

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210405001

杨越, 孙昊宇, 龙茜, 等. 氨基糖苷类抗生素与抗菌剂不同毒性比混合对大肠杆菌的联合效应研究[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(2): 118-128

Yang Y, Sun H Y, Long X, et al. Combined toxicity of aminoglycosides and antimicrobials with different ratios on *Escherichia coli* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(2): 118-128 (in Chinese)

氨基糖苷类抗生素与抗菌剂不同毒性比混合对大肠杆菌的联合效应研究

杨越¹, 孙昊宇², 龙茜², 张跃恒², 林志芬², 印春生^{1,*}

1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306

2. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092

收稿日期: 2021-04-05 录用日期: 2021-06-18

摘要: 抗菌剂的长期滥用导致细菌耐药性问题不断加剧, 对人类健康以及生态环境造成了巨大威胁。由于氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides, AGs)在临床上应用的广泛性, 其与传统抗菌剂和新型抗菌剂在环境中的联合暴露均存在潜在风险。此外, 抗菌剂结构、作用机制以及其在混合体系中的占比, 都能够影响其与 AGs 的联合毒性效应。因此, 有必要研究 AGs 与传统抗菌剂和新型抗菌剂以不同毒性比混合的联合毒性效应。本文以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)为模式生物, 以磺胺类(磺胺甲恶唑, SMX)、四环素类(盐酸金霉素, CTC)、大环内酯类(红霉素, ERY)、糖肽类(盐酸万古霉素, VA)和 β -内酰胺类(氨苄青霉素, AMP)作为传统抗菌剂的代表, 以唑啉类(甲基异噻唑啉酮, MIT)、表面活性剂类(十二烷基三甲基溴化铵, DTAB)和群体感应抑制剂类(3,4-溴 2(5H)呋喃酮, DFR)作为新型抗菌剂的代表, 测定 AGs 与抗菌剂在等毒性比时的联合毒性效应。结果表明, AGs 与传统抗菌剂中的 CTC 和 VA, 以及新型抗菌剂中的 DTAB 和 DFR 呈现拮抗的联合毒性作用; AGs 与传统抗菌剂中的 SMX、ERY 和 AMP, 以及新型抗菌剂中的 MIT 呈现协同的联合毒性作用。此外, 还测试了 AGs 与产生协同效果的抗菌剂(SMX、ERY、AMP 和 MIT)在毒性比为 1:5 和 5:1 下的联合毒性效应。结果显示, AGs 与 SMX、AMP 和 MIT 在不同毒性比下的联合毒性效应均呈现协同作用, 且 AGs 与抗菌剂的毒性比为 1:5 时的协同效果最好, 联合暴露的环境风险最大。我们推测, 当 AGs 和能够与其产生协同作用的抗菌剂混合暴露时, 混合体系中这种抗菌剂相对于 AGs 比例的增加, 可能使得 AGs 更容易进入细胞并增强 AGs 对细菌的毒性作用。本研究能够为今后探索 AGs 与抗菌剂联合暴露的环境风险评估提供参考。

关键词: 氨基糖苷类抗生素; 传统抗菌剂; 新型抗菌剂; 大肠杆菌; 联合毒性效应

文章编号: 1673-5897(2022)2-118-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Combined Toxicity of Aminoglycosides and Antimicrobials with Different Ratios on *Escherichia coli*

Yang Yue¹, Sun Haoyu², Long Xi², Zhang Yueheng², Lin Zhifen², Yin Chunsheng^{1,*}

1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China

Received 5 April 2021 accepted 18 June 2021

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22006116); 博士后创新人才支持计划资助项目(BX20190247); 中国博士后科学基金资助项目(2019M661624); 上海“超级博士后”激励计划资助项目(2019194)

第一作者: 杨越(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 2502243073@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: csyin@shou.edu.cn

Abstract: The chronically abuse of antibacterial agents has led to a growing problem of bacterial resistance, posing a huge threat to human health and ecological environment. Due to the widely clinical application of aminoglycosides (AGs), the environmental exposure of AGs with traditional antibacterial agents or new antibacterial agents may trigger potential risks on organisms. Furthermore, the structure, the toxic action, and the toxicity ratio of these traditional or new antibacterial agents could all influence their combined effects with AGs. Therefore, it is necessary to investigate the combined toxicity of AGs with traditional or new antibacterial agents at different toxicity ratios. In this study, *Escherichia coli* (*E. coli*) was set as the model organism. While sulfonamides (sulfamethoxazole, SMX), tetracyclines (chlorotetracycline hydrochloride, CTC), macrolides (erythromycin, ERY), glycopeptides (vancomycin hydrochloride, VA), and β -lactams (ampicillin, AMP) are representatives of traditional antibacterial agents, azolines (methylisothiazolinone, MIT), surfactants (dodecyl trimethyl ammonium bromide, DTAB) and quorum sensing inhibitors (3,4-dibromo-2-hydroxy-2H-furan-5-one, DFR) are representatives of new antibacterial agents. The combined toxicity of AGs and these agents were tested at equal toxicity ratios. The results showed that AGs exhibited an antagonistic effect with CTC or VA (traditional antibacterial agents), and DTAB or DFR (new antibacterial agents). AGs induced a synergistic effect with SMX, ERY and AMP (traditional antibacterial agents). Meanwhile, there was synergism between AGs and MIT (new antibacterial agents). Because SMX, ERY, AMP and MIT had synergistic effects with AGs on *E. coli* at 1:1 toxicity ratio, these agents were chosen to investigate their combined toxicity with AGs at a toxicity ratio of 1:5 and 5:1. The results showed that the combined toxicity of AGs with these agents were all synergism at test toxicity ratios. In addition, when the toxicity ratio of AGs with the agents were 1:5, there exhibited the greatest synergistic effects of the mixtures, indicating the greatest environmental risk. Therefore, it could be speculated that when AGs are exposed with the antibacterial agent that can induce synergistic effects with AGs, the increase of the ratio of this agent in the mixture may make AGs enter cells more easily to enhance their toxic effect on bacteria. This study can provide a reference for future exploring the environmental risk assessment of the combined exposure of AGs and antibacterial agents.

Keywords: aminoglycosides; traditional antibacterial agents; new antibacterial agents; *Escherichia coli*; combined toxicity

抗菌剂是一类通过抑制病原微生物生长或代谢来治疗感染性疾病的化合物总称^[1]。由于抗菌剂具有广谱抗菌性和应用安全性等特点,被广泛应用于医疗业、农业以及畜牧业等行业^[2]。然而,抗菌剂的长期滥用导致细菌耐药性问题不断加剧,使抗菌剂的抑菌效果不断降低^[3],可能对人类健康以及生态系统造成严重影响。面对细菌耐药性的威胁,有研究人员认为将不同抗菌剂联合使用或许是控制细菌耐药性污染的重要途径之一^[4]。抗菌剂的联合使用会导致抗菌剂可能以混合污染物的形式进入生态环境中,它们之间的相互作用可能会对环境中的生物造成有别于单一抗菌剂的毒性威胁。因此,有必要探索抗菌剂的联合毒性效应,这可以为今后抗菌剂联用诱导的环境暴露风险评估提供参考。

氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides, AGs)是一类由单组分或多组分糖基取代的氨基环醇类化合物,具有高效、广谱的抗菌活性,已经成为治疗革兰

氏阴性病原体感染的重要选择之一^[5]。随着全球抗生素耐药性问题不断恶化,AGs在临床实践中已变得越来越重要^[6]。基于其临床使用的不可替代性^[7],AGs与其他抗菌剂的联合使用成为了抗感染研究领域的热点之一^[4]。其中,可以与AGs联合使用的其他抗菌剂包括传统抗菌剂和新型抗菌剂。常见的传统抗菌剂可以分为磺胺类、四环素类、大环内酯类、糖肽类和 β -内酰胺类等^[8],它们在农业、畜牧业和医疗业等多个领域被广泛用于治疗多种细菌感染。新型抗菌剂则包括唑啉类、表面活性剂类和群体感应抑制剂类等类别,它们因不易产生耐药性等特点被逐渐应用于化工和食品行业,表现出较好的杀菌性能。这些联合使用的抗菌剂主要通过医用和农用这2个途径进入生态环境中,对微生物、水生生物和人类造成潜在危害^[9];同时,多种抗菌剂暴露在环境中会产生区别于单一抗菌剂的毒性效应。那么AGs与这些抗菌剂混合暴露在环境中又会存在怎

样的环境风险?

目前有许多研究报道了 AGs 与其他抗菌剂的联合效应,如 Giamarellou 等^[10]研究发现 AGs 和 β -内酰胺类药物对铜绿假单胞菌的联合效应表现为协同。此外,崔洁和李志光^[11]在探究甲氧苄啶与 AGs 对大肠杆菌的联合毒性时发现其混合暴露表现出相加的联合效应。这些研究结果表明 AGs 与抗菌剂的联合毒性效应可能与抗菌剂种类密切相关。此外,抗菌剂以不同毒性比(毒性比是指单一抗菌剂半数最大效应浓度(EC₅₀)的比例^[12])混合也可能会导致不同的联合毒性效应,并引起不同的环境风险。如 Tian 等^[13]研究氰基物质和醛类对发光菌的联合效应时发现,随着毒性比从等毒性比变为非等毒性比,混合物联合作用由协同作用变为相加作用。Liu 等^[14]研究了阿莫西林和螺旋霉素对铜绿微囊藻的联合效应时发现,毒性比从等毒性比变为非等毒性比,混合物联合作用从协同作用变为了拮抗作用。因此,有必要研究 AGs 与其他不同种类抗菌剂在不同毒性比下的联合效应,为评估 AGs 和其他抗菌剂不同比例混合暴露的环境风险提供依据。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)具有容易获取、操作简便以及应用安全等特点,被广泛应用于细菌生理学、病毒和遗传学研究。因此本文选择大肠杆菌作为模式生物,以磺胺类、四环素类、大环内酯类、糖肽类和 β -内酰胺类抗菌剂作为传统抗菌剂的代表,以唑啉类、表面活性剂类和群体感应抑制剂类作为新型抗菌剂的代表,将这些抗菌剂与 AGs 进行联合毒性实验,测定 AGs 与多种抗菌剂在不同比例情况下(以 1:1、1:5、5:1 这 3 种毒性比为代表)的联合毒性效应,并对它们的联合毒性机制进行初步探讨,旨在为研究 AGs 与不同抗菌剂混合暴露的环境风险评估提供支撑。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂与生物

测试化合物中 6 种 AGs(硫酸庆大霉素、硫酸链霉素、硫酸新霉素、妥布霉素、硫酸卡那霉素和异帕米星)、大环内酯类(红霉素)、糖肽类抗菌剂(盐酸万古霉素)、 β -内酰胺类抗菌剂(氨苄青霉素)、唑啉类抗菌剂(甲基异噻唑啉酮)以及表面活性剂类抗菌剂(十二烷基三甲基溴化铵),均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(中国)。磺胺类抗菌剂(磺胺甲恶唑)、四环素类抗菌剂(盐酸金霉素)以及群体感应抑制剂类抗菌剂(3,4-溴 2(5H)呋喃酮)均购自 Sigma-Aldrich

化学制品有限公司(美国)。测试抗菌剂纯度均为分析纯以上,其基本信息如表 1 所示。本实验中使用的模式生物为大肠杆菌 K-12 MG1655 (*Escherichia coli*, *E. coli*),购自 Biovector 生物科技有限公司(中国)。

1.2 毒性试验

1.2.1 单一毒性的测定方法

在毒性实验中,抗菌剂用不超过总体积 0.1% 的二甲基亚砜(DMSO)助溶。实验时用 1% 的 NaCl 溶液将经过 DMSO 助溶后的受试抗菌剂稀释成等对数梯度系列,将抗菌剂溶液加入 96 孔酶标板中,每孔包含 80 μ L 的受试抗菌剂(作为实验组)或 1% 的 NaCl 溶液(作为对照组)、80 μ L 的培养基和 40 μ L 调好的菌液。然后,将酶标板在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 22 h,用酶标仪(Multiskan GO, Thermo Fisher 公司,美国)测定波长 600 nm 处的光密度。根据公式(1)计算抗菌剂对 *E. coli* 的生长抑制率:

$$\text{Inhibition} = \frac{\text{OD}_{600,0} - \text{OD}_{600,i}}{\text{OD}_{600,0}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:OD_{600,0} 为 *E. coli* 在无染毒作用下对照组在 600 nm 处的 OD 平均值,OD_{600,i} 为测试抗菌剂作用下实验组在 600 nm 处的 OD 平均值。单一抗菌剂对 *E. coli* 抑制率的剂量-效应关系使用 Origin 软件(版本 2021, OriginLab, 美国)进行拟合,计算出抑制率为 50% 时对应的抗菌剂浓度,即为单一抗菌剂的 EC₅₀(mg·L⁻¹)。

1.2.2 联合毒性的测定方法

根据单一化合物的 EC₅₀,配制抗菌剂 A 与抗菌剂 B 在 1:1、1:5 和 5:1 毒性比的混合溶液,按照单一毒性测定方法测定系列混合溶液的联合毒性,计算出 EC_{50mix}(mg·L⁻¹)。然后,采用毒性单位(toxicity unit, TU)法来表征联合毒性效应,TU 值的计算如下式:

$$\text{TU} = \frac{C_A}{\text{EC}_{50A}} + \frac{C_B}{\text{EC}_{50B}} \quad (2)$$

式中:C_A、C_B 是混合体系产生 50% 抑制效应时抗菌剂 A、B 各自的浓度,EC_{50A} 和 EC_{50B} 是单一抗菌剂 A、B 分别作用产生 50% 抑制效应时的浓度。根据 Broderius 的联合毒性作用判别标准^[15],当 TU < 0.8 认为 2 组分间为协同作用;0.8 ≤ TU ≤ 1.2 认为 2 组分间为相加作用;TU > 1.2 认为 2 组分间为拮抗作用。

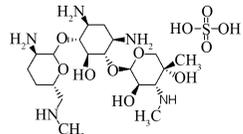
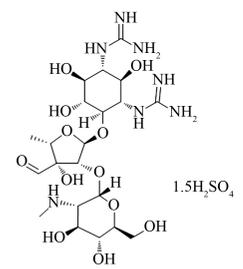
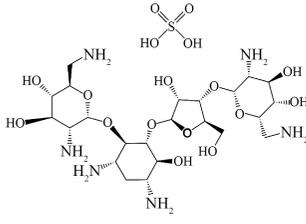
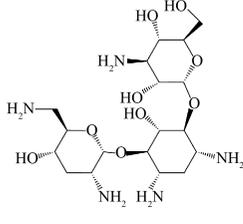
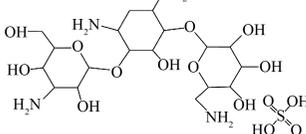
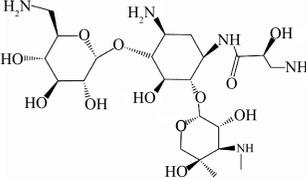
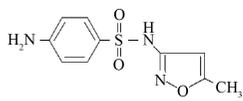
2 结果和讨论 (Results and discussion)

2.1 AGs 与测试抗菌剂对 *E. coli* 的单一毒性作用

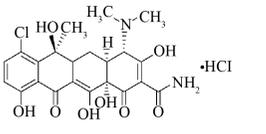
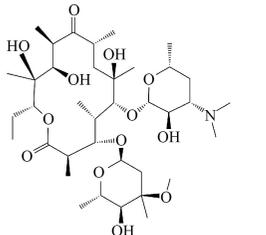
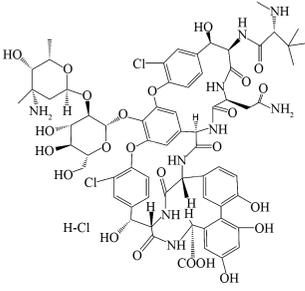
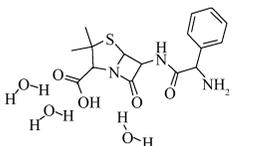
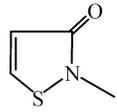
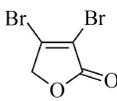
6 种 AGs 对 *E. coli* 的单一毒性数据如表 1 所示。可以看出,测试的 6 种 AGs 的毒性大小较为接

表1 试剂的理化参数和单一毒性数据

Table 1 The physicochemical parameters and the single toxicity data of the reagents

序号 No.	抗菌剂 Antibacterial agent	名称 Name	CAS	缩写 Abbreviation	相对分子量 Relative molecular mass	结构式 Structural formula	$-\log EC_{50}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	氨基糖苷类 Aminoglycosides	硫酸庆大霉素 Gentamicin sulfate	1405-41-0	GEN	575.67		6.26
2		硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	3810-74-0	STR	728.69		5.94
3		硫酸新霉素 Neomycin sulfate	1405-10-3	NEO	908.88		6.25
4		妥布霉素 Tobramycin	32986-56-4	TM	467.51		6.36
5		硫酸卡那霉素 Kanamycin sulfate	25389-94-0	KAN	582.58		5.71
6		异帕米星 Isepamicin	58152-03-7	ISE	569.60		5.93
7	磺胺类 Sulfonamides	磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	723-46-6	SMX	253.28		4.61

续表1

序号 No.	抗菌剂 Antibacterial agent	名称 Name	CAS	缩写 Abbreviation	相对分子量 Relative molecular mass	结构式 Structural formula	$-\log EC_{50}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
8	四环素类 Tetracyclines	盐酸金霉素 Chlorotetracycline hydrochloride	64-72-2	CTC	515.34		7.71
9	大环内酯类 Macrolides	红霉素 Erythromycin	114-07-8	ERY	733.93		4.86
10	糖肽类 Glycopeptides	盐酸万古霉素 Vancomycin hydrochloride	1404-93-9	VA	1 485.71		3.95
11	β -内酰胺类 β -lactams	氨苄青霉素 Ampicillin	7177-48-2	AMP	403.45		5.41
12	唑啉类 Azolines	甲基异噻唑啉酮 Methylisothiazolinone	2682-20-4	MIT	115.15		4.60
13	表面活性剂类 Surfactants	十二烷基三甲基溴化铵 Dodecyl trimethyl ammonium bromide	1119-94-4	DTAB	308.34	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_3 \text{ Br}^-$	3.88
14	群体感应 抑制剂类 Quorum sensing inhibitors	3,4-溴-2(5H)呋喃酮 3,4-dibromo-2-hydroxy- 2H-furan-5-one	149418-41-7	DFR	241.87		3.84

近, $-\log EC_{50}$ 范围为 $5.71 \sim 6.36 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。AGs 的基本结构单元由一个肌醇衍生物和至少一个氨基糖组成, 其余结构还包括数个自由羟基以及至少 2 个氨基^[6]。该结构决定着 AGs 的抑菌机制(图 1(a)): 首先, AGs 通过被动的、非能量依赖的过程与革兰氏阴性细菌外膜中的负电荷残基静电结合; 然后, AGs 通过外膜孔蛋白通道扩散并进入周质空间^[17]; 最后, AGs 通过能量依赖阶段 I (EDP-I) 和阶段 II (EDP-II) 进入细胞质并与核糖体的 30S 核糖体亚基的 16S rRNA 结合以造成蛋白质的错译从而起到抑菌作用^[18-19]。

基于表 1 中 8 种测试抗菌剂的 EC_{50} , 其毒性大小排序为: 四环素类抗菌剂 CTC > β -内酰胺类抗菌剂 AMP > 大环内酯类抗菌剂 ERY > 唑啉类抗菌剂 MIT > 磺胺类抗菌剂 SMX > 糖肽类抗菌剂 VA > 表面活性剂类抗菌剂 DTAB > 群体感应抑制剂类抗菌剂 DFR。其中毒性最大的四环素类抗菌剂 CTC 的 $-\log EC_{50}$ 为 $7.71 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 毒性最小的群体感应抑制剂类抗菌剂 DFR 的 $-\log EC_{50}$ 为 $3.83 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, 单一毒性结果还表明传统抗菌剂的毒性作用均显著强于新型抗菌剂。

所测试的 8 种传统和新型抗菌剂的毒性机制按照作用位点不同可以分为以下 4 类。

(1) 细胞壁或细胞膜抑制类(图 1(b)): 糖肽类抗菌剂 VA 通过与细胞壁肽聚糖的合成单体 D-Ala-D-Ala 特异性结合, 抑制细菌细胞壁肽聚糖的延伸, 导致细胞死亡^[20]。 β -内酰胺类抗菌剂 AMP 的作用靶

标是青霉素结合蛋白(PBPs), 其相互作用能够抑制参与黏肽交联反应的转肽酶活性进而导致肽聚糖合成受阻, 导致细胞死亡^[21]。表面活性剂 DTAB 因其分子中疏水的碳氢长链容易插入到细胞膜的磷脂双分子层中, 从而引起细胞膜损伤, 最终导致细胞死亡^[22]。

(2) DNA 抑制类(图 1(c)): 磺胺类抗菌剂 SMX 通过与对氨基苯甲酸(pABA)竞争性结合二氢叶酸合成酶(DHPS), 从而阻碍 DNA 复制, 造成细胞死亡^[23]。唑啉类抗菌剂 MIT 主要通过细菌体内 DNA 的碱基结合形成氢键, 从而破坏细胞内 DNA 的结构使之失去复制能力, 导致细胞死亡^[24]。

(3) 群体感应抑制类(图 1(d)): 群体感应抑制剂 DFR 通过与群体感应信号分子竞争性结合群体感应调控蛋白 SdiA 或 LsrR 蛋白, 干扰细菌的群体感应, 从而抑制细菌生长^[25]。

(4) 蛋白质合成抑制类(图 1(e)): 大环内酯类抗菌剂 ERY、四环素类抗菌剂 CTC 可以分别与细菌核糖体中的 50S 亚基和 30S 亚基结合, 从而抑制蛋白质合成, 最终导致细胞死亡^[26-27]。

2.2 AGs 和抗菌剂等毒性比与非等毒性比混合的联合效应

2.2.1 AGs 和传统抗菌剂等毒性比混合的联合效应

6 种 AGs 与 5 种传统抗菌剂的等毒性比联合毒性数据见表 2, 相应的 TU 分布如图 2(a) (竖虚线左侧) 所示。可以看出, AGs 与磺胺类抗菌剂 SMX、大环内酯类抗菌剂 ERY 和 β -内酰胺类抗菌剂 AMP 对

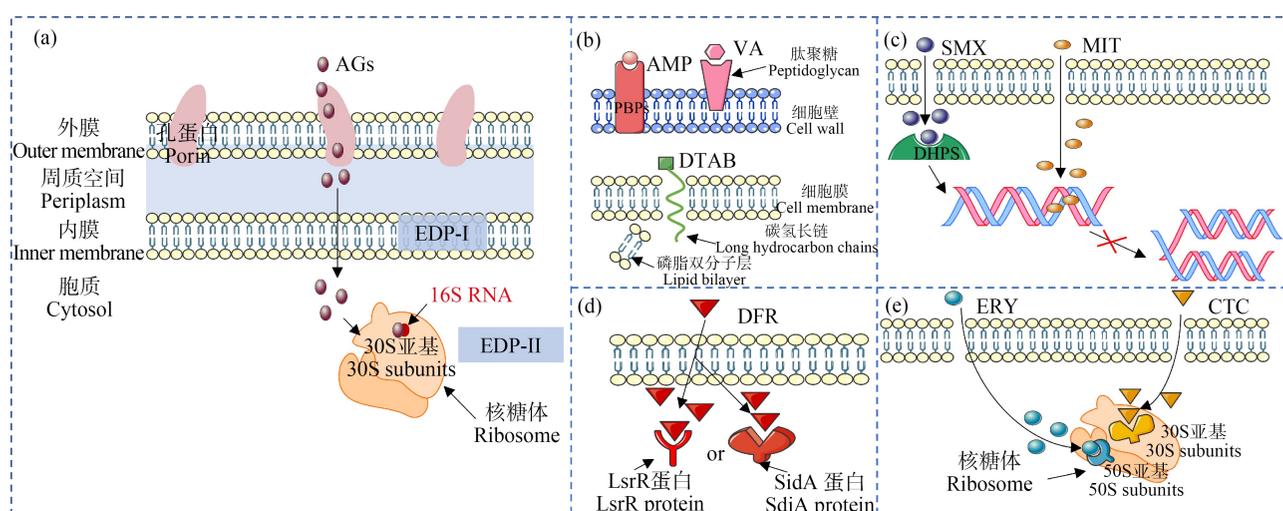


图 1 AGs 及 8 种测试抗菌剂的毒性机制图

注: AGs 为氨基糖苷类抗生素。

Fig. 1 Toxic mechanism of AGs and 8 tested antimicrobial agents

Note: AGs stands for aminoglycosides.

表2 AGs与测试抗菌剂等毒性比的联合毒性数据
Table 2 Combined toxicity data of AGs and tested antimicrobial agents in equal toxicity ratio

A	A : B	B													
		SMX	CTC	VA	ERY	AMP	DTAB	MIT	DFR						
		$-\log EC_{50mix}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TU	$-\log EC_{50mix}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TU	$-\log EC_{50mix}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TU	$-\log EC_{50mix}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TU	$-\log EC_{50mix}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TU				
GEN	1 : 1	0.59 (协同 Synergy)	1.69 (拮抗 Antagonism)	4.08 (拮抗 Antagonism)	1.48 (拮抗 Antagonism)	5.82 (协同 Synergy)	0.21 (协同 Synergy)	5.98 (协同 Synergy)	0.47 (协同 Synergy)	3.91 (拮抗 Antagonism)	1.57 (拮抗 Antagonism)	5.19 (协同 Synergy)	0.50 (协同 Synergy)	3.91 (拮抗 Antagonism)	1.70 (拮抗 Antagonism)
STR	1 : 1	0.59 (协同 Synergy)	1.26 (拮抗 Antagonism)	4.15 (拮抗 Antagonism)	1.24 (拮抗 Antagonism)	5.73 (协同 Synergy)	0.25 (协同 Synergy)	5.89 (协同 Synergy)	0.51 (协同 Synergy)	—* (拮抗 Antagonism)	—* (拮抗 Antagonism)	5.28 (协同 Synergy)	0.40 (协同 Synergy)	4.02 (拮抗 Antagonism)	1.32 (拮抗 Antagonism)
NEO	1 : 1	0.60 (协同 Synergy)	1.23 (拮抗 Antagonism)	4.15 (拮抗 Antagonism)	1.25 (拮抗 Antagonism)	5.05 (协同 Synergy)	0.25 (协同 Synergy)	5.92 (协同 Synergy)	0.54 (协同 Synergy)	—* (拮抗 Antagonism)	—* (拮抗 Antagonism)	5.27 (协同 Synergy)	0.41 (协同 Synergy)	3.96 (拮抗 Antagonism)	1.50 (拮抗 Antagonism)
TM	1 : 1	0.53 (协同 Synergy)	1.32 (拮抗 Antagonism)	4.11 (拮抗 Antagonism)	1.37 (拮抗 Antagonism)	4.97 (协同 Synergy)	0.50 (协同 Synergy)	5.95 (协同 Synergy)	0.52 (协同 Synergy)	4 (拮抗 Antagonism)	1.51 (拮抗 Antagonism)	5.26 (协同 Synergy)	0.43 (协同 Synergy)	3.99 (拮抗 Antagonism)	1.39 (拮抗 Antagonism)
KAN	1 : 1	0.52 (协同 Synergy)	1.51 (拮抗 Antagonism)	4.13 (拮抗 Antagonism)	1.29 (拮抗 Antagonism)	5.58 (协同 Synergy)	0.33 (协同 Synergy)	5.79 (协同 Synergy)	0.56 (协同 Synergy)	4 (拮抗 Antagonism)	1.49 (拮抗 Antagonism)	5.3 (协同 Synergy)	0.37 (协同 Synergy)	4.03 (拮抗 Antagonism)	1.26 (拮抗 Antagonism)
ISE	1 : 1	0.52 (协同 Synergy)	1.58 (拮抗 Antagonism)	4.07 (拮抗 Antagonism)	1.49 (拮抗 Antagonism)	5.79 (协同 Synergy)	0.22 (协同 Synergy)	5.85 (协同 Synergy)	0.56 (协同 Synergy)	3.91 (拮抗 Antagonism)	1.57 (拮抗 Antagonism)	5.27 (协同 Synergy)	0.41 (协同 Synergy)	3.92 (拮抗 Antagonism)	1.65 (拮抗 Antagonism)

注: * STR、NEO与DTAB不互溶,故没有相应毒性数据。

Note: * STR, NEO and DTAB are not mutually soluble, so there is no corresponding toxicity data.

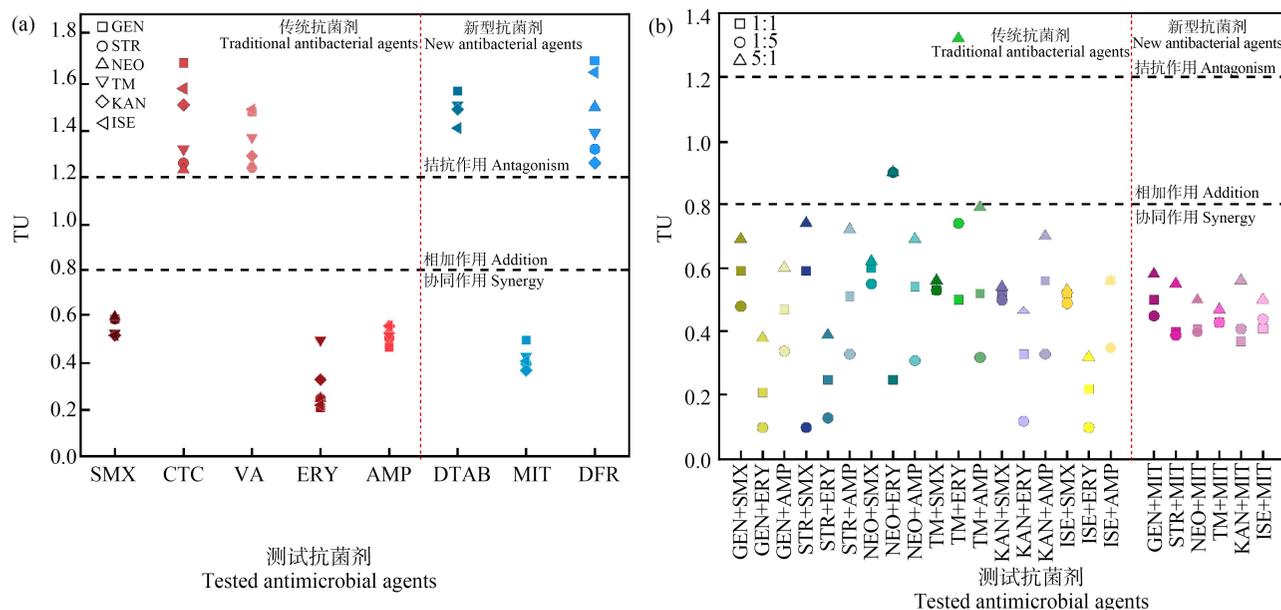


图 2 AGs 与测试抗菌剂的 TU 值

注:(a) 等毒性比混合;(b) 非等毒性比混合。

Fig. 2 TU values for AGs and tested antimicrobial agents

Note: (a) The equal toxicity ratio mixing; (b) The non-equal toxicity ratio mixing.

E. coli 联合作用的 TU 值均<0.8,其联合毒性效应均呈现协同作用。基于它们的单一毒性作用机制,我们推测,AGs 作用在核糖体的 30S 亚基抑制蛋白质合成,而 SMX 通过与二氢叶酸合成酶结合抑制 DNA 合成,二者共同作用加速了细菌的死亡过程;ERY 能够作用于核糖体的 50S 亚基上,其与 AGs 具有抑制蛋白质合成的通路一致性;AMP 作用于青霉素结合蛋白(PBPs)上造成细胞壁破裂,能够促进 AGs 渗入胞内发挥毒性作用。因此,AGs 与 SMX、ERY 和 AMP 的联合毒性效应产生协同作用。

AGs 与四环素类抗菌剂 CTC 和糖肽类抗菌剂 VA 对 *E. coli* 联合作用的 TU 值均>1.2,其联合毒性效应呈现拮抗作用。基于它们的单一毒性作用机制,我们推断,CTC 作用于核糖体 30S 亚基上对 *E. coli* 产生抑制作用,其与 AGs 具有相同的靶位点产生了特异性竞争;VA 不能穿透革兰氏阴性菌外膜,在进入细胞时将细胞膜上的孔蛋白堵塞,可能阻止 AGs 进入细胞^[28]。因此,AGs 与 CTC 和 VA 的联合毒性效应呈现拮抗作用。

2.2.2 AGs 和新型抗菌剂等毒性比的联合效应

6 种 AGs 与 3 种新型抗菌剂的等毒性比联合毒性数据见表 2,相应的 TU 分布如图 2(a) (竖虚线右侧)所示。可以看出,AGs 与唑啉类抗菌剂 MIT 对

E. coli 联合作用的 TU 值均<0.8,其联合毒性效应呈现协同作用。基于它们的单一毒性作用机制,我们推测,AGs 作用在核糖体的 30S 亚基时,抑制细菌蛋白质合成,而 MIT 通过与细菌体内 DNA 的碱基结合形成氢键破坏细胞内 DNA 的结构,二者共同作用能够协同抑制细菌的生长。因此,AGs 与 MIT 的联合毒性呈现协同作用。

AGs 与表面活性类抗菌剂 DTAB 和群体感应抑制剂类抗菌剂 DFR 对 *E. coli* 的联合毒性效应呈现拮抗作用。基于它们的单一毒性作用机制,我们推断,DTAB 疏水的碳氢长链插入到细胞膜的磷脂双分子层时,能够阻止 AGs 进入细胞产生毒性作用;AGs 通过抑制蛋白质合成使群体感应调控蛋白减少,降低 DFR 与群体感应蛋白(SidA 或 LsrR)相互作用。因此,AGs 与 DTAB 和 DFR 的联合毒性呈现拮抗作用。

基于上述研究结果,可以看出 AGs 与传统抗菌剂中的四环素抗菌剂 CTC、糖肽类抗菌剂 VA 以及新型抗菌剂中的表面活性类抗菌剂 DTAB 和群体感应抑制剂类抗菌剂 DFR 在等毒性比下呈现拮抗作用,说明这些产生拮抗作用的混合物暴露在环境中能够降低单一抗菌剂的毒性作用,可能降低单一抗菌剂的环境风险。

AGs 与传统抗菌剂中的磺胺类抗菌剂 SMX、大环内酯类抗菌剂 ERY 和 β -内酰胺类抗菌剂 AMP 以及与新型抗菌剂中的唑啉类抗菌剂 MIT 在等毒性比混合下均呈现协同作用,说明当 AGs 与这些抗菌剂混合暴露在环境中时,其暴露风险大于单一抗菌剂的环境暴露风险。那么 AGs 与产生这些抗菌剂在非等毒性比作用下还可以产生协同作用吗? 这些问题还有待进一步讨论。

2.2.3 AGs 与传统抗菌剂非等毒性比混合的联合效应

AGs 与磺胺类抗菌剂 SMX、大环内酯类抗菌剂 ERY 和 β -内酰胺类抗菌剂 AMP 在 1:5 和 5:1 毒性比的实验结果如表 3 所示,相应的 TU 分布如图 2(b) (竖虚线左侧)所示,由表 3 可知,AGs 与 SMX 和 AMP 对 *E. coli* 非等毒性比的联合毒性效应均呈现协同作用。AGs 与 ERY 的结果中,硫酸新霉素(NEO)与 ERY 在 1:5 和 5:1 毒性比混合时呈现相加作用,以及

妥布霉素(TM)与 ERY 在 1:5 毒性比混合作用呈现拮抗作用,其余情况下联合毒性效应均为协同作用。此外,根据 TU 值的大小(TU 值越小表明协同效果越强),可以看出毒性比的改变会影响协同效果,从表 3 和图 2(b) (竖虚线左侧)可以看出,AGs 与 SMX、ERY 和 AMP 在毒性比 1:5 时较毒性比 1:1 和 5:1 时呈现更好的协同作用,可能产生更大的环境暴露风险。

2.2.4 AGs 与新型抗菌剂非等毒性比的联合效应

AGs 与唑啉类抗菌剂 MIT 在 1:5 和 5:1 毒性比的实验结果如表 3 所示,相应的 TU 分布如图 2 (b) (竖虚线右侧)所示,由表 3 可知,AGs 与 MIT 对 *E. coli* 的非等毒性比联合毒性效应均呈现协同作用。此外,根据 TU 值的大小,可以看出毒性比的改变会影响协同效果,由表 3 和图 2(b) (竖虚线右侧)可知,AGs 与 MIT 在毒性比 1:5 时较毒性比 1:1 和 5:1 时呈现更好的协同作用,可能产生更大的环境暴露风险。

表 3 AGs 与测试抗菌剂非等毒性比的联合毒性数据

Table 3 Combined toxicity data of AGs and tested antimicrobial agents in non-equal toxicity ratio

A	A : B	B							
		SMX		ERY		AMP		MIT	
		$-\log EC_{50mix}$ /(mol·L ⁻¹)	TU	$-\log EC_{50mix}$ /(mol·L ⁻¹)	TU	$-\log EC_{50mix}$ /(mol·L ⁻¹)	TU	$-\log EC_{50mix}$ /(mol·L ⁻¹)	TU
GEN	1 : 5	5.00	0.48(协同 Synergy)	5.95	0.10(协同 Synergy)	5.95	0.34(协同 Synergy)	5.03	0.45(协同 Synergy)
	5 : 1	5.51	0.69(协同 Synergy)	5.98	0.38(协同 Synergy)	6.18	0.60(协同 Synergy)	5.57	0.58(协同 Synergy)
STR	1 : 5	5.69	0.10(协同 Synergy)	5.81	0.13(协同 Synergy)	5.95	0.33(协同 Synergy)	5.09	0.39(协同 Synergy)
	5 : 1	5.43	0.74(协同 Synergy)	5.90	0.39(协同 Synergy)	5.93	0.72(协同 Synergy)	5.55	0.55(协同 Synergy)
NEO	1 : 5	4.95	0.55(协同 Synergy)	4.98	0.90(相加 Addition)	5.98	0.31(协同 Synergy)	5.07	0.40(协同 Synergy)
	5 : 1	5.55	0.62(协同 Synergy)	5.60	0.90(相加 Addition)	6.11	0.69(协同 Synergy)	5.63	0.50(协同 Synergy)
TM	1 : 5	4.96	0.53(协同 Synergy)	5.07	0.74(协同 Synergy)	5.98	0.32(协同 Synergy)	5.04	0.43(协同 Synergy)
	5 : 1	5.60	0.56(协同 Synergy)	5.45	1.32(拮抗 Antagonism)	6.10	0.79(协同 Synergy)	5.67	0.47(协同 Synergy)
KAN	1 : 5	4.99	0.50(协同 Synergy)	5.85	0.12(协同 Synergy)	5.94	0.33(协同 Synergy)	5.06	0.41(协同 Synergy)
	5 : 1	5.51	0.54(协同 Synergy)	5.73	0.47(协同 Synergy)	5.80	0.70(协同 Synergy)	5.49	0.56(协同 Synergy)
ISE	1 : 5	4.99	0.49(协同 Synergy)	5.92	0.10(协同 Synergy)	5.92	0.35(协同 Synergy)	5.03	0.44(协同 Synergy)
	5 : 1	5.57	0.53(协同 Synergy)	5.98	0.32(协同 Synergy)	6.04	0.56(协同 Synergy)	5.59	0.50(协同 Synergy)

基于以上研究结果,AGs与磺胺类抗菌剂SMX、 β -内酰胺类抗菌剂AMP和唑啉类抗菌剂MIT在毒性比1:1、1:5和5:1时对*E. coli*的联合毒性效应均呈现协同作用。此外,AGs与抗菌剂的毒性比为1:5时较1:1和5:1时的联合暴露风险更大。以往的研究表明,AGs与抗菌剂联合暴露时,抗菌剂剂量增加增大了它们的联合暴露风险。Delis等^[29]在研究体外抗菌药物相互作用时,阿米卡星和2种氟喹诺酮类药物之间的联合毒性效应部分观察到协同作用,但在氟喹诺酮浓度增加后,协同效果更为明显;Nøhr-Meldgaard等^[30]在研究白藜芦醇与AGs中的庆大霉素对金黄色葡萄球菌的协同作用时发现,在白藜芦醇剂量增加的情况下,会产生更好的协同效果;Mitchell等^[31]研究托马替丁与AGs联合使用的抗菌活性时,发现它们之间的协同效果仅在托马替丁增加时更加明显。因此,我们推测,当AGs和与其具有协同作用的抗菌剂混合暴露时,提高混合体系中这种抗菌剂相对于AGs的比例,可能使得AGs与抗菌剂同时作用时AGs更容易进入细胞并增强AGs对细菌的毒性作用。所以,从环境风险看,AGs和与其具有协同作用的抗菌剂在环境中共同暴露会提升对生物体的毒性作用;此外,当抗菌剂在混合体系中相较于AGs具有更高的比例时,其混合物的环境风险会进一步增加。

综上,本文对AGs与抗菌剂在不同毒性比下对*E. coli*的联合毒性效应进行探究,研究结果总结如下:(1)AGs与传统抗菌剂中的四环素抗菌剂CTC、糖肽类抗菌剂VA,与新型抗菌剂中的表面活性剂类抗菌剂DTAB和群体感应抑制剂类抗菌剂DFR在等毒性比时均呈现拮抗作用。这些产生拮抗作用的抗菌剂暴露在环境中可减弱单一毒性风险,从而降低环境风险;(2)AGs与传统抗菌剂中的磺胺类抗菌剂SMX、大环内酯类抗菌剂ERY和 β -内酰胺类抗菌剂AMP,与新型抗菌剂中的唑啉类抗菌剂MIT在等毒性比下均呈现协同作用;(3)AGs与SMX、AMP和MIT在1:5和5:1毒性比时的联合毒性效应呈现协同作用,且AGs与抗菌剂的毒性比为1:5时的效果较1:1和5:1时的效果好。所以,在环境风险方面,具有协同作用的AGs与抗菌剂在环境中共同暴露时,会提高单一药物对生物体的毒性作用;同时,混合体系中抗菌剂相对于AGs比例的提高可能会进一步增强联合暴露的环境风险,对人类健康以及生态环境造成威胁。本研究能够为环境中AGs

与抗菌剂联合暴露的风险评估提供参考与支撑。

通讯作者简介:印春生(1963—),男,博士,教授,主要研究方向为海洋化学。

参考文献(References):

- [1] El-Saber Batiha G, Hussein D E, Algamal A M, et al. Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views [J]. Food Control, 2021, 126: 108066
- [2] Luu Q H, Nguyen T L A, Pham T N, et al. Antimicrobial use in household, semi-industrialized, and industrialized pig and poultry farms in Viet Nam [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2021, 189: 105292
- [3] Nitzan O, Suponitzky U, Kennes Y, et al. Is chloramphenicol making a comeback? [J]. The Israel Medical Association Journal, 2010, 12(6): 371-374
- [4] Bollenbach T. Antimicrobial interactions: Mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution [J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 27: 1-9
- [5] Böttger E C, Crich D. Aminoglycosides: Time for the resurrection of a neglected class of antibacterials? [J]. ACS Infectious Diseases, 2020, 6(2): 168-172
- [6] Zembower T R, Noskin G A, Postelnick M J, et al. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 1998, 10(2): 95-105
- [7] 许桓,唐春雷,范为正.氨基糖苷类抗生素的研究进展[J].中国新药杂志,2019,28(15):1828-1835
Xu H, Tang C L, Fan W Z. Research progress in aminoglycoside antibiotics [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2019, 28(15): 1828-1835 (in Chinese)
- [8] 李秀银,王月兵,李明川.抗生素的分类及治疗原则[J].临床合理用药杂志,2012,5(28):12
- [9] 曾庆军.抗生素在生态环境中的污染转归以及应对措施[J].湖南畜牧兽医,2017(5):49-52
- [10] Giamarellou H, Zissis N P, Tagari G, et al. *In vitro* synergistic activities of aminoglycosides and new beta-lactams against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1984, 25(4): 534-536
- [11] 崔洁,李志光.甲氧苄啶与氨基糖苷类抗生素联用的抗生素后效应[J].中国药房,2000,11(1):14-15
Cui J, Li Z G. Post-antibiotic effect of trimethoprim in combination with three aminoglycosides [J]. China Pharmacy, 2000, 11(1): 14-15 (in Chinese)
- [12] Maeder V, Escher B I, Scheringer M, et al. Toxic ratio as an indicator of the intrinsic toxicity in the assessment of

- persistent, bioaccumulative, and toxic chemicals [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38 (13): 3659-3666
- [13] Tian D Y, Lin Z F, Yu J Q, et al. Influence factors of multicomponent mixtures containing reactive chemicals and their joint effects [J]. *Chemosphere*, 2012, 88 (8): 994-1000
- [14] Liu Y, Zhang J, Gao B Y, et al. Combined effects of two antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 279: 148-155
- [15] Broderius S J, Kahl M D, Hoglund M D. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, 14(9): 1591-1605
- [16] Ban Y H, Song M C, Park J W, et al. Minor components of aminoglycosides: Recent advances in their biosynthesis and therapeutic potential [J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(3): 301-311
- [17] Vanhoof R, Sonck P, Hannecart-Pokorni E. The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1995, 35 (1): 167-171
- [18] Hancock R E. Aminoglycoside uptake and mode of action: With special reference to streptomycin and gentamicin. I. Antagonists and mutants [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1981, 8(4): 249-276
- [19] 刘海燕, 殷瑜. 氨基糖苷类抗生素作用机制研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(11): 1283-1287
- Liu H Y, Yin Y. Advances in research on the mechanism of aminoglycoside antibiotics [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019, 44(11): 1283-1287 (in Chinese)
- [20] Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance [J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 775-781
- [21] Yocum R R, Waxman D J, Rasmussen J R, et al. Mechanism of penicillin action: Penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(6): 2730-2734
- [22] 董玉瑛, 王壮, 马静, 等. DDBAC 与取代芳烃对发光菌联合毒性作用[J]. *化工学报*, 2008, 59(9): 2351-2355
- Dong Y Y, Wang Z, Ma J, et al. Joint toxicity of DDBAC and substituted aromatic compounds to *Photobacterium phosphoreum* [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2008, 59(9): 2351-2355 (in Chinese)
- [23] Tacic A, Nikolic V, Nikolic L, et al. Antimicrobial sulfonamide drugs [J]. *Advanced Technologies*, 2017, 6(1): 58-71
- [24] 刘玉勇, 高琴文, 朱泉, 等. 反应性异噻唑啉酮类抗菌整理剂的制备及应用[J]. *纺织科技进展*, 2008(6): 17-19
- Liu Y Y, Gao Q W, Zhu Q, et al. Synthesis and application of reactive isothiazolone antibacterial agent [J]. *Progress in Textile Science & Technology*, 2008(6): 17-19 (in Chinese)
- [25] Manefield M, Rasmussen T B, Henzter M, et al. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover [J]. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 4): 1119-1127
- [26] Kadota J, Sakito O, Kohno S, et al. A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis [J]. *The American Review of Respiratory Disease*, 1993, 147(1): 153-159
- [27] 吕浩, 张也. 四环素类抗生素概述[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2017, 5(34): 15
- [28] Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1989, 33(11): 1831-1836
- [29] Delis G A, Siarkou V I, Vingopoulou E I, et al. Pharmacodynamic interactions of amikacin with selected β -lactams and fluoroquinolones against canine *Escherichia coli* isolates [J]. *Research in Veterinary Science*, 2018, 117: 187-195
- [30] Nøhr-Meldgaard K, Ovsepian A, Ingmer H, et al. Resveratrol enhances the efficacy of aminoglycosides against *Staphylococcus aureus* [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 52(3): 390-396
- [31] Mitchell G, Lafrance M, Boulanger S, et al. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(3): 559-568 ◆