

微生物药物筛选

 β -内酰胺类抗生素、*D*-Ser、DAAO抑制剂三药联用抗MRSA作用

于洁 胡辛欣 聂彤颖 王秀坤 李雪 游雪甫 李聪然*

(中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所抗感染药物研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: **目的** 研究 β -内酰胺类抗生素、*D*-Ser及*D*-氨基酸氧化酶(DAAO)抑制剂三药联用抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染的疗效。**方法** 体外利用肉汤微稀释法和结晶紫染色法评价DAAO抑制剂5-氯苯并[*d*]异恶唑-3-醇(CBIO)对细菌生长和生物被膜的影响;建立小鼠全身感染模型和大鼠腿部感染模型,以生存率和组织匀浆细菌计数为指标评价三药联用疗效;小鼠皮下给药评价CBIO的安全性。**结果** 在体外MIC测定CBIO没有抑菌作用,但分别与苯唑西林和美罗培南联用时可对两种抗菌药物的抗菌活性产生明显的拮抗作用。*D*-Ser和CBIO单用对于MRSA N315所产生生物被膜的抑制和清除作用较弱,当与抗生素联用时可显著提升生物被膜的抑制率和清除率;皮下单独给予健康小鼠30mg/kg CBIO后5d内,小鼠生存状况良好($n=5$);三药(β -内酰胺类抗生素、*D*-Ser和CBIO)联用相比单用抗生素以及抗生素和*D*-Ser两药联用,可一定程度上提高小鼠存活率、降低大鼠腿部肌肉组织持菌量。**结论** β -内酰胺类抗生素、*D*-Ser及CBIO联用在体内具有良好的抗MRSA感染作用,且CBIO体内安全性良好,但CBIO会与抗生素产生一定程度的拮抗作用。一定浓度的CBIO与 β -内酰胺类抗生素、*D*-Ser联用或许能为MRSA感染的临床用药提供新的选择。

关键词: 联合用药;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; *D*型丝氨酸; *D*-氨基酸氧化酶抑制剂

中图分类号: R978.1+1 **文献标志码:** A

Anti-MRSA effect of the β -lactams, *D*-Ser and DAAO inhibitor combinations

Yu Jie, Hu Xin-xin, Nie Tong-ying, Wang Xiu-kun, Li Xue, You Xue-fu, and Li Cong-ran
(Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy
of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract Objective To study the activity of β -lactams, *D*-Ser and *D*-amino acid oxidase inhibitor combinations in treating infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** The effect of *D*-amino acid oxidase inhibitor 5-chlorobenzo[*d*]isoxazol-3-ol(CBIO) on bacterial growth and biofilm was assessed *in vitro* by broth micro-dilution method and crystal violet staining method. The mouse systemic infection model and rat leg infection model were established, and the survival rates and tissue homogenate bacterial counts were used to evaluate the antibacterial effect of the three-drug combinations. The safety of CBIO in mice was evaluated by subcutaneous administration. **Results** *In vitro* MIC determination demonstrated that CBIO has no bacteriostatic effect, but it obviously antagonized the antibacterial activities of oxacillin and meropenem compounds when combined with them. *D*-Ser and CBIO alone have weak effects on biofilm formation and disassembly by MRSA N315. When combined with antibiotics, it can significantly increase the inhibition and clearance rates of biofilms. Within 5 days after subcutaneous administration of 30mg/kg CBIO to healthy mice, the mice survived well ($n=5$). Compared with

收稿日期: 2021-01-08

基金项目: “十三五”国家科技重大专项(No. 2019ZX09721001); 国家自然科学基金资助项目(No. 81803413)

作者简介: 于洁, 女, 生于1997年, 在读硕士研究生, 专业方向为抗感染药物药理学及细菌耐药机制, E-mail: yujie926_pumc@163.com

*通讯作者, E-mail: congranli@imb.pumc.edu.cn

single antibiotic administrations and antibiotic-*D*-Ser combinations, the three-drug (β -lactams, *D*-Ser and CBIO) combinations can improve the survival rate of mice and reduce the bacterial counts in the rat legs to some extent.

Conclusion The β -lactams, *D*-Ser and CBIO combinations have good anti-MRSA infection effect *in vivo*, and CBIO has good safety in mice, but CBIO will have antagonistic effect to some extent with antibiotics. A certain concentration of CBIO combined with β -lactam antibiotics and *D*-Ser may provide a new choice for the clinical drugs of MRSA infections.

Key words Combination; MRSA; *D*-Ser; *D*-amino acid oxidase inhibitor

抗生素耐药是一个日益严重的公共卫生问题^[1],特别是在一些发展中国家^[2]。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)是菌血症、肺炎和心内膜炎等医院获得性感染的主要原因,随着耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)被发现,治疗这些感染变得更加棘手^[3],MRSA成为世界范围内与感染相关的发病和死亡的主要原因^[4]。如今,临床治疗MRSA感染的效果相对较差,可用的药物也越来越少。抗生素与其他药物联用治疗MRSA感染是一个可行的替代方案,联用可以改善抗生素穿透性差、杀菌速度慢和易耐药等缺点^[5]。本实验室的前期研究^[6]发现β-内酰胺类抗生素和*D*型丝氨酸(*D*-Serine, *D*-Ser)在体内外对MRSA有协同抗菌活性,在体外加入20mmol/L *D*-Ser后β-内酰胺类抗生素对MRSA的MIC值最高可下降128倍,恢复至敏感水平;在体内苯唑西林和*D*-Ser、美罗培南和*D*-Ser联用可以显著提高全身感染小鼠的存活率,降低腿部感染小鼠的组织持菌量。但是,大部分的*D*-Ser在一些哺乳动物(如大鼠)体内被肾脏周围产生的*D*-氨基酸氧化酶(*D*-amino acid oxidase, DAAO)代谢^[7],生成具有细胞毒性的过氧化氢^[8](图1),从而引起肾近端小管坏死,导致糖尿、蛋白尿及多尿的症状^[7]。有文献指出利用MTT法检测*D*-Ser与过氧化氢对人肾细胞HEK293的毒性,结果显示二者皆有细胞毒性,当同时加入*D*-Ser和CBIO后毒性明显减弱,提示*D*-Ser在人体内可能会通过*D*-氨基酸氧化酶而产生毒性^[9]。5-氯苯并[*d*]异恶唑-3-醇(5-chlorobenzo[*d*]isoxazol-3-ol, CBIO)是一种作用

较强的DAAO抑制剂(IC₅₀=188nmol/L)^[10](图1a),因此将*D*-Ser与CBIO联用被认为是一种降低*D*-Ser给药剂量、从而消除肾毒性的有效方法^[11],与单独给予*D*-Ser相比,同时给予CBIO和*D*-Ser可显著提高大鼠血浆中*D*-Ser的水平^[10]。因此,在β-内酰胺类抗生素(如苯唑西林和美罗培南)、*D*-Ser两药联用基础上加入CBIO预期可在体内可提高*D*-Ser的生物利用度、降低由于*D*-Ser氧化而产生的肾毒性,并有效治疗MRSA感染。据此,本研究从体内外抗菌活性、抗生物被膜活性、安全性等方面考察抗生素、*D*-Ser和CBIO三药联用的抗MRSA作用,以期应对细菌耐药提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及标准品

MRSA N315、MRSA 0850来自中国医学科学院病原微生物保藏中心(CAMS-CCPM-AP);苯唑西林(oxacillin, OXA)标准品和美罗培南(meropenem, MEM)标准品均购自中国食品药品检定研究院。药物母液均用灭菌过后的去离子水配制。

1.2 实验动物

体重17~19g的雌性ICR小鼠(SPF级)和170~190g的雌性SD大鼠(SPF级)均来自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验前,实验动物在中国医学科学院医药生物技术研究所感染动物房内适应1d,全程控制温度(22℃±3℃)及湿度(30%~60%)。

1.3 试剂及耗材

D-Ser(25g)购自美国Sigma公司;CBIO(1g)购自上海皓鸿生物医药科技有限公司;注射用环磷酰胺(200mg)购自江苏恒瑞医药股份有限公司;氢氧化钠、浓盐酸、氯化钠均购自北京化工厂;无菌纱布购自稳健医疗(黄冈)有限公司。*D*-Ser用生理盐水(0.85%氯化钠)溶解,CBIO用浓盐酸溶解后用1mol/L NaOH调节pH至7.3,其余化合物均用已灭菌的去离子水配制。

1.4 体外抗菌活性测定

采用美国临床和实验室标准化协会(CLSI

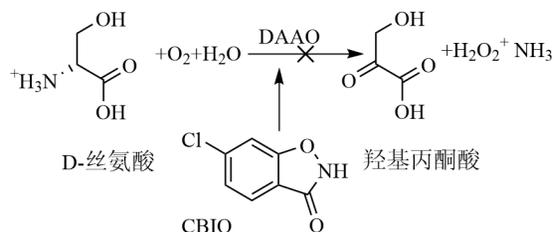


图1 DAAO催化*D*-Ser的氧化和CBIO对酶的抑制作用

Fig. 1 DAAO-catalyzed oxidation of *D*-serine and inhibition of enzyme by CBIO

M100, 28^h)规定的肉汤微量稀释法^[12]测定最小抑菌浓度。所选药物组合及浓度见表1, 接种量约为 5×10^5 CFU/mL, 37℃下孵育16~18h, 肉眼观察无细菌生长的最低药物浓度即为药物的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.5 药物对生物被膜的影响

1.5.1 抑制生物被膜形成的作用

本实验选择MRSA N315作为实验菌株, 挑取单菌落于TSB液体培养基37℃、220r/min培养4h, 稀释菌液至约 1×10^8 CFU/mL。以适宜生物被膜生长的TSB(含3%NaCl+1%Glu)培养基为溶剂溶解药物, OXA的终浓度分别为32和16μg/mL, MEM的终浓度分别为0.5和0.25μg/mL, D-Ser的终浓度为10mmol/L, CBIO的终浓度为10mmol/L。将药物或药物组合加入96孔板中(每组重复6个孔), 向每孔内加入2μL稀释后的菌液, 菌液接种的终浓度约为 1×10^6 CFU/mL, 每孔总体积均为200μL, 37℃孵育24h, 同时设置阴性对照组(加入等量的培养基和菌液, 不加药)。用结晶紫染色法测定生物被膜, 通过595nm处的吸光度(A_{595})来反映生物被膜形成情况^[13]。药物对于生物被膜形成的抑制率计算公式: 抑制率= $(A_{595\text{对照组}} - A_{595\text{给药组}}) / A_{595\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.5.2 促进生物被膜解离的作用

表1 不同药物或药物组合对MRSA N315的MIC值

Tab. 1 MICs of different drugs or combinations against MRSA N315

药物组合	最小抑菌浓度/(μg/mL)
OXA	128
OXA+10 mmol/L D-Ser	16
OXA+100mmol/L D-Ser	≤0.125
OXA+5mmol/L CBIO	128
OXA+10mmol/L CBIO	>256
OXA+10mmol/L D-Ser+5mmol/L CBIO	64
OXA+10mmol/L D-Ser+10mmol/L CBIO	128
OXA+100mmol/L D-Ser+5mmol/L CBIO	0.25
OXA+100mmol/L D-Ser+10mmol/L CBIO	0.5
MEM	16
MEM+10 mmol/L D-Ser	4
MEM+100mmol/L D-Ser	≤0.125
MEM+5mmol/L CBIO	64
MEM+10 mmol/L CBIO	64
MEM+10 mmol/L D-Ser+5mmol/L CBIO	16
MEM+10 mmol/L D-Ser+10mmol/L CBIO	64
MEM+100mmol/L D-Ser+5mmol/L CBIO	0.5
MEM+100mmol/L D-Ser+10mmol/L CBIO	1

本实验选择MRSA N315作为实验菌株, 挑取单菌落于TSB液体培养基37℃、220r/min培养4h, 以适宜生物被膜生长的TSB(含3%NaCl+1%Glu)将菌液稀释至 1×10^6 CFU/mL, 吸取200μL菌液加入96孔板, 37℃孵育24h后小心去除孔内的菌液。用生理盐水将化合物稀释至不同浓度, 加入长有生物被膜的孔中(每组重复6个孔), 每孔总体积均为200μL, 37℃孵育24h, 同时设置阴性对照组(加入等量的培养基和菌液, 不加药)。实验中, OXA的终浓度分别为64和32μg/mL, MEM的终浓度分别为0.5和0.25μg/mL, D-Ser溶液的终浓度为10mmol/L, CBIO溶液的终浓度为10mmol/L。用结晶紫染色法测定生物被膜, 通过 A_{595} 值来反映生物被膜解离情况^[13]。药物对于生物被膜的清除率计算公式: 清除率= $(A_{595\text{对照组}} - A_{595\text{给药组}}) / A_{595\text{对照组}} \times 100\%$ (图2)。

1.6 小鼠全身感染及给药

本模型采用MRSA N315和MRSA 0850作为实验菌株, ICR小鼠腹腔注射0.5mL含有5%活性干酵母的菌液(100%最小致死剂量)感染, 感染后1、3和6h分别以皮下注射的方式给药0.2mL(5~10只/组), MRSA N315和MRSA 0850的感染量约为 $1 \sim 3 \times 10^6$ CFU/只。包含CBIO的给药组先给予CBIO, 30min后再注射其他药物, 记录5d内动物死亡情况, 计算存活率, 具体给药剂量见图3。

1.7 大鼠腿部感染及给药

本模型采用MRSA N315作为实验菌株, 感染前第四天(150mg/kg)和第一天(100mg/kg)分别以腹腔注射的方式给予大鼠环磷酰胺降低其免疫力; 感染当天按照体重随机分组, 每组6只, 大鼠腿部肌肉注射0.2mL菌液(感染量约为 $3 \sim 6 \times 10^5$ CFU/腿), 感染后1、6、12、24、30和36h以皮下注射的方式给予药物, 包含CBIO的给药组先给予CBIO, 30min后再注射其他药物, 给药组合及剂量见图4。其余步骤参考王青等^[6]使用的方法, 感染后72h处死大鼠, 无菌操作取大鼠腿部肌肉组织研磨计数。

1.8 药物安全性研究

5只ICR健康小鼠以皮下注射的方式一次性给予30mg/kg CBIO, 观察其72h内生存状况。

2 结果

2.1 药物对细菌生长的影响

通过在96孔板中加入含有CBIO及CBIO与其他药物混合后的培养液培养MRSA N315(12个技术重复)来

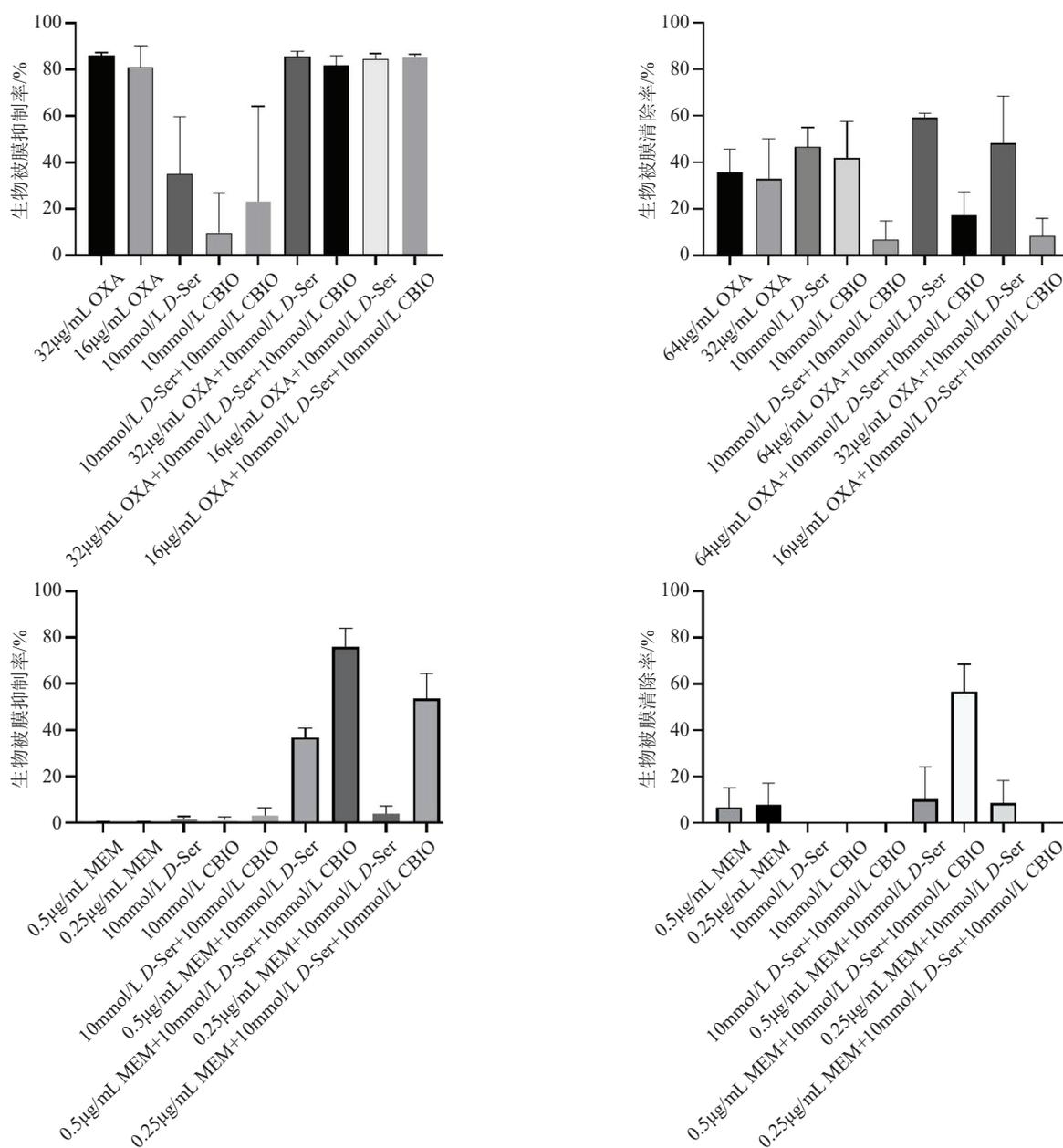


图2 药物或药物组合对生物被膜形成和解离的影响
 Fig. 2 Effect of drugs or drug combinations on biofilm formation and disassembly

探究药物单用或不同组合的抗菌作用。根据表1可知苯唑西林单用时对MRSA N315的MIC值为128μg/mL，加入10mmol/L D-Ser后MIC值下降至16μg/mL，加入100mmol/L D-Ser后MIC值(≤0.125μg/mL)大大降低，且远低于敏感水平(0.5μg/mL)。苯唑西林加入5mmol/L CBIO，MIC值与苯唑西林单用相同，但加入10mmol/L CBIO后MIC值上升至>256μg/mL。OXA和D-Ser组合中加入CBIO后相比原两药组合的MIC值有所上升，OXA+10mmol/L D-Ser加入5mmol/L CBIO后MIC值从16μg/mL上升至64μg/mL，加入10mmol/L CBIO后MIC值进一步上升至128μg/mL；

OXA+100mmol/L D-Ser加入5mmol/L CBIO后MIC值从≤0.125μg/mL上升至0.25μg/mL，加入10mmol/L CBIO后MIC值进一步上升至0.5μg/mL。美罗培南单用时对MRSA N315的MIC值为16μg/mL，加入10mmol/L和100mmol/L D-Ser后MIC值分别下降至4μg/mL和≤0.125μg/mL，在此基础上再加入CBIO后MIC值有所上升。MEM和5mmol/L或10mmol/L CBIO联用后MIC值上升至64μg/mL。上述结果提示CBIO对OXA和MEM的抗菌活性有一定的拮抗作用。单独加入100mmol/L D-Ser、10mmol/L CBIO、100mmol/L D-Ser和10mmol/L CBIO混合溶液后孔中

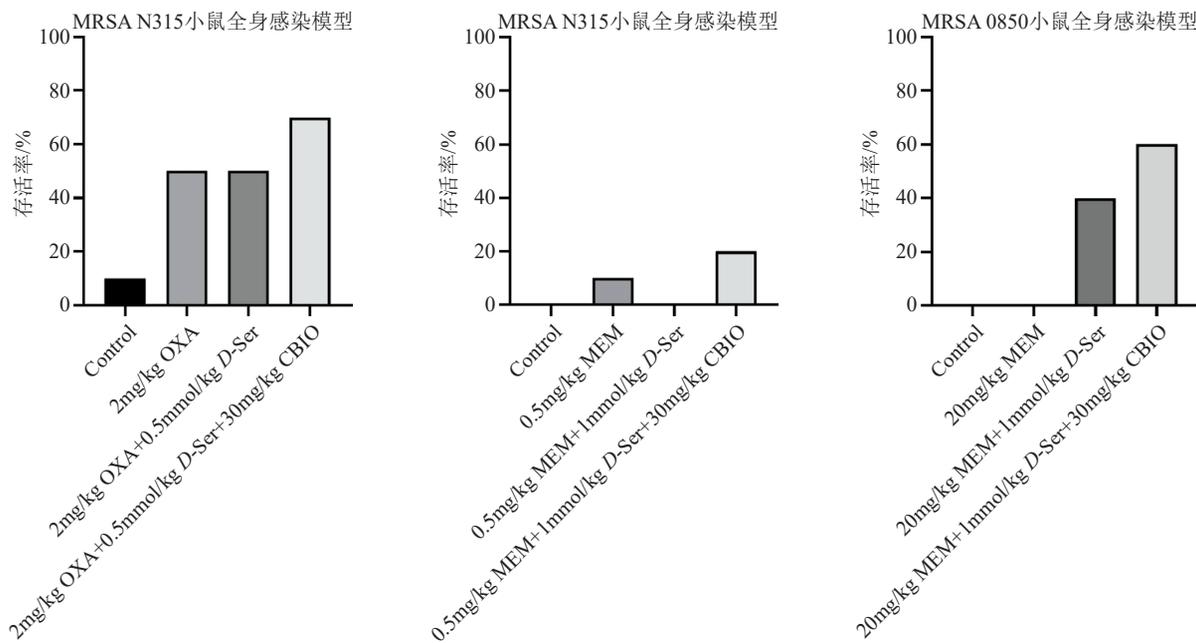


图3 MRSA感染小鼠经不同药物处理后5d内存活率

Fig 3 The survival rates of mice in systemic infection caused by MRSA during five days

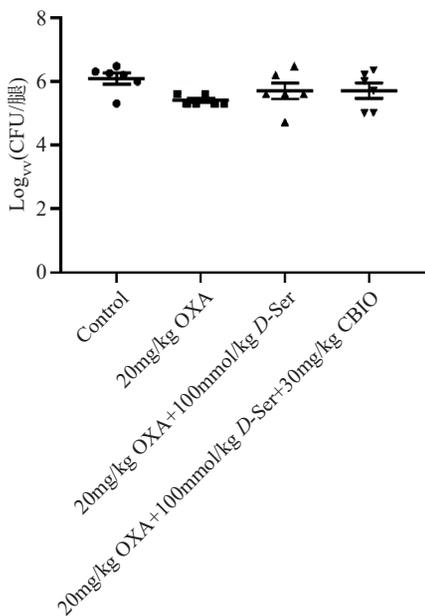


图4 OXA、D-Ser和CBIO联用治疗MRSA N315大鼠腿部感染(n=6)

Fig. 4 Combination of oxacillin, D-Ser and CBIO incurring rats neutropenic thigh infection caused by MRSA N315(n=6)

均有细菌生长且菌液浑浊程度与不加药对照孔一致。已知D-Ser至少达到500mmol/L时对MRSA N315才有抑菌作用^[13]，由此可见在本实验所用的剂量下，D-Ser和CBIO本身并没有杀菌或抑菌作用。

2.2 药物对生物被膜的影响

OXA和MEM等药物对MRSA N315所形成生物被膜的影响见图2，低于MIC水平的OXA(32μg/mL和16μg/mL)对MRSA N315生物被膜的抑制率大于

80%，与两药和三药联用的效果相当，说明亚抑制浓度的OXA具有很强的抑制生物被膜形成的作用。0.5μg/mL MEM、0.25μg/mL MEM对生物被膜形成几乎没有抑制作用，10mmol/L D-Ser、10mmol/L CBIO或10mmol/L D-Ser+10mmol/L CBIO联用对生物被膜生成的抑制作用不稳定，可表现无抑制活性或轻度抑制活性。MEM在加入了D-Ser后对生物被膜生成的抑制作用有所增强，MEM、D-Ser和CBIO联用时极大地提高了对生物被膜生成的抑制率，最高可提升至70%以上。64μg/mL和32μg/mL OXA对生物被膜有一定的清除作用，且与D-Ser联用后清除作用有所增强，加入CBIO后对已生成生物被膜的清除作用降低。0.5μg/mL MEM和0.25μg/mL MEM对MRSA N315已生成生物被膜的清除率较低，均在20%以下，10mmol/L D-Ser和10mmol/L CBIO对MRSA N315已生成生物被膜的清除能力不稳定，可表现为几乎没有清除能力到约40%的清除率。MEM在加入了D-Ser后对生物被膜的清除作用有所提升，D-Ser和CBIO与0.5μg/mL MEM联用显著提高了生物被膜的清除率，而与0.25μg/mL MEM联用则表现出清除率降低的作用。

2.3 小鼠全身感染

小鼠全身感染实验结果见图3，在小鼠全身感染MRSA N315模型中(每组10只)，OXA单用和OXA和D-Ser联用可将存活率从10%提升至50%，而OXA、D-Ser和CBIO三药联用可将小鼠存活率提升至70%；

MEM、*D*-Ser和CBIO三药联用可将存活率从0%提升至20%。在小鼠全身感染MRSA 0850的模型中(每组5只), MEM 20mg/kg没有明显的治疗作用, MEM和*D*-Ser联用可将小鼠存活率从0提升至40%, MEM、*D*-Ser和CBIO三药联用可将存活率提升至60%。在实验室前期的工作中, 2.5mg/kg OXA和1mmol/kg *D*-Ser联用时MRSA N315感染的小鼠存活率仅为25%。

2.4 大鼠腿部感染

大鼠腿部感染实验结果见图4, 在大鼠腿部肌肉感染MRSA N315模型中, 相比空白感染组(1.6×10^6 CFU/腿), OXA单用组(2.67×10^5 CFU/腿)、OXA和*D*-Ser两药联用组(9.75×10^5 CFU/腿)及OXA、*D*-Ser、CBIO三药联用组(9.17×10^5 CFU/腿)可轻度降低大鼠腿部组织匀浆菌落计数。

2.5 药物安全性实验

单独给予30mg/kg CBIO的小鼠在72h内生存状况良好, 进食饮水均正常; 延长观察时间至120h, 小鼠无异常反应, 说明实验所用的剂量在体内安全性良好。

3 讨论

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌是一种导致人类及一些牲畜感染的主要耐药病原体, 但MRSA目前对于大多数的β-内酰胺类及其他抗生素耐药, 这对目前和未来的治疗是一项巨大的挑战^[14]。前期研究发现*D*-Ser能恢复MRSA对β-内酰胺类抗生素的敏感性, 为MRSA引起的感染提供了新的治疗策略。*D*-Ser是一种治疗精神类疾病的有效药物, 但至今未广泛应用于临床, 原因在于达到有效的治疗需要高剂量的*D*-Ser^[15], 而机体中存在的*D*-氨基酸氧化酶不仅会降低*D*-Ser的浓度, 还会生成过氧化氢对机体产生肾毒性。*D*-氨基酸氧化酶抑制剂可通过抑制*D*-Ser的氧化代谢而提高*D*-Ser的体内浓度, 降低其肾毒性, 推进*D*-Ser的临床应用。CBIO是一种比较有效的*D*-氨基酸氧化酶抑制剂, 有文献报道在大鼠体内30mg/kg CBIO即可完全抑制500mg/kg *D*-Ser产生的肾毒性^[9], 故开展了*D*-Ser、β-内酰胺类抗生素和CBIO三药联用的抗MRSA活性研究。

研究发现, CBIO在体外单独使用或与其他药物联用对细菌的生长并无明显抑制作用, 加入CBIO后OXA对MRSA的MIC值有所升高, 提示CBIO可一定程度上拮抗OXA的抗菌作用。小鼠全身感染实验中, 加入CBIO后小鼠的存活率有显著提升, 而本实验在药物浓度略低的情况下生存率有所增高可能与

给药次数(前期实验给药两次, 本实验给药3次)、动物个体差异及操作人员有关; 前期实验中0.5mg/kg MEM和1mmol/kg *D*-Ser联用时MRSA N315感染的小鼠存活率为30%, 而本实验在相同条件下生存率为0, 可能与实验动物个体差异及操作人员不同有关。此外, 在实验过程中观察到三药联用组动物的死亡时间大多分布在24~72h, 其他组大多集中在0~48h, 说明三药联用有一定延缓死亡的作用; 在腿部感染的大鼠体内给予了CBIO后, 三药联用组大鼠腿部组织菌计数较两药联用组稍有下降, 但下降不明显。这些结果提示CBIO在体内通过抑制DAAO, 减少了*D*-Ser的代谢, 提升了*D*-Ser的血浆浓度, 从而增强了*D*-Ser的增敏作用。在前期多次大鼠腿部感染实验中三药联用组的结果相比两药联用组不显著甚至偏高, 很可能是由于CBIO与OXA的拮抗作用导致的, 在之后的研究中可以适当降低CBIO的剂量从而减弱与OXA的拮抗作用对实验结果的影响。对生物被膜作用的研究结果显示, CBIO与β-内酰胺类抗生素、*D*-Ser联用可显著增强其抑制MRSA生物被膜生成的作用, 但对已生成生物被膜解离的影响不稳定(MEM+*D*-Ser), 甚至拮抗OXA+*D*-Ser增加生物被膜解离率的作用。*D*-Ser、β-内酰胺类抗生素和CBIO三药联用或许有助于解决与MRSA产生大量生物被膜相关的感染, 例如心内膜炎、尿路感染等, 有待进一步评价和验证。

事实上, 对于DAAO酶是否是*D*-Ser产生肾毒性的唯一因素依然在研究当中。据报道, *D*-Ser产生肾毒性有种属差异, 在小鼠、豚鼠、兔子、狗等动物体内不产生毒性, 但这些动物自身有DAAO表达, 且其中一些动物的DAAO表达水平不比大鼠的表达水平低^[9]。DAAO在自然界分布广泛, 从微生物到哺乳动物的体内均有表达, 但不同物种间DAAO分布却有所不同, 例如小鼠体内DAAO只存在于肾脏, 而人类、猪和一些其他的哺乳动物体内DAAO在肾脏和肝脏均有表达^[16-17], DAAO的分布差异很可能是造成*D*-Ser肾毒性有种属差异的主要原因。还有文献指出在大鼠体内通过腹腔注射*D*-Ser比皮下注射产生的肾毒性更加剧烈^[9], 腹腔部位毛细血管丰富, 但易造成首过效应使药量降低, 所以采用皮下注射*D*-Ser并且同时给予CBIO可以最大限度的保证*D*-Ser不被氧化代谢, 但也可能导致CBIO加入后的作用不明显, 如大鼠腿部感染模型中, 虽然三药联用组较两药联用组菌

计数有所降低,但降低幅度小,没有显著性差异。此外,CBIO对抗菌药物可能存在的拮抗作用也是三药联用效果不明显的可能原因。有文献[18]建议给药前至少90min给予CBIO可更好地减少D-氨基酸被氧化,后续实验可考虑加长CBIO提前给药时间。

解决细菌耐药问题任重而道远,而新抗菌药物研发愈加困难,因此增敏剂与现有的抗生素联用就成为一种既有效又快捷的方法。 β -内酰胺类抗生素、D-Ser和DAAO抑制剂联用在体内治疗MRSA引起的感染具有良好的效果,加入CBIO后预期可抑制D-Ser由于剂量过大而产生的肾毒性,从而提升D-Ser的生物利用度,CBIO在体内安全性良好,这或许可以为解决细菌耐药问题供新策略。

参考文献

- [1] Antonanzas F, Lozano C, Torres C. Economic features of antibiotic resistance: the case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Pharmacoeconomics*, 2015, 33(4): 285-325.
- [2] Okwu M U, Olley M, Akpoka A O, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review[J]. *AIMS Microbiol*, 2019, 5(2): 117-137.
- [3] Ayala O D, Wakeman C A, Pence I J, et al. Drug-resistant *Staphylococcus aureus* strains reveal distinct biochemical features with Raman microspectroscopy[J]. *ACS Infect Dis*, 2018, 4(8): 1197-1210.
- [4] Bassetti M, Carnelutti A, Castaldo N, et al. Important new therapies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2019, 20(18): 2317-2334.
- [5] Davis J S, Van Hal S, Tong S Y. Combination antibiotic treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36(1): 3-16.
- [6] Wang Q, Lv Y, Pang J, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of D-serine in combination with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(3): 496-504.
- [7] Masao M, Tadashi O, Noriyuki K, et al. D-Amino-acid oxidase is involved in D-serine-induced nephrotoxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18(11): 1678-1682.
- [8] Krug A W, Volker K, Dantzer W H, et al. Why is D-serine nephrotoxic and alpha-aminoisobutyric acid protective?[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(1): F382-390.
- [9] 陈忠炜. D-型丝氨酸肾脏毒性研究[D]. 上海交通大学, 2013.
- [10] Ferraris D, Duvall B, Ko Y S, et al. Synthesis and biological evaluation of D-amino acid oxidase inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(12): 3357-3359.
- [11] Alt J, Rojas C, Wozniak K, et al. Development of a high-throughput method for the determination of pharmacological levels of plasma D-serine[J]. *Anal Biochem*, 2011, 419(2): 106-109.
- [12] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[S]. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [13] 王青. D-氨基酸与 β -内酰胺类抗生素联用抗MRSA作用机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [14] Yang F, Zhang S, Shang X, et al. Short communication: N-Acetylcysteine-mediated augmentation of β -lactam antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases [J]. *J Dairy Sci*, 2019, 102(8): 6920-6922.
- [15] Rojas C, Alt J, Ator N A, et al. D-Amino-acid oxidase inhibition increases D-serine plasma levels in mouse but not in monkey or dog[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41(6): 1610-1619.
- [16] Smith S M, Uslander J M, Hutson P H. The therapeutic potential of D-amino acid oxidase (DAAO) Inhibitors[J]. *Open Med Chem J*, 2010, 4: 3-9.
- [17] Khoronenkova S V, Tishkov V I. D-Amino acid oxidase: Physiological role and applications [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, 73(13): 1511-1518.
- [18] Sershen H, Hashim A, Dunlop D S, et al. Modulating NMDA receptor function with D-Amino acid oxidase inhibitors: Understanding functional activity in PCP-treated mouse model[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(1-2): 398-408.