

多粘菌素对綠脓杆菌磷³²代謝的影响*

梁业楷 周聖恩 張寬厚

(中国医科大学微生物学教研室, 北京)

多粘菌素是一种碱性多肽抗菌素。Ainsworth 等^[1], Benedict 等^[2]和 Stanley 等^[3]于1947年分別同时发现。多粘菌素对革兰氏阴性菌的杀菌作用較其他抗菌素为突出, 尤其是能显著地降低綠脓杆菌的感染率^[4]。

关于多粘菌素对細菌的作用机制問題, 国外曾有一些学者作过研究, 认为多粘菌素能和細胞的外膜(可能是磷脂类的磷酸基)結合, 损坏其結構, 菌体内戊糖、磷酸盐及在波长260毫微米处吸光最大的物质(核酸中的嘌呤及嘧啶)漏出于細胞外。而革兰氏阳性菌細胞壁所含的磷脂較革兰氏阴性者少, 故对多粘菌素不敏感^[5]。

Cohen^[6]等指出多粘菌素能抑制某些分枝杆菌酯酶的活性。Newton^[7]发现多粘菌素B与E在三倍于杀菌浓度时, 能抑制綠脓杆菌的内生呼吸, 而且其氧化2-酮葡萄糖酸、醋酸、丙酮酸、草酰乙酸及琥珀酸的能力也被抑制, 但仍能氧化葡萄糖, 使培养基内积聚有2-酮葡萄糖酸。而杀菌浓度的多粘菌素則能加倍綠脓杆菌的内生呼吸, 此时对葡萄糖、醋酸、丙酮酸、草酰乙酸及琥珀酸的氧化作用并无抑制能力。

本文拟用同位素方法, 以验证此抗菌素能否使菌体的含磷化合物漏出; 并就多粘菌素对綠脓杆菌菌体各含磷化合物生物合成的影响, 作初步的探討。

一、材料与方 法

菌种 綠脓杆菌一株, 系从北京协和医院檢驗科临床标本分离出来, 試驗前該菌經詳細的生化鉴定, 并保存于冷冻干燥管中。

培养基 使用营养琼脂(BBL牌)与液体綜合培养基二种。后者的成分如下: K_2HPO_4 , 14.0克; 枸橼酸钠, 1.0克; $(NH_4)_2SO_4$, 2.0克; KH_2PO_4 , 6.0克; $MgSO_4$, 0.2克; 葡萄糖, 4.0克; 谷氨酸, 0.6克; 蒸餾水, 1,000毫升; pH7.6。除葡萄糖系单独8磅15分钟灭菌外, 其余各成分混合后15磅15分钟灭菌, 再用无菌手續加入葡萄糖。

抗菌素 多粘菌素B为英国Burrhoughs Wellcome出品, 使用时以无菌手續用綜合培养基配成。

同位素 用苏联出品的 $Na_2HP^{32}O_4$ 原液, 使用前置80℃水浴灭菌30分钟, 然后加入培养基中, 使每毫升培养基含3微居里。

放射性的測定 用国产64位定标器及钟罩型計数管測定样品每分钟的脉冲数(cpm),

含磷化合物的分离与提取 按Schmidt与Thannhauser法^[8]。总磷的測定用Chen維生素丙还原法^[9]。

二、試驗結果

一、菌体含磷化合物漏出試驗 将一定量的 $Na_2HP^{32}O_4$ 原液加入已灭菌而尚未凝固

* 本文摘要曾在1962年北京市微生物学会年会上宣讀。

本文1963年3月4日收到

的营养琼脂库氏瓶中, 摇匀平放, 待凝固后接种绿脓杆菌菌液 1 毫升(菌液培养于 5 毫升综合培养基管中 18 小时), 置 37°C 孵箱过夜, 次早取出, 以带橡皮头的玻棒, 用生理盐水将

菌苔冲洗刮下, 此菌即为带 P^{32} 标记的菌液, 离心沉淀, 并以盐水离心沉淀洗涤数次, 直至洗液上清的脉冲数与本底相近为止(约洗 4 次左右即可)。菌体以综合培养基稀释至 15 毫升, 分装到 4 个离心管中, 每管 3 毫升, 再于每一离心管内加入不同浓度的多粘菌素 1 毫升, 使抗菌素浓度在每毫升培养基中分别为 100r、500r、1,000r, 第 4 管不加抗菌素, 但补充 1 毫升稀释抗菌素所用的培养基作为对照。各管摇匀后置孵箱过夜, 次早取出, 离心沉淀, 取上清 0.2 毫升, 铺于锡箔小碟中, 晾干后测定其脉冲数, 结果表明: 在一定浓度范围内的抗菌素能使菌体中的含磷化合物漏出到周围环境中, 药物的浓度越大, 则上清的脉冲数亦越多(图 1)。

二、多粘菌素对绿脓杆菌菌体含磷化合物生物合成的影响 将绿脓杆菌接种到 3 个营养琼脂库氏瓶上, 孵育过夜, 次早用综合培养基刮下菌苔, 离心沉淀洗涤 2 次, 然后加入 210 毫升综合培养基使成悬液, 同时加入 $\text{Na}_2\text{HP}^{32}\text{O}_4$ 原液, 摇匀, 分装 4 个三角瓶, 每瓶 50 毫升, 于其中 3 瓶加入 1 毫升不同浓度的多粘菌素, 使每毫升培养基中药物的浓度分别为 10r、20r、40r, 第 4 瓶补足综合培养基 1 毫升作为对照。各瓶摇匀后置孵箱过夜, 次早取出, 此即为带 P^{32} 标记的菌液, 然后以冷

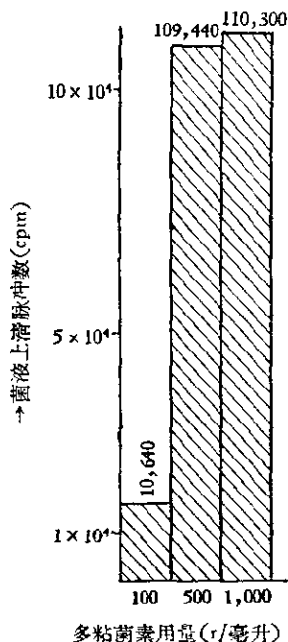


图 1 不同浓度的多粘菌素使带有 P^{32} 标记的菌体内内容物漏出的比较(对照上清的脉冲数已减去)

冻真空高速离心机沉淀菌体(11,000 rpm), 再用综合培养基洗涤沉淀, 直至上清的脉冲数与本底相近为止, 测定菌体总放射量, 并进行各含磷化合物的提取。取每种提取液 0.2 毫升铺样, 测定其脉冲数。同时并用化学方法测定菌体的总磷含量, 由此计算出其比放射性

$$\left[\text{比放射性} = \frac{P^{32}}{(P^{31} + P^{32})} \right]$$
, 结果表明: 无论是完整的菌体或含磷化合物各部分, 小剂量的

多粘菌素对 P^{32} 的渗入菌体有刺激作用, 药物浓度增大时, 便呈抑制作用。从图 2 及图 3 可见, 多粘菌素如每毫升为 5—10r 时, 菌体 P^{32} 的总放射性和比放射性都上升, 药物浓度增大则放射性降低。如将菌体各含磷化合物, 分别提出, 然后测出每部分的放射性, 结果也相似(图 4); 而且, 可以看到培养基中的 P^{32} 在菌体各部分的分布情况: 渗入 RNA 部分者最多, 酸性磷与磷脂部分次之, DNA 与磷蛋白部分又次之。

三、讨 论

多肽类抗菌素, 如多粘菌素具有表面活动性, 能降低溶液的表面张力, 使细菌的外膜损坏。Newton 与 Few^[5,10] 等均指出, 多粘菌素的游离氨基能和绿脓杆菌表面磷脂中带阴电的磷酸基结合, 使细胞膜损坏, 菌体内核酸经损坏的细胞膜排出于细胞外, 引起细菌死亡。本文中漏出试验结果亦证明多粘菌素能使绿脓杆菌菌体含磷内容物释放到细胞外, 与以往学者用光学方法研究的结果相符。

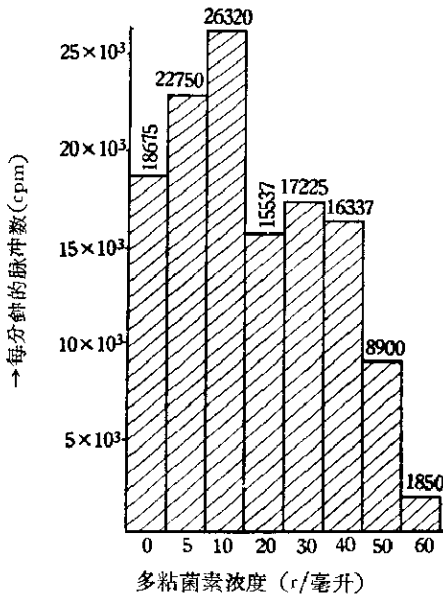


图2 在不同浓度的多粘菌素影响下菌体总放射性的比较

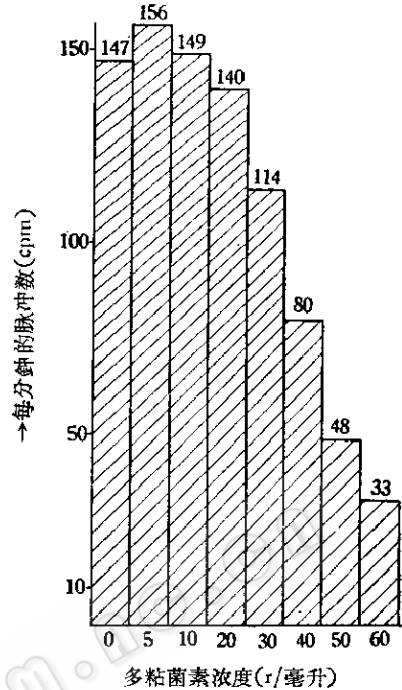


图3 在不同浓度多粘菌素影响下菌体比较放射性的比较

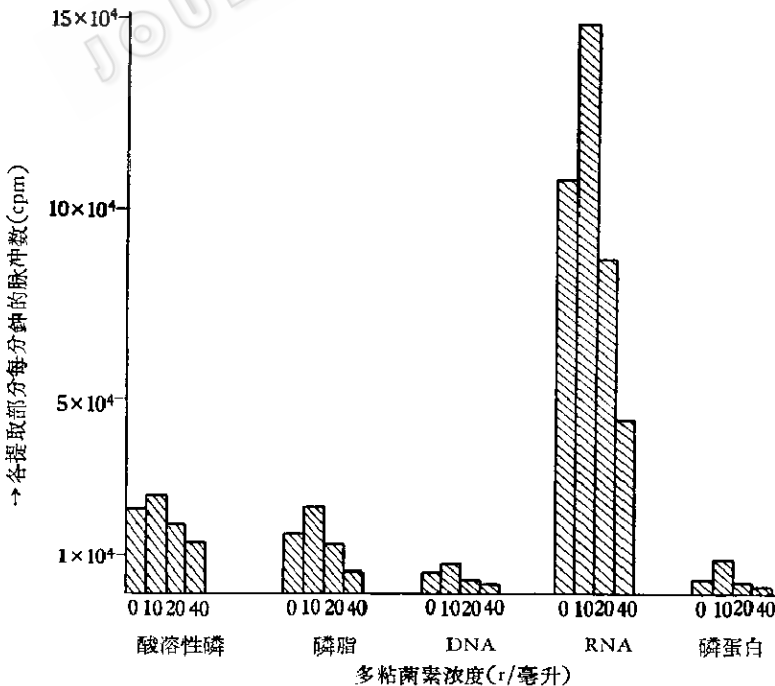


图4 培养基中 P³² 渗入到菌体各含磷化合物中的比较

許多抗菌素或化学疗剂在低浓度时往往有刺激細菌生长的作用。Eagle^[11-14] 等在研究青霉素浓度和抗菌作用的关系时指出:小剂量青霉素对敏感細菌全无抗菌作用,或反而可刺激細菌的生长;若增大剂量,则可呈抑制作用,浓度更高则呈杀菌作用。根据本研究的結果,多粘菌素在較低浓度时对菌体中各种含磷化合物的生物合成都稍有刺激作用;若剂量增大,则呈抑制作用。因为培养基中的磷大部分渗入到菌体 RNA 中,所以多粘菌素的影响在 RNA 合成上尤为显著。RNA 的合成与菌体蛋白质的合成,即細菌的生长繁殖呈平行的关系,已被許多資料所証实^[15-16]。由此可以认为,較大浓度的多粘菌素对細菌体含磷化合物,特别是 RNA 的抑制,可能是細菌致死原因之一。

从本研究的两种試驗結果看来,多粘菌素一方面能损伤細胞膜,使含磷内容物(主要为核酸)漏出;另一方面,又抑制新的菌体含磷化合物的合成。細菌受此两方面的影响,因而致死。

四、总 結

1. 用同位素方法証明多粘菌素能使細菌菌体内含磷化合物释放到周围环境中。
2. 培养基中的 P^{32} 大部分渗入到菌体 RNA 中,酸溶性磷与磷脂部分次之, DNA 与磷蛋白部分更次之。
3. 小剂量的多粘菌素能促进菌体各种含磷化合物的生物合成,药量增加时则呈抑制作用。

多粘菌素对綠脓杆菌的杀菌作用,可能和菌体内含磷化合物的漏出,及菌体含磷化合物特别是 RNA 合成被抑制有关。

参 考 文 献

- [1] Ainsworth, G. G. et al.: *Nature*, **160**:263, 1947.
- [2] Benedict, R. G. et al.: *J. Bact.*, **54**:24, 1947.
- [3] Stanley, P. G. et al.: *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **81**:43, 1947.
- [4] Jackson, D. M. et al.: *Lancet*, **11**:137, 1951.
- [5] Newton, B. A.: *Bact. Rev.*, **20**:14, 1956.
- [6] Cohen, S. et al.: *Federation Proc.*, **11**:463, 1952.
- [7] Newton, B. A.: *J. Gen. Microbiol.*, **8**:VI, 1953.
- [8] Schmidt, D. and Thannhauser, S. G.: *J. Biol. Chem.*, **161**:83, 1945.
- [9] Chen, P. S.: *Anal. Chem.*, **28**:1756, 1956.
- [10] Few, A. V.: *Biochim. Biophys. Acta*, **16**:137, 1955.
- [11] Eagle, H. et al.: *J. Bact.*, **58**:475, 1949.
- [12] ————: *Am. Int. Med.*, **33**:544, 1950.
- [13] ————: *J. Bact.*, **62**:633, 1951.
- [14] ————: *J. Exp. Med.*, **88**:99, 1948.
- [15] Davidson, J. N.: 核酸的生物化学, 155頁, 科学出版社, 1961。
- [16] Gale, E. F. and McQuillen, K.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **11**:283, 1957.

EFFECT OF POLYMYXIN ON RADIOACTIVE PHOSPHOROUS METABOLISM IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

LIANG YEH-KAI, CHOW SUNG-AN, CHANG KUANG-HOU

(Department of Microbiology, Chinese Medical University, Peking)

By using radioactive isotope technique, it has been demonstrated that under the action of polymyxin, a leakage of phosphorous compounds from the cells of *Ps. aeruginosa* was observed.

It has been found that most of the P^{32} of the medium was incorporated into the RNA fraction of the cells grown, whereas the incorporation of P^{32} into the fractions of acid-soluble phosphorous and phospholipid was next, while those of DNA and phosphoprotein was the least frequent.

Smaller doses of polymyxin stimulated the biosynthesis of phosphorous compounds of the cells, but with large doses, an inhibitory effect appeared.

The bactericidal action of polymyxin on *Ps. aeruginosa* could be due to a leakage of phosphorous compounds of the cells as well as the inhibition of the biosynthesis of phosphorous compounds, especially RNA, of the bacterial cells.