记录反应前后的特征吸收峰, 记录扫描数据, 绘制谱图, 通过比较分析获得最优底物及检测波长。

### 2.4 底物浓度对酶促反应的影响

在 300  $\mu\text{L}$  反应体系中, 依次加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 溶液、100  $\mu\text{L}$  酶溶液(400 U/mL)和 100  $\mu\text{L}$  质量浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的底物溶液。充分混匀后, 测定其在 30 °C、489 nm 波长下 5 min 内每隔 10 s 的吸光度( $A$ )值, 记录数据, 计算反应初速率( $K$ )和线性相关系数( $R^2$ ), 并设置 3 组平行, 以确定反应的最适底物浓度。

$$\text{抑制率} = (K_0 - K_1) / K_0$$

$K_0$  为酶速率线性回归方程斜率,  $K_1$  为样品线性回归方程斜率

### 2.5 酶浓度对酶促反应的影响

在同样反应体系下, 保持底物质量浓度为 0.1 mg/mL 不变。改变酶浓度, 将酶溶液浓度依次设定为 100、200、400、600、800 U/mL 5 个梯度, 按“2.4”项下方法进行测定, 并设置 3 组平行, 以确定反应的最适酶浓度。

### 2.6 最佳反应时间的确定

同样体系中, 在保证反应进行完全的前提下, 测定其在一定时间内的  $A$  变化, 将时间依次设定为 2、5、7、10 min, 记录数据, 按“2.4”项下方法进行测定, 并设置 3 组平行, 以确定筛选体系的最佳反应时间。

### 2.7 温度对酶促反应体系的影响

在同样体系下, 保持底物质量浓度为 0.1 mg/mL、酶浓度为 400 U/mL 不变。将配制好的底物、酶以及 PBS 溶液各分装为 5 份, 将温度依次设定为 10、20、30、40、50 °C, 按“2.4”项下方法进行测定, 并设置 3 组平行, 以确定筛选体系反应的最适温度。

## 2.8 溶剂对酶促反应的影响

在同样反应体系下,保持底物质量浓度为 0.1 mg/mL、酶浓度为 400 U/mL 不变,将 100  $\mu$ L PBS 溶液用 100  $\mu$ L 有机溶剂取代,按“2.4”项下方法进行测定,并设置 3 组平行,测定不同体积分数的甲醇、丙酮、DMSO 和乙醇对酶反应体系的影响,按“2.4”项下方法计算不同浓度有机溶剂的抑制率,以确定不同有机溶剂对方法的影响。

## 2.9 方法可靠性验证

保持反应体系不变,设定底物质量浓度为 0.1 mg/mL、酶浓度为 400 U/mL。按“2.4”项下方法计算不同质量浓度的克拉维酸钾和阿维巴坦钠对 AmpC 酶的抑制率,以验证方法的可靠性。

## 2.10 高通量技术参数评价

采用高通量筛选实验评估和验证中使用最广泛的参数  $Z'$  来评估 AmpC 酶抑制剂筛选体系的可靠性:  $0.5 \leq Z' < 1$ , 说明筛选体系中样品信号分布与参照信号分布的分离程度良好,筛选方法可靠;  $0 < Z' < 0.5$ , 表示中等程度的分布分离,说明筛选方法有待进一步优化。 $Z'$  可以通过阳性对照和阴性对照的标准偏差和均值来计算<sup>[21]</sup>。

$$Z' = 1 - 3 \times (\text{阳性对照标准偏差} + \text{阴性对照标准偏差}) / (\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值})$$

## 2.11 方法的稳定性评价

保持反应体系不变,按照上述所确定的最佳筛选条件,按“2.4”项下方法以阿维巴坦钠为参比,分别连续 3 d、每天 3 次不同时间测定抑制率,以此评价 AmpC 酶抑制剂筛选方法的稳定性。

## 2.12 136 种中药材水提物 AmpC 酶抑制活性筛选

精密称取各中药水提物粉末 1 mg,用配制好的 PBS 溶液或 10% 甲醇和乙醇溶解样品,溶解成 1 mg/mL 的待测溶液。按照“2.9”项下优化反应体系进行测定,计算各中药水提物对 AmpC 酶的抑制率。

## 2.13 中药桑寄生协同抗菌活性测定

将 96 孔板放置超净台紫外灯下照射 12 h 后灭菌待用。以肺炎克雷伯氏菌(ATCC700603)为指示菌,活化菌株并配制至 0.5 麦氏比浊浓度后,再将其稀释 100 倍待用<sup>[22]</sup>。以青霉素为抗菌阳性对照,用无菌 PBS 配制成质量浓度为 8 mg/mL 的母液,以 2 倍梯度无菌稀释成 10 个梯度待用;以阿维巴坦钠为酶抑制剂的阳性对照,用无菌 PBS 配制 1 mg/mL 阿维巴坦钠母液,5 倍梯度稀释成 10 个不同质量浓度梯度待用;待测样品用无菌 PBS 配制 20

mg/mL 母液,2 倍梯度稀释成 10 个不同质量浓度梯度待用。设置空白组(青霉素 50  $\mu$ L+PBS 50  $\mu$ L+菌液 100  $\mu$ L)、阳性对照组(青霉素 50  $\mu$ L+阿维巴坦钠 50  $\mu$ L+菌液 100  $\mu$ L)、样品空白组(中药 50  $\mu$ L+PBS 50  $\mu$ L+菌液 100  $\mu$ L)、样品组(青霉素 50  $\mu$ L+中药 50  $\mu$ L+菌液 100  $\mu$ L)。将添加药液及菌液的 96 孔板用保鲜膜密封后放置于 37  $^{\circ}$ C 恒温摇床中培养 24 h 后取出,在超净台中向每孔中加入 20  $\mu$ L 的染色剂 INT,静置 30 min 后观察结果。

## 2.14 统计学分析

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 GraphPad Prism 9 和 Microsoft Excel 软件进行数据分析。

## 3 结果

### 3.1 最适底物的筛选及最佳波长的确定

选取 6 种具有  $\beta$ -内酰胺环与氢化噻嗪环联合结构母核的不同底物,加酶完全反应后进行全波长扫描,结果如图 1 所示,不同筛选底物头孢呋辛钠、头孢西丁钠、盐酸头孢替安、头孢曲松钠与 AmpC 酶反应前后,组成体系中底物/产物的特征吸收峰分别出现在 235 nm/279 nm、236 nm/234 nm、259 nm/200 nm、240 nm/232 nm 处,差异不明显。而 AmpC 酶头孢唑啉钠、头孢硝噻吩反应的底物/产物的特征吸收峰分别出现在 271 nm/289 nm、389 nm/491 nm 处,具有较明显差异。进一步通过  $K$  值和  $R^2$  的比较显示,相较头孢硝噻吩,以头孢唑啉钠为反应底物时存在明显的反馈抑制现象。因此,本研究将头孢硝噻吩作为最适底物用于后续的筛选研究。且为了避免底物对吸光度的干扰,选择产物 489 nm 作为 AmpC 酶抑制剂筛选体系的最佳波长。

### 3.2 底物浓度对酶促反应体系的影响

由表 2 可知,保持酶浓度不变, $K$  随着底物质量浓度升高的变化为先升高后降低,当底物质量浓度为 0.10 mg/mL 时, $K$  达到最大,酶代谢反应线性相关性最好( $R^2=0.9945$ ),因此为了方法的稳定性和筛选结果的可靠性,以 0.10 mg/mL 为本方法筛选的最佳底物浓度。

### 3.3 酶浓度对酶促反应体系的影响

由表 3 可知,保持底物质量浓度为不变,将酶溶液设置为 5 个浓度梯度,发现  $K$  值随着酶浓度的增加先升高后降低,在酶浓度 600 U/mL 时达到最高;当酶浓度为 200 U/mL 时  $R^2$  最大,线性相关性最好;考虑到  $K$  的变化和方法的灵敏性,酶浓度为 400 U/mL 时  $K$  值较大,线性相关性较好,综合考虑

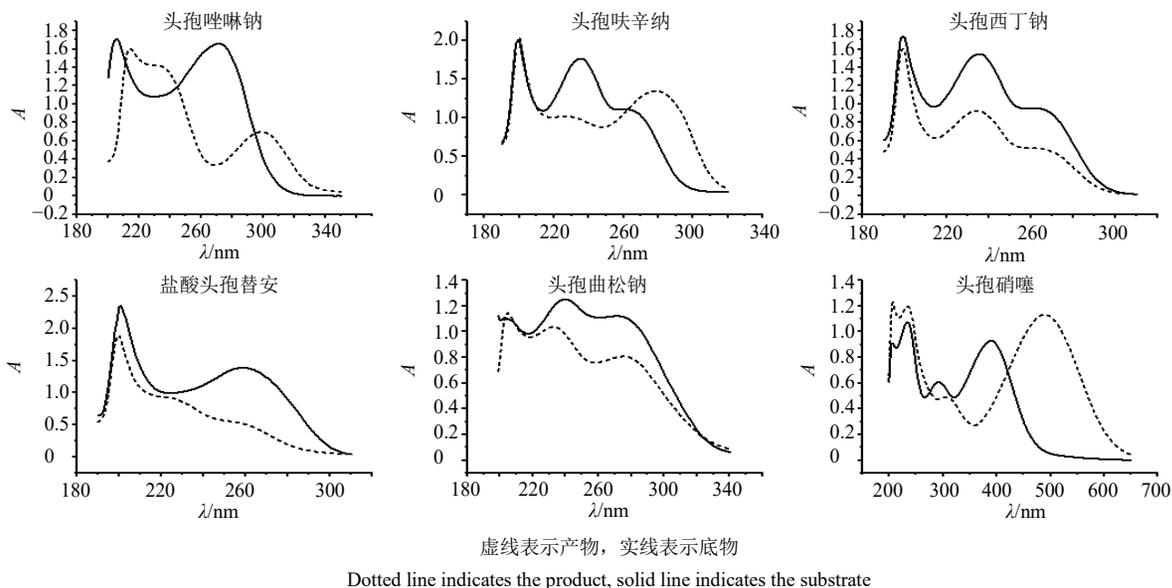


图1 AmpC酶-底物反应体系中底物及产物的紫外吸收光谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of substrates and products in AmpC enzyme-substrate reaction system

表2 不同底物浓度对酶反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effects of different substrate concentrations on enzyme reaction system ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

酶浓度/ 底物质量浓度/ (U·mL <sup>-1</sup> ) (mg·mL <sup>-1</sup> )	K	R <sup>2</sup>
400 0.05	0.008 5 ± 0.001 1	0.985 2 ± 0.001 6
400 0.10	0.017 2 ± 0.001 4	0.994 5 ± 0.002 8
400 0.15	0.016 5 ± 0.001 5	0.991 5 ± 0.001 5
400 0.20	0.016 1 ± 0.003 2	0.988 0 ± 0.004 4
400 0.25	0.014 6 ± 0.000 9	0.982 5 ± 0.006 1

表3 不同酶浓度对反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of different enzyme concentrations on reaction system ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

酶浓度/ 底物质量浓度/ (U·mL <sup>-1</sup> ) (mg·mL <sup>-1</sup> )	K	R <sup>2</sup>
100 0.1	0.003 4 ± 0.000 2	0.996 1 ± 0.000 5
200 0.1	0.005 4 ± 0.000 7	0.997 8 ± 0.000 4
400 0.1	0.011 8 ± 0.004 5	0.997 2 ± 0.000 3
600 0.1	0.018 2 ± 0.002 6	0.992 3 ± 0.001 6
800 0.1	0.016 3 ± 0.002 1	0.989 3 ± 0.003 8

确定 400 U/mL 为本方法的酶筛选最优浓度。

### 3.4 最佳反应时间的确定

如表 4 所示, 当酶浓度为 400 U/mL、底物质量浓度为 0.1 mg/mL 时, 在反应 7 min 内, 酶促反应的线性关系稳定。为了提高 AmpC 酶抑制剂筛选体系的筛选效率, 将筛选时间确定为 5 min。

### 3.5 温度对酶促反应体系的影响

如表 5 所示, 随着温度增加 K 值呈先升高后下降的变化趋势, 当温度在 30 °C 时 K 值最大, 线性

表4 最佳反应时间的确定 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Determination of best reaction time ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

酶浓度/ 底物质量浓度/ (U·mL <sup>-1</sup> ) (mg·mL <sup>-1</sup> )	t/min	K	R <sup>2</sup>
400 0.1	3	0.001 3 ± 0.000 1	0.998 8 ± 0.000 2
400 0.1	5	0.001 2 ± 0.000 1	0.997 3 ± 0.000 7
400 0.1	7	0.001 1 ± 0.000 1	0.993 8 ± 0.001 5
400 0.1	10	0.000 9 ± 0.003 1	0.985 9 ± 0.003 1

表5 不同反应温度对酶反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effects of different reaction temperatures on enzyme reaction system ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

酶浓度/ 底物质量浓度/ (U·mL <sup>-1</sup> ) (mg·mL <sup>-1</sup> )	温度/°C	K	R <sup>2</sup>
400 0.1	10	0.001 1 ± 0.000 9	0.990 9 ± 0.002 1
400 0.1	20	0.007 8 ± 0.000 7	0.994 7 ± 0.001 4
400 0.1	30	0.013 3 ± 0.000 7	0.993 7 ± 0.001 3
400 0.1	40	0.012 8 ± 0.001 2	0.993 4 ± 0.002 2
400 0.1	50	0.011 3 ± 0.000 1	0.993 4 ± 0.001 4

相关性较好, 因此将 30 °C 作为 AmpC 酶抑制剂筛选的最优温度, 以保证筛选结果的可靠。

### 3.6 溶剂对酶促反应体系的影响

如表 6 所示, 以去离子水为对照时, 抑制率变化不超过 1%, 甲醇和乙醇体积分数保持在 30% 以下时, 对 AmpC 酶抑制剂筛选方法的影响较小, 而丙酮和 DMSO 体积分数保持在 10% 以下时对 AmpC 酶抑制剂筛选方法的影响较小; 综上, 为了筛选结果的可靠性, 对于磷酸缓冲溶液难溶的样品, 用有机溶剂进行溶解时, 需要考虑有机溶剂类型和体积分数对方法的影响。

表 6 溶剂对酶促反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 6 Effect of solvent on enzymatic reaction system ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

溶剂	体积分数/%	抑制率/%	溶剂	体积分数/%	抑制率/%
水	—	0.65±0.17	DMSO	10	9.74±0.74
甲醇	10	-2.30±0.66		20	32.98±1.76
	20	8.08±0.81		30	41.09±0.23
	30	10.88±0.13		50	55.61±0.79
	50	26.98±0.84		70	64.61±0.52
	70	84.01±0.45	乙醇	10	-1.13±1.05
丙酮	10	4.39±0.19		20	-1.09±1.44
	20	21.16±0.85		30	-0.54±0.37
	30	23.57±0.26		50	30.30±0.28
	50	81.87±0.88		70	90.45±1.03
	70	100.00±0.00			

### 3.7 方法可靠性验证

如表 7 所示, 克拉维酸钾对 AmpC 酶没有明显抑制作用, 与文献报道一致<sup>[23-24]</sup>, 而阳性对照阿维巴坦钠随着质量浓度的升高, 对 AmpC 酶的抑制效果逐渐增加, 呈剂量相关性, 提示本研究搭建的方

法稳定可靠, 可以用于后期的筛选。进一步通过比较, 阳性对照阿维巴坦钠质量浓度在 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  其抑制率为 86.70%, 因此最终确定方法的阳性对照质量浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  用于后续筛选研究可靠性的参照。

表 7 不同抑制剂对酶反应体系的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 7 Effects of different inhibitors on reaction of enzyme system ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

阳性对照	质量浓度/( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	抑制率/%	阳性对照	质量浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	抑制率/%
克拉维酸钾	0.1	0.03±0.95	阿维巴坦钠	0.1	25.08±0.86
	0.5	5.67±0.45		0.3	52.98±0.90
	1.0	15.05±1.21		0.5	68.44±1.11
		0.8		80.89±1.48	
				1.0	86.70±0.75

### 3.8 高通量技术参数评价

Z'因子的计算结果为 0.94, 在 0.5~1.0 内, 符合高通量筛选的要求, 说明本研究建立的 AmpC 酶抑制剂筛选体系稳定可靠。

### 3.9 方法的稳定性评价

对 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的阿维巴坦钠进行连续 3 d 各 6 次的抑制率测定, 测定的 RSD 分别为 1.00%、1.37%、1.15%, RSD 均小于 2%, 说明搭建筛选方法的稳定性和重复性好, 可用于 AmpC 酶抑制剂的筛选。

### 3.10 中药源 AmpC 酶抑制剂的筛选

根据上述所建立的 AmpC 酶抑制剂筛选方法, 对 136 种中药水提物进行初步活性筛选, 结果如表 8 所示。抑制率低于 40% 的有 115 种中药材, 占比 84.56%; 抑制率为 40%~50% 有 6 种中药材, 占比 4.41%; 抑制率为 60%~70% 有 3 种中药材, 占比 2.21%; 抑制率为 70%~80% 有 7 种中药材, 占比 5.15%; 有 5 种中药提取物的抑制活性大于 80%, 分别为桑寄生 (86.22%)、赤芍 (85.30%)、红景天 (84.26%)、千斤拔 (83.83%)、石见穿 (83.37%),

占比 3.68%。该结果显示中药是筛选 AmpC 酶抑制剂药物的良好资源。

### 3.11 中药桑寄生协同抗菌活性测定

由协同抗菌活性测定结果可知青霉素对耐药肺炎克雷伯氏菌 (ATCC700603) 表现出较弱的抗菌活性, 其单独抗菌的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 为 2  $\text{mg}/\text{mL}$ ; 而当添加阿维巴坦钠 (稀释质量浓度为 0.04  $\text{mg}/\text{mL}$ ) 与青霉素联用时, 青霉素 MIC 降低为 0.1  $\text{mg}/\text{mL}$ , 表明阿维巴坦钠明显改善青霉素的抗菌活性; 相较青霉素, 桑寄生显示了非常弱的抗菌活性, 其单独抗菌的 MIC 为 20  $\text{mg}/\text{mL}$ ; 当添加桑寄生提取物 (稀释质量浓度为 0.04  $\text{mg}/\text{mL}$ ) 与青霉素联用时, 青霉素 MIC 降低为 0.8  $\text{mg}/\text{mL}$ , 表明桑寄生也可以明显改善青霉素的抗菌活性。

## 4 讨论

头孢类抗生素具有抗菌谱广、杀菌活性强、过敏反应少、不良反应小等特点, 长期居全球抗感染药物市场排名第 1 (约占抗感染药物市场 50%以上

表 8 136 种中药材对 AmpC 酶抑制活性评价结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Evaluation results of inhibitory activity of 136 Chinese medicinal materials on AmpC enzyme ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

中药	抑制率/%	中药	抑制率/%	中药	抑制率/%
千里光	4.41	川断	—	莱菔子	—
姜半夏	—	藤梨根	78.10	海桐皮	—
马蓝	10.67	蒲公英	—	寻骨风	—
木贼	—	党参	11.95	络石藤	—
苦丁茶	0.84	山银花	—	蕤仁	—
天龙	—	铁皮石斛	—	绵草薹	—
龙利叶	0.48	山楂	25.31	千斤拔	83.83
地黄	—	赤小豆	—	黄药子	40.92
楮实子	—	红景天	84.26	枳壳	—
草果	1.34	桑	—	鬼箭羽	—
漏芦	—	槐花	11.13	红豆蔻	0.88
枇杷叶	37.33	高良姜	73.56	叶下珠	35.65
白薇	—	辛夷	—	山慈菇	—
使君子	—	淡竹叶	—	蔓荆子	—
女贞子	—	橘核	—	石见穿	83.37
肉桂	24.79	石斛	—	葶澄茄	—
火炭母	14.60	大黄	30.42	瓜蒌	—
枳实	—	泽漆	—	蒺藜	—
马勃	4.43	猪牙皂	11.40	天南星	—
金樱子	5.28	蛇六谷	1.71	葫芦茶	45.36
青天葵	—	桔梗	7.82	芦根	—
荆芥	5.60	仙茅	8.85	菴蔚子	1.03
茜草	—	仙鹤草	77.04	枳椇子	27.53
桑白皮	34.35	骨碎补	15.37	冬葵果	—
瞿麦	24.79	亚麻子	1.43	金钱草	29.21
苦楝	28.26	墨旱莲	48.70	棕榈炭	9.90
川木香	1.79	合欢皮	8.95	独脚金	12.75
白附子	—	大血藤	64.42	鬼针草	12.51
重楼	—	桑寄生	86.22	车前子	2.82
白前	—	何首乌	—	远志	—
猫爪草	0.95	土茯苓	40.74	垂盆草	6.35
没药	25.30	乳香	43.73	通草	0.10
秦皮	2.89	川牛膝	6.06	百部	0.48
绵马贯众	70.77	茯神	1.16	牛大力藤	0.26
玉簪花	3.64	淫羊藿	21.71	赤芍	85.30
土牛膝	0.41	夏枯草	62.93	威灵仙	1.37
天花粉	—	桃仁	25.31	益智仁	5.61
穿山龙	1.75	罗汉果	14.29	锁阳	72.70
半夏	2.18	鸭跖草	24.07	草豆蔻	47.59
决明子	—	龙胆	26.43	紫菀	7.94
刺五加	1.92	两头尖	—	地锦草	65.36
泽泻	1.15	沙苑子	—	白屈菜	11.43
柏子仁	1.29	半枫荷	78.81	卷柏	13.26
忍冬藤	—	金荞麦	70.54	降香	—
冬凌草	0.81	山药	—	法半夏	8.11
薯蓣	2.76				

“—”表示对 AmpC 酶没有抑制作用

“—” means that it has no inhibitory effect on AmpC enzyme

的市场份额)<sup>[25]</sup>, 是临床最常使用的抗生素之一。研究显示, AmpC 酶编码在许多肠杆菌科菌和一些其他生物的染色体上, 由其介导引发的头孢唑啉、头

孢西丁等耐药性是头孢类抗生素临床使用最大的障碍<sup>[26]</sup>, 并呈现上升态势, 因此围绕头孢类抗生素进行的研究意义重大。

C 类  $\beta$ -内酰胺酶的迅速出现促使迫切需要开发 C 类  $\beta$ -内酰胺酶特异性抑制剂以进行有效的临床治疗。为了促进 C 类  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的开发,需要新的筛选 C 类酶抑制剂的方法。除了通过待筛样品与抗菌药联用的抗耐药菌常规筛选外<sup>[27-28]</sup>,目前关于 C 类  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂筛选主要是基于荧光素标记<sup>[29]</sup>以及新型荧光探针<sup>[30]</sup>方法为主,但是该方法存在操作繁琐、筛选成本较高、效率及普适性不高等明显缺陷,因此关于该方法的应用的报道并不多见。本研究通过优化建立的紫外-可见分光光度法,具有简便、可操作性强、稳定性好的特点,可实现 AmpC 酶抑制剂的快速检测和有效筛选,为筛选该类酶抑制剂候选化合物解决愈发严重的抗生素耐药性提供重要的方法支撑。

本研究中 AmpC 酶抑制剂的快速筛选是在反应体系中添加样品(抑制剂)后,通过  $K$  值的变化来评价其抑酶活力的大小,其中温度、孵育时间、有机溶剂的类型、浓度以及产物等因素都会影响到酶促反应速率,进而影响筛选结果。因此,为了最大限度的避免上述因素对酶促反应的影响,本研究通过测定反应的初速度( $V_0$ )来评价。 $V_0$ 指在反应刚开始且上述因素尚未发挥作用时,时间进程曲线为直线部分时的反应速度,一般在约大于 10%的底物被转化成产物之前对  $V_0$ 进行测定,以便将这类复杂因素的影响降至最低。本研究通过不同因素的比较优化,在设定的检测时间内, $V_0$ 呈线性且相关性关系良好,最终证实本研究建立方法能用于 AmpC 酶抑制剂的筛选。

在该 AmpC 酶抑制剂评价体系所确定的最佳反应时间内,酶和底物的浓度过高或过低都会影响整个反应的正常进行,不利于抑制剂的筛选。因此本研究优化了 AmpC 酶抑制剂评价体系的最适酶浓度和底物浓度,并且评价了不同有机溶剂对反应的影响,即当甲醇和乙醇的体积分数在 30%以下,丙酮和 DMSO 在 10%以下时对反应体系的影响较小。最终只有当整个反应体系的浓度适宜时,酶促反应才会趋于平稳状态,最终确定了最佳的筛选条件。

受限于 AmpC 酶抑制剂筛选方法,目前关于该类酶抑制剂,尤其是以中药为资源系统的相关研究还较少见于文献报道。本研究根据上述所建立的 AmpC 酶抑制剂筛选方法对 136 种中药材进行活性评价,结果显示有 12 种中药水提取物 AmpC 酶抑制活性大于 70%,5 种中药水提取物的抑制率大于

80%,桑寄生(86.22%)和赤芍(85.30%)2 种中药水提取物的抑制活性大于 85%。尽管也有桑寄生醋酸乙酯萃取物具有抗菌的研究报道<sup>[31]</sup>,但是本研究通过酶抑制剂筛选的结果证实,桑寄生水提取物具有明显的协同抗菌活性,可显著提高青霉素的抗菌 MIC 值,显示了良好的进一步研究的价值,后期通过对其高活性部位活性物质的分离将有望获得具有良好活性的抗耐药菌候选化合物。此外,本研究除了桑寄生水提取物抑制活性最高外,其他 4 种水提取的酶抑制活性都大于 80%,也进一步证实中药确实是新药发现尤其是抗耐药菌药物发现的良好资源,对其进行进一步的扩大筛选是必要的。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 朱永官, 欧阳纬莹, 吴楠, 等. 抗生素耐药性的来源与控制对策 [J]. 中国科学院院刊, 2015, 30(4): 509-516.
- [2] 王楠, 苏誉, 刘文杰, 等. 植物内生菌中抗耐药微生物活性成分的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(8): 263-274.
- [3] Rotondo C M, Wright G D. Inhibitors of metallo- $\beta$ -lactamases [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 39: 96-105.
- [4] Docquier J D, Mangani S. An update on  $\beta$ -lactamase inhibitor discovery and development [J]. *Drug Resist Updat*, 2018, 36: 13-29.
- [5] Wong D, van Duin D. Novel beta-lactamase inhibitors: Unlocking their potential in therapy [J]. *Drugs*, 2017, 77(6): 615-628.
- [6] Ambler R P. The structure of beta-lactamases [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1980, 289(1036): 321-331.
- [7] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(6): 1211-1233.
- [8] Martins-Oliveira I, Pérez-Viso B, Silva-Dias A, et al. Rapid detection of plasmid AmpC beta-lactamases by a flow cytometry assay [J]. *Antibiotics*, 2022, 11(8): 1130.
- [9] Bush K, Jacoby G A. Updated functional classification of beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(3): 969-976.
- [10] Goldstein E. Rise in the prevalence of resistance to extended-spectrum cephalosporins in the USA, nursing homes and antibiotic prescribing in outpatient and inpatient settings [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2021, 76(11): 2745-2747.
- [11] 谢朝云, 熊芸, 覃家露, 等. 某院 2011—2017 年非痰标

- 本产 AmpC 酶阴沟肠杆菌的临床分布及耐药性分析 [J]. 中国药房, 2018, 29(8): 1069-1073.
- [12] Powers R A. Structural and functional aspects of extended-spectrum AmpC cephalosporinases [J]. *Curr Drug Targets*, 2016, 17(9): 1051-1060.
- [13] 严丹华, 黄冠华. 头孢菌素类抗生素的药理特性及临床应用分析 [J]. 医学信息, 2014, 27(25): 205.
- [14] Tooke C L, Hinchliffe P, Bragginton E C, et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors in the 21st century [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(18): 3472-3500.
- [15] Drawz S M, Papp-Wallace K M, Bonomo R A. New  $\beta$ -lactamase inhibitors: A therapeutic renaissance in an MDR world [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(4): 1835-1846.
- [16] 张新国, 王文娜, 王学智, 等.  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂快速筛选方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(9): 734-739.
- [17] 任丽琴. 头孢呋辛钠滤前液微生物限度检查法探究 [J]. 产业与科技论坛, 2016, 15(18): 47-48.
- [18] 许娟, 边保华, 方文雄. 产头孢菌素酶肺炎克雷伯菌耐药表型与基因型分析 [J]. 中国预防医学杂志, 2017, 18(9): 685-687.
- [19] 何军芳, 厉昆, 刘永权, 等. 注射用头孢唑林钠原料无菌检查方法的研究 [J]. 精细化工中间体, 2021, 51(3): 70-72.
- [20] 王晓丽, 葛亮, 李兴华. 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶和头孢菌素酶肺炎克雷伯菌的分布及耐药特征分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(1): 5-9.
- [21] 王斯文, 陈向东, 汪辉, 等.  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂高通量筛选模型的建立 [J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(2): 102-105.
- [22] 钟灵允, 王兰, 单体江, 等. 多孔板-MTT 比色法评价植物和微生物代谢产物的抗真菌活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(1): 20-24.
- [23] Zhou X Y, Kitzis M D, Acar J F, et al. Activity of the beta-lactamase inhibitor BRL 42715 against cephalosporinases produced by Enterobacteriaceae [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1993, 31(4): 473-480.
- [24] 丁天然, 张永信.  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的研究和开发 [J]. 上海医药, 2011, 32(5): 222-226.
- [25] 薛雨, 陈宇璞. 头孢菌素类抗生素的最新研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(2): 86-92.
- [26] Jacoby G A. AmpC  $\beta$ -lactamases [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(1): 161-182.
- [27] 李焯新, 蔡小辉, 黄瑜, 等. 中草药与抗生素联用对罗非鱼源无乳链球菌的体外抑菌作用 [J]. 广东海洋大学学报, 2016, 36(4): 45-49.
- [28] 徐晓津, 李秀华, 马一帆, 等. 复方中药及其与抗生素联用对斜带石斑鱼变形假单胞菌病的防治效果 [J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(4): 574-580.
- [29] Tsang M W, Chan P H, Liu S Y, et al. A fluorescein-labeled AmpC  $\beta$ -lactamase allows rapid characterization of  $\beta$ -lactamase inhibitors by real-time fluorescence monitoring of the  $\beta$ -lactamase-inhibitor interactions [J]. *Biotechnol J*, 2016, 11(2): 257-265.
- [30] Yu P, Yang J N, Yan J W, et al. A novel fluorescent probe for the detection of AmpC beta-lactamase and the application in screening beta-lactamase inhibitors [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 234: 118257.
- [31] 黄思璐. 桑寄生抑菌有效成分及作用机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.

[责任编辑 李亚楠]