

王喆, 刘茜倩, 庞博, 等. 胰蛋白酶和糜蛋白酶与抗生素联用的体外抗菌活性研究[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(4): 636-644

胰蛋白酶和糜蛋白酶与抗生素联用的体外抗菌活性研究

王喆, 刘茜倩, 庞博, 张晓辉, 鲍恩东*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: [目的]本研究旨在提供蛋白酶治疗奶牛乳房炎的参考数据,了解胰蛋白酶和糜蛋白酶的体外微生物敏感性。[方法]通过测定细菌的 A_{600} 绘制不同细菌的生长曲线,探讨了 0.5C 浓度胰糜蛋白复合酶(胰、糜蛋白酶各 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、1C 浓度胰糜蛋白复合酶(胰、糜蛋白酶各 $0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、2C 浓度胰糜蛋白复合酶(胰、糜蛋白酶各 $0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)及其与头孢噻唑钠、磷酸替米考星和硫氰酸红霉素联用对 5 种常见奶牛乳房炎致病菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、巴氏杆菌、无乳链球菌、停乳链球菌)生长的影响。同时,采用电子显微镜扫描技术,观察胰糜蛋白复合酶与头孢噻唑钠协同对大肠杆菌超微结构的影响。[结果]经胰糜蛋白复合酶处理的细菌生长缓慢。1C 浓度胰糜蛋白复合酶单独使用时对 5 种细菌的抑菌效果最佳;2C 浓度胰糜蛋白复合酶与各种抗生素配合使用的协同抑菌效果最强。扫描电镜下,胰糜蛋白复合酶对细菌细胞壁结构有明显的损伤,表现为处理组细菌的细胞壁完整程度较差。 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰糜蛋白复合酶与 $0.3125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 头孢噻唑钠联用可显著破坏细菌细胞壁结构。[结论]胰糜蛋白复合酶对 5 种常见奶牛乳房炎致病菌有不同程度的抑菌效果,其与头孢噻唑钠联用后可通过破坏细菌表面结构而发挥协同抑菌作用。

关键词: 胰蛋白酶; 糜蛋白酶; 复合酶; 微生物; 抑菌活性

中图分类号: S859.79⁺⁷

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2015)04-0636-09

Antimicrobial activity of trypsin and chymotrypsin in combination with antibiotic on pathogenic bacterium of cows mastitis *in vitro*

WANG Zhe, LIU Xiqian, PANG Bo, ZHANG Xiaohui, BAO Endong*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract [Objectives] With the purpose of providing protease reference data of dairy cow mastitis treatment, microbial sensitivity test *in vitro* is an important step. [Methods] The antimicrobial activities of different concentrations of the trypsin and chymotrypsin complex, such as 0.5C (trypsin and chymotrypsin are both $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 1C (trypsin and chymotrypsin are both $0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 2C (trypsin and chymotrypsin are both $0.32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and its combination antibacterial effects with antibiotics ceftiofur sodium phosphate,ilmicocin phosphate and erythromycin thiocyanate on the growth of 5 kinds of pathogenic bacteria associated with bovine mastitis, namely *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* were studied. Meanwhile, the ultrastructure of *E. coli* treated with the combination of the complex of trypsin and chymotrypsin and ceftiofur sodium was observed by using of the scanning electron microscopy. [Results] The results showed that the bacteria treated by the complex of trypsin and chymotrypsin grew much more slowly during 14 h of experiment. The concentration of the complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 1C displayed the best antimicrobial effect on five kinds of the tested bacteria. The concentration of the complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 2C combined with different antibiotics exhibited the best antimicrobial effect on five tested bacteria. By scanning electron microscopy, the structure of bacterial cell walls was damaged by the complex of trypsin and chymotrypsin compared with that of the control group. The combination of the complex of trypsin and chymotrypsin of $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ with ceftiofur sodium at the dosage of $0.3125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, can significantly destroy the structure of bacterial cell walls. [Conclusions] The results indicate that the complex of trypsin and chymotrypsin shows obvious antimicrobial effect on the five tested pathogenic bacteria associated with bovine mastitis. The combination of the complex of trypsin and chymotrypsin with cephalosporin has a remarkable synergistic effects by destroying the cell walls of bacteria.

Keywords: trypsin; chymotrypsin; the complex of trypsin and chymotrypsin; microorganism; antimicrobial activity

奶牛乳房炎是奶牛的一种常见病和多发病,常见的致病菌包括金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、化脓杆菌等。该病病因比较复杂,与环境、管理等因素密切相关,难以控制和消除。在隐性感染阶段,乳房腺体组织上皮水肿、充血,白细胞从微血管游离到乳腺内吞噬致病菌,使牛奶中含有大量的白细胞,导致牛奶

收稿日期: 2014-07-18

基金项目: 南京农业大学大学生创新训练计划(SRT)项目(1317A17); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 王喆, 本科生。* 通信作者: 鲍恩东, 教授, 博导, 主要从事动物免疫病理和分子病理的研究, E-mail: b_endong@njau.edu.cn。

产量和质量下降,缩短产奶时限,给奶牛养殖业造成巨大的经济损失,严重阻碍奶牛养殖业的发展^[1]。目前治疗奶牛乳房炎的治疗措施主要包括在发展初期对乳房内灌注抗生素,以及炎症初期进行局部外用药物治疗。另外,配合中药疗法也能获得较好的治疗效果。早在1957年,胰蛋白酶和糜蛋白酶就被用于组织损伤和炎症的治疗,Martin^[2]和Innerfield^[3]认为胰蛋白酶能够使毛细血管蛋白质网络中的纤维蛋白沉积物被水解、吸附,使得毛细血管的孔隙度增大,细胞间液释放,静压压力降低,恢复炎症部位的生理平衡及局部循环。胰蛋白酶在人医临床上主要用于肺脓肿、肺支气管炎等的治疗,胰蛋白酶能使分泌物变得稀薄,容易从肺中咳出,同时对常见的溃疡、坏疽、创伤性损伤、瘘管等疾病产生的局部水肿具有消肿作用^[4]。胰蛋白酶还能快速分解蛇毒,并具有抗组织坏死的特点^[5]。糜蛋白酶在国外人医临床的局部手术中已经得到广泛应用,主要用于摘除白内障等的眼科手术,也用于治疗创伤或手术后伤口消炎及防止局部水肿、积血、血肿、浮肿等。但是生物酶用于治疗奶牛乳房炎的报道却十分鲜见^[6]。本试验拟通过测定细菌生长曲线和观察细菌菌体超微结构变化的方法,采用生物酶(糜蛋白酶和胰蛋白酶)对奶牛乳房炎主要致病菌进行抑杀效果观察^[7],为生物酶的临床使用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验药品

受试药物糜蛋白酶(批号:Y-DCT-20130401,1 571 U·mg⁻¹)和胰蛋白酶(批号:Y-DT-20130401,3 752 U·mg⁻¹)均由北京格源天润生物技术有限公司提供;对照药物磷酸替米考星(批号:20110401,含量80.6%)由宁夏泰瑞生物制药有限公司提供;头孢噻唑钠(批号:20130808,含量91.5%)、硫氰酸红霉素(批号:ETH-201306099,含量78.7%)均自市场购入。

1.2 菌株与培养基

本试验用大肠杆菌标准菌株(ATCC8739)由清华大学生命科学学院惠赠;巴氏杆菌标准菌株(C51-3)购自中国兽药监察所;金黄色葡萄球菌标准株(ATCC25923)由南京农业大学动物医学院微生物组惠赠;无乳链球菌标准株(CVCC586)、停乳链球菌标准菌株(ATCC12388)由宁夏大学农学院许立华教授惠赠。本试验选用的MHA琼脂培养基(CM902)和MHB肉汤培养基(CM901)均为北京路桥技术有限责任公司生产。

1.3 抗生素最小抑菌浓度(MIC)的测定

1.3.1 药液配制 准确称取试验所需的相应质量的上述抗生素,用PBS缓冲液配成浓度为2 560 μg·mL⁻¹的药液原液10 mL,以无菌过滤器过滤后备用。

1.3.2 测定方法 采用倍比微量稀释法。在96孔板中每孔加入液体培养基180 μL,然后吸取2 560 μg·mL⁻¹药物溶液180 μL加入第1孔中,吹打混匀后吸取180 μL混合液至第2孔,以此类推至第22孔,使其药物质量浓度为0.000 611 μg·mL⁻¹。每个试验中分别设3个阳性对照孔(加菌但不加药)和3个阴性对照孔(不加菌也不加药)。每孔各接种20 μL菌液,封盖标记并用胶纸密封,置于37℃温箱中培养观察^[8]。

1.4 糜、胰蛋白酶与抗生素联用对不同细菌生长曲线影响的测定

1.4.1 各试验组细菌处理方法 采用2因素(抗生素、复合酶)4水平的2⁴设计,另分别设1C浓度的胰、糜蛋白酶处理为对照组。具体试验组药物及细菌的处理方法详见表1。

表1 各试验组细菌的药物处理方法

Table 1 The drug treatment of each group against to bacteria

抗生素 Antibiotic	PBS	0.5C 复合酶 Complex 0.5C	1C 复合酶 Complex 1C	2C 复合酶 Complex 2C	1C 胰蛋白酶 Trypsin 1C	1C 糜蛋白酶 Chymotrypsin 1C
无抗生素 No antibiotic	A	B	C	D	E	F
头孢噻唑钠 Cefthiofur sodium	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁		
磷酸替米考星 Tilmicosin phosphate	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂		
硫氰酸红霉素 Erythromycin thiocyanate	A ₃	B ₃	C ₃	D ₃		

注:1C复合酶即为1C浓度胰蛋白酶复合酶(胰蛋白酶0.16 mg·mL⁻¹,糜蛋白酶0.16 mg·mL⁻¹);2C(0.32 mg·mL⁻¹),0.5C(0.08 mg·mL⁻¹)依此类推。

Note: The concentration of 1C for the trypsin and chymotrypsin complex is that trypsin 0.16 mg·mL⁻¹, chymotrypsin 0.16 mg·mL⁻¹; 2C(0.32 mg·mL⁻¹), 0.5C(0.08 mg·mL⁻¹) and so on. The same as follows.

1.4.2 药物溶液配置 称取胰蛋白酶和糜蛋白酶各 0.021 5 g, 溶解于 50 mL PBS(pH 7.4) 缓冲液中, 得到 2C 浓度蛋白复合酶(胰、糜蛋白酶各 0.32 mg·mL⁻¹) 溶液(简称 2C 胰糜蛋白复合酶) 然后分别倍比稀释得到 1C(胰、糜蛋白酶各 0.16 mg·mL⁻¹)、0.5C(胰、糜蛋白酶各 0.08 mg·mL⁻¹) 胰糜蛋白复合酶溶液。称取相应质量的抗生素, 加入 PBS 缓冲液初步溶解后, 备用。称取胰蛋白酶和糜蛋白酶各 0.010 7 g 与上述抗生素溶液混合, 并用 PBS 缓冲液定容至 50 mL 得到 1C 胰糜蛋白复合酶和 MIC 浓度抗生素的药物混合液。2C、0.5C 胰糜蛋白复合酶与 MIC 浓度抗生素的药物混合液配制方法同上。分别称取 0.010 7 g 的胰蛋白酶和糜蛋白酶, 用 PBS 缓冲液定容至 50 mL, 得到 1C(0.16 mg·mL⁻¹) 的胰蛋白酶溶液和糜蛋白酶溶液。各处理组药物配置好后, 用无菌滤器过滤。空白对照组用 PBS 缓冲液处理, 不添加任何药物。

1.4.3 细菌生长曲线的测定 分别取配制好的各处理组药物溶液 0.1 mL 至灭菌的 EP 管中, 放入摇床培养以检验所配药物无污染; 再分别取 9 mL 各种药物溶液至 50 mL 无菌离心管, 分别加入复苏好并用 PBS 缓冲液稀释至 10⁶ CFU·mL⁻¹ 的菌液 3 mL, 充分混匀后, 置 37 °C 摇床, 180 r·min⁻¹ 培养 4 h, 使细菌与酶充分作用^[9]后, 从不同处理组离心管中取出 2 mL 细菌与药物混合液至装有 28 mL MHB 培养基的 50 mL 离心管, 使药液与培养基的体积比为 1:14。各组无菌对照管加 1.4 mL MHB 培养基, 并加入 0.1 mL 各组药液, 使药液与培养基的体积比同样达到 1:14, 统一放至 37 °C 摇床, 180 r·min⁻¹ 培养。分别于培养 0、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14 和 16 h 共 13 个时间点取样 1.5 mL 于离心管, 4 °C 冰箱保存备用^[10]。分别取各时间点样品 0.2 mL 加入 96 孔板, 用酶标仪测定 A₆₀₀ 吸光值。以各时间点 A₆₀₀ 值绘制不同处理组细菌生长曲线图^[11]。

1.5 胰糜蛋白复合酶及头孢噻唑钠对大肠杆菌超微结构的影响

1.5.1 药物对大肠杆菌的作用 选取革兰氏阴性菌代表菌种大肠杆菌, 药物配置方法参照 1.4.2 相关内容。各试验组(A 组, 即头孢噻唑钠组; B 组, 即 0.5C 胰糜蛋白复合酶组; B₁ 组, 即 0.5C 胰糜蛋白复合酶+ 头孢噻唑钠组) 取 9 mL 药物溶液, 加入 10 倍稀释的大肠杆菌菌液 3 mL, 混匀。空白对照组(A 组) 用 PBS 缓冲液处理。各试验组同时放入 37 °C 摇床, 180 r·min⁻¹ 培养 4 h。

1.5.2 扫描电镜结果观察 与药物作用后, 将药物与细菌混合液于 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃去上清液。立即加入 2.5% 戊二醛溶液进行固定, 送南京农业大学生命科学院扫描电子显微镜室进行样品处理, 使用扫描电镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 MIC 测定结果

3 种抗生素对 5 种细菌的最小抑菌浓度(MIC) 测定结果(表 2) 显示: 不同细菌对同一种抗生素的敏感性有差异, 其中大肠杆菌对头孢噻唑钠、磷酸替米考星最敏感, 巴氏杆菌对硫氰酸红霉素最敏感。

表 2 细菌对抗生素的 MIC 测定结果

Table 2 The result of MIC measurement of the antibiotics to the bacterials

μg·mL⁻¹

菌种 Strains	抗生素 Antibiotic		
	头孢噻唑钠 Ceftiofur sodium	磷酸替米考星 Tilmicosin phosphate	硫氰酸红霉素 Erythromycin thiocyanate
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	4.000	160	10
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0.313	2.5	5
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	0.625	5	10
停乳链球菌 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0.625	80	20
巴氏杆菌 <i>Pasteurella</i>	0.625	80	0.078

2.2 胰糜蛋白复合酶及抗生素对所检细菌生长曲线的影响

从图 1 可知: 头孢噻唑钠各试验组细菌生长曲线高于空白对照组, 没有体现出明显的抑菌效果, 其余各组生长曲线低于空白对照组, 显示出一定的抑菌效果。与空白对照组相比, 0.5C 和 1C 胰糜蛋白复合酶的生长曲线走势趋缓, 显示出一定的抑菌作用。2C 胰糜蛋白复合酶抑菌效果不明显。金黄色葡萄球菌对磷酸替米考星较敏感, 对头孢噻唑钠不敏感。金黄色葡萄球菌和磷酸替米考星与胰糜蛋白复合酶共同作用效果对比显示, 0.5C、1C、2C 胰糜蛋白复合酶与磷酸替米考星的协同作用效果相近, 均有抑菌作用。

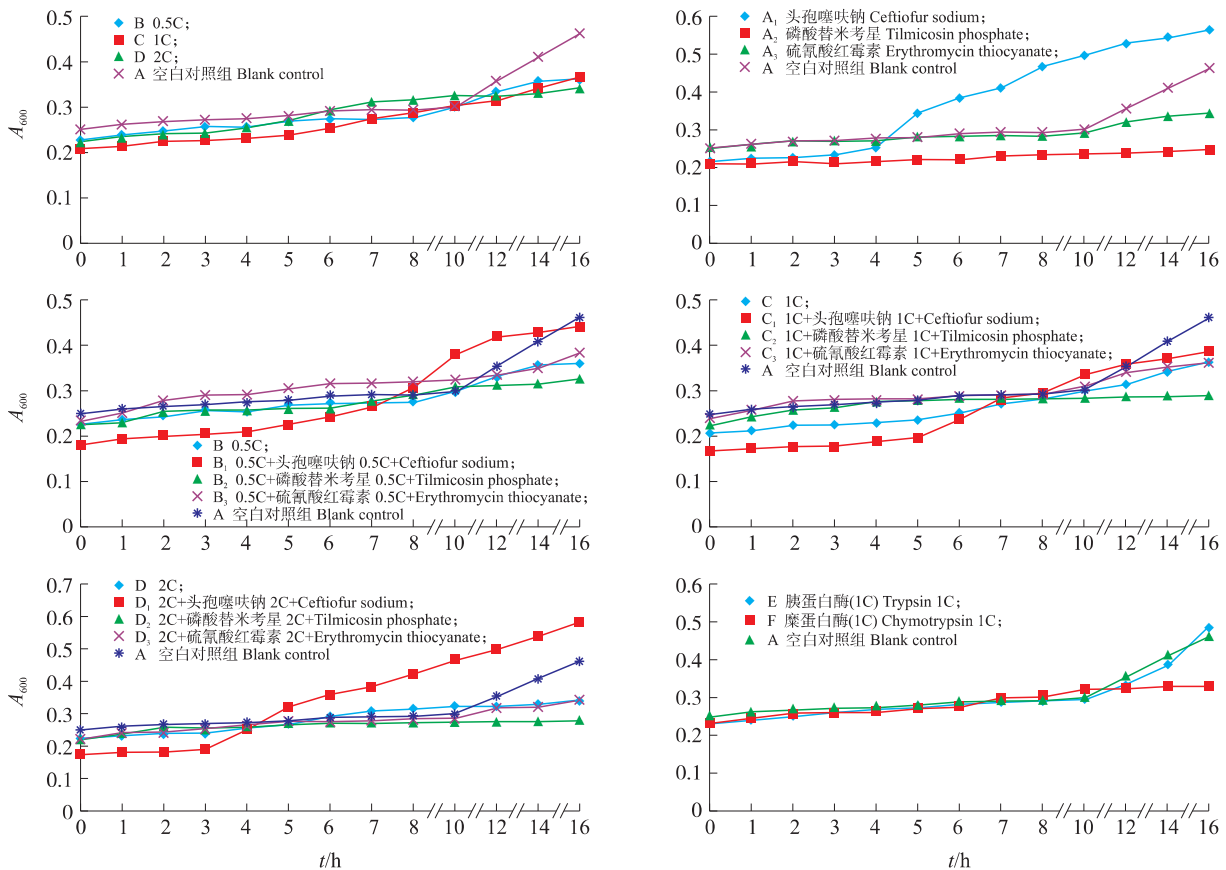


图 1 不同药物对金黄色葡萄球菌生长曲线的影响

Fig. 1 The effects of different drugs on the growth curve of *Staphylococcus aureus*

A: 空白对照组 Blank control; A₁: 头孢噻唑钠 Ceftiofur sodium; A₂: 磷酸替米考星 Tilmicosin phosphate; A₃: 硫氰酸红霉素 Erythromycin thiocyanate; B: 0.5C 胰糜蛋白复合酶 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 0.5C; B₁: 0.5C 胰糜蛋白复合酶+头孢噻唑钠 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 0.5C+ceftiofur sodium; B₂: 0.5C 胰糜蛋白复合酶+磷酸替米考星 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 0.5C+tilmicosin phosphate; B₃: 0.5C 胰糜蛋白复合酶+硫氰酸红霉素 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 0.5C+erythromycin thiocyanate; C: 1C 胰糜蛋白复合酶 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 1C; C₁: 1C 胰糜蛋白复合酶+头孢噻唑钠 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 1C+ceftiofur sodium; C₂: 1C 胰糜蛋白复合酶+磷酸替米考星 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 1C+tilmicosin phosphate; C₃: 1C 胰糜蛋白复合酶+硫氰酸红霉素 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 1C+erythromycin thiocyanate; D: 2C 胰糜蛋白复合酶 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 2C; D₁: 2C 胰糜蛋白复合酶+头孢噻唑钠 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 2C+ceftiofur sodium; D₂: 2C 胰糜蛋白复合酶+磷酸替米考星 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 2C+tilmicosin phosphate; D₃: 2C 胰糜蛋白复合酶+硫氰酸红霉素 The complex of trypsin and chymotrypsin at the dosage of 2C+erythromycin thiocyanate; E: 1C 胰蛋白酶 The trypsin at the dosage of 1C; F: 1C 糜蛋白酶 The chymotrypsin at the dosage of 1C. The same as follows.

从图 2 可知: 磷酸替米考星、1C 胰糜蛋白复合酶+磷酸替米考星、1C 胰糜蛋白复合酶、2C 胰糜蛋白复合酶+磷酸替米考星、2C 胰糜蛋白复合酶+头孢噻唑钠、2C 胰糜蛋白复合酶 6 个试验组的生长曲线均高于空白对照组, 没有显示出抑菌效果, 其余各组的细菌生长比空白细菌对照组缓慢, 体现出一定的抑菌效果。1C 和 2C 胰糜蛋白复合酶与空白对照组相比, 显示出抑菌作用。大肠杆菌对头孢噻唑钠较敏感, 对磷酸替米考星则不敏感, 对硫氰酸红霉素不敏感。大肠杆菌与磷酸替米考星+不同浓度的胰糜蛋白复合酶联合作用时, 2C 胰糜蛋白复合酶与磷酸替米考星的协同抑菌作用较好。

从图 3 可知: 2C 胰糜蛋白复合酶试验组的抑菌效果与空白对照组生长曲线走势接近, 1C 胰糜蛋白复合酶+头孢噻唑钠、磷酸替米考星和 2C 胰糜蛋白复合酶+磷酸替米考星组的抑菌效果不明显, 其余试验组的生长曲线低于空白对照组, 表明均具有抑菌效果。2C 胰糜蛋白复合酶试验组的生长曲线与空白对照组趋势接近, 0.5C 胰糜蛋白复合酶和 1C 胰糜蛋白复合酶的生长曲线在 8 h 之前低于空白对照组, 说明前期

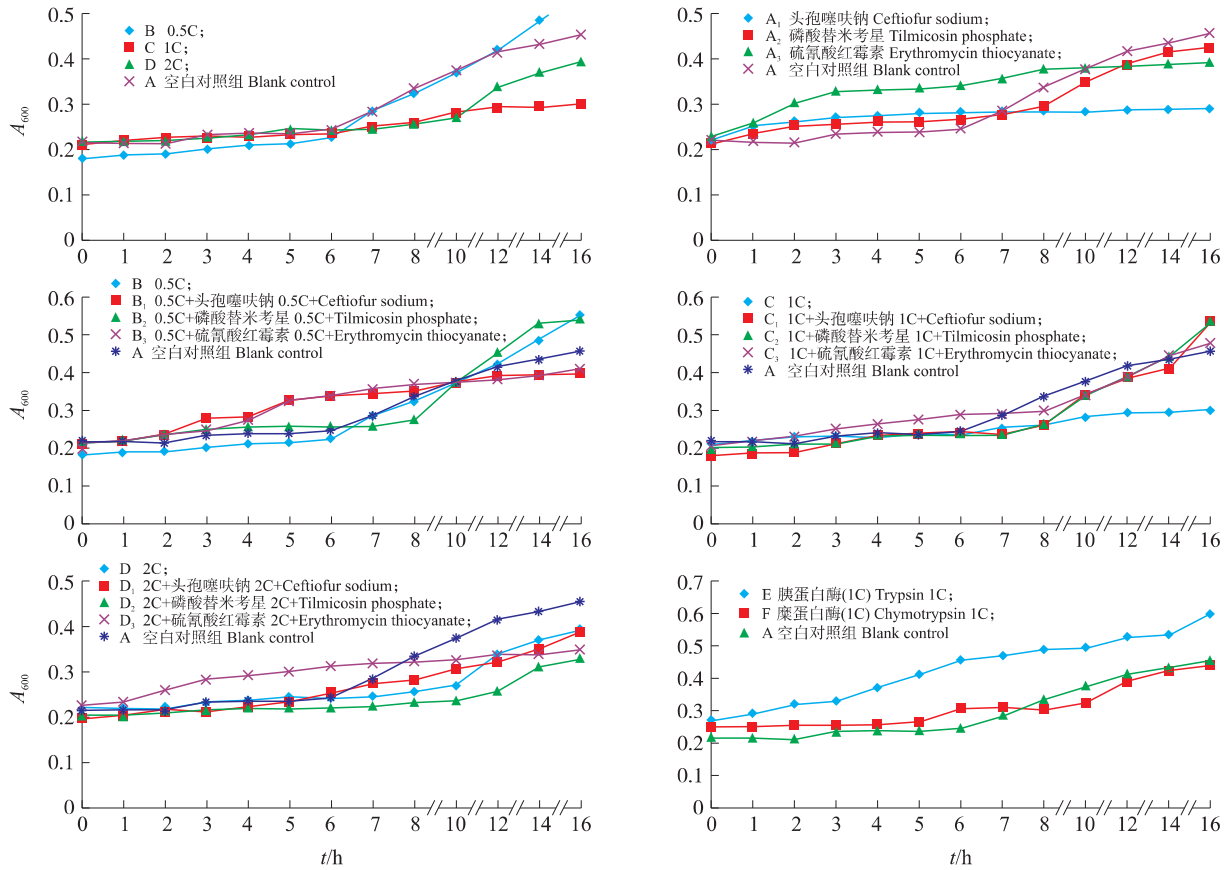


图2 不同药物对大肠杆菌生长曲线的影响

Fig. 2 The effects of different drugs on the growth curve of *Escherichia coli*

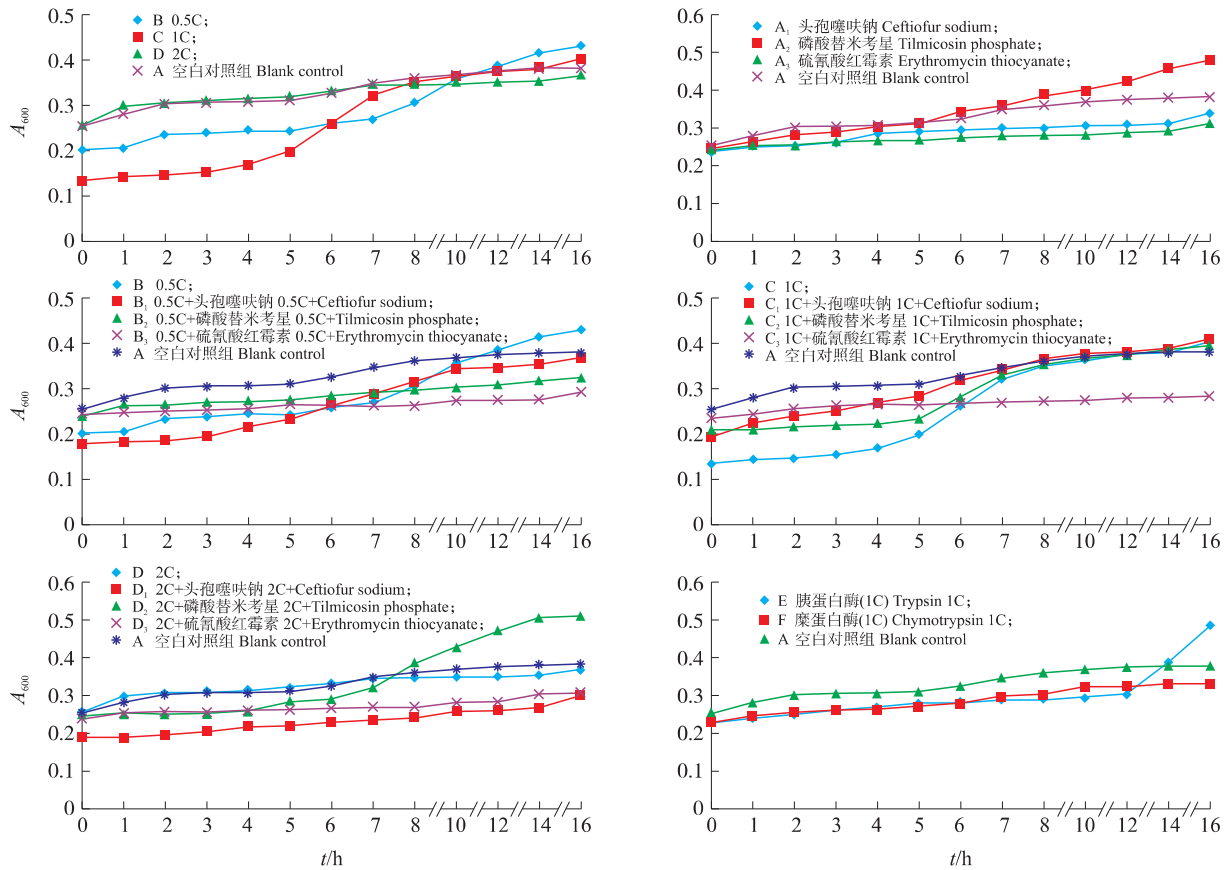


图3 不同药物对无乳链球菌生长曲线的影响

Fig. 3 The effects of different drugs on the growth curve of *Streptococcus agalactiae*

产生了抑菌效果。所有浓度的胰糜蛋白复合酶的抑菌效果在 8 h 以后水平相近。从图 3 的生长曲线可知:无乳链球菌对硫氰酸红霉素最敏感,对头孢噻唑钠较敏感,对磷酸替米考星不敏感。硫氰酸红霉素与不同浓度的胰糜蛋白复合酶联合应用后,对无乳链球菌作用均具有协同效应,且协同效应相近。

从图 4 可知:除头孢噻唑钠试验组外,其余试验组与空白对照组相比,在 6 h 后都有明显的抑菌效果。0.5C、1C 和 2C 胰糜蛋白复合酶都具有抑菌效果,且抑菌效果相近,但 1C 胰糜蛋白复合酶的抑菌效果最佳。停乳链球菌对磷酸替米考星最敏感,对硫氰酸红霉素较敏感,对头孢噻唑钠不敏感。与磷酸替米考星与胰糜蛋白复合酶联合应用相比,0.5C、1C 和 2C 胰糜蛋白复合酶与硫氰酸红霉素协同作用效果相近,均有明显的抑菌作用,其中 2C 胰糜蛋白复合酶和磷酸替米考星的协同抑菌效果最佳。

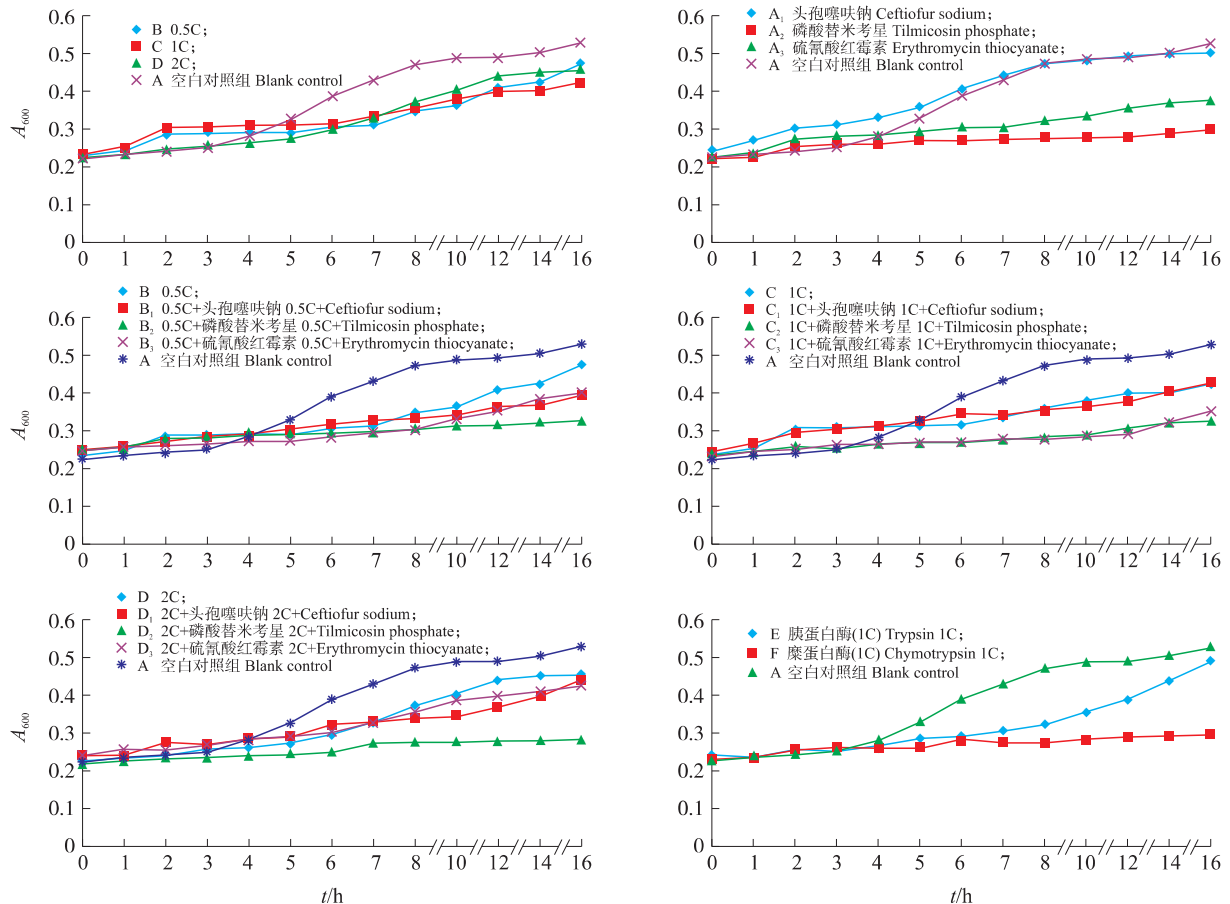


图 4 不同药物对停乳链球菌生长曲线的影响

Fig. 4 The effects of different drugs on the growth curve of *Streptococcus dysgalactiae*

从图 5 可知:除硫氰酸红霉素、磷酸替米考星和 1C 胰糜蛋白复合酶+磷酸替米考星试验组外,其余试验组与空白对照组相比,都有明显的抑菌效果。0.5C、1C 和 2C 胰糜蛋白复合酶试验组的抑菌效果与空白对照组接近,1C 胰糜蛋白复合酶的抑菌效果最佳。巴氏杆菌对头孢噻唑钠最敏感,对硫氰酸红霉素不敏感,与空白细菌对照水平接近,对磷酸替米考星最不敏感。头孢噻唑钠与不同浓度胰糜蛋白复合酶联合应用后,各浓度的胰糜蛋白复合酶与硫氰酸红霉素共同作用均有明显的抑菌作用,其中 1:胰糜蛋白复合酶和头孢噻唑钠共同作用时的协同抑菌效果最佳。

2.3 胰糜蛋白复合酶及头孢噻唑钠对大肠杆菌超微结构的影响

由图 6-A 可以看出:未经处理的正常大肠杆菌的形态正常,表面光滑,具有适度的黏附性,菌体大小离散程度适中。而经过药物处理后,大肠杆菌的形态结构出现了各种不同程度的改变:经过头孢噻唑钠处理后(图 6-B),多数菌体大小相近,长度较短,菌体表面粗糙,部分菌体破裂;经 0.5C 复合酶处理后(图 6-C),少数菌体破损,个别出现溃烂;经过 0.5C 胰糜蛋白复合酶与头孢噻唑钠共同处理后(图 6-D),菌体大小差异较大,长度适中,半数以上菌体表面粗糙,多数菌体破裂。

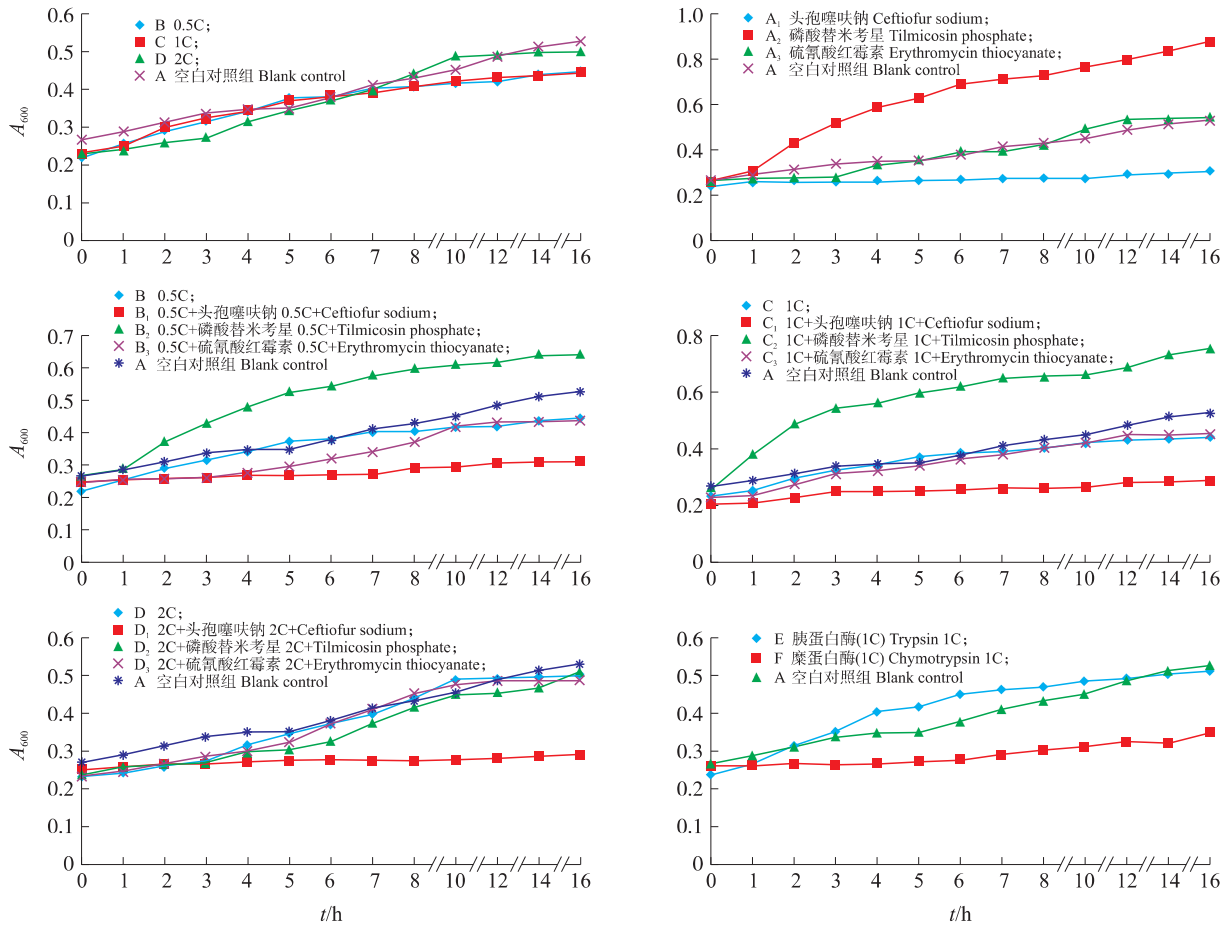


图5 不同药物对巴氏杆菌生长曲线的影响

Fig. 5 The effects of different drugs on the growth curve of *Pasteurella*

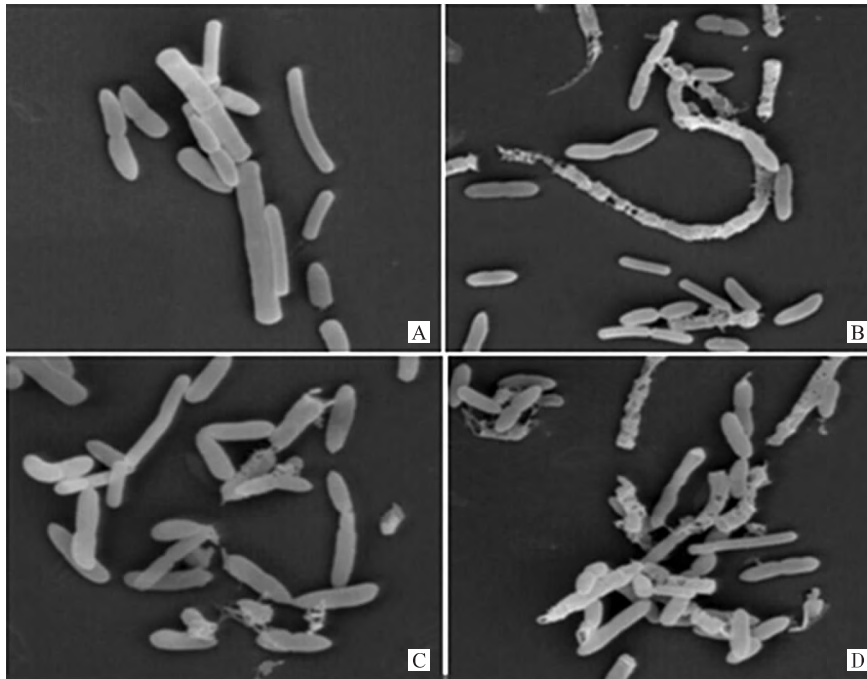


图6 胰糜蛋白复合酶对大肠杆菌影响的扫描电镜观察结果

Fig. 6 The scanning electron observation of *E. coli* treated by the complex of trypsin and chymotrypsin

A.空白对照组($\times 7\ 500$) Control group; B.头孢噻唑钠处理($\times 5\ 000$) Treated with ceftiofur sodium; C.0.5C 胰糜蛋白复合酶处理($\times 8\ 000$) Treated with 0.5C of the complex of trypsin and chymotrypsin; D.0.5C 胰糜蛋白复合酶+头孢噻唑钠处理($\times 6\ 000$) Treated with 0.5C of the complex of trypsin and chymotrypsin combined with ceftiofur sodium

3 讨论

本试验通过各种药物溶液对不同细菌生长曲线影响的试验结果发现,胰糜蛋白复合酶对检测的5种细菌体现出的最佳抑菌效果的浓度均为1C,即胰、糜蛋白酶各 $0.16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在胰糜蛋白复合酶作用下,细菌生长缓慢,4 h前生长速度低于空白对照组细菌,10 h前后才进入对数生长期,细菌生长进入对数期的时间延迟,并在14 h前后出现生长抑制。该结果表明胰糜蛋白复合酶比较缓慢地体现出对细菌生长的抑制作用。胰糜蛋白复合酶与细菌充分作用后,表现为延缓细菌进入对数上升期的时间,并能降低细菌的繁殖速度。其机制可能为胰糜蛋白复合酶通过破坏整个细菌生长周期细胞壁从而抑制细菌的生长和繁殖,自4 h后抑菌效果开始显现,10 h后由于先前细菌菌体积累速度抵消了细菌生长抑制所带来的生长曲线变化,或是细菌产生耐受,导致 A_{600} 曲线趋势平缓,但没有下降。将胰糜蛋白复合酶与5种细菌的相应最敏感抗生素联合应用时,发现2C胰糜蛋白复合酶与相应抗生素具有最佳协同抑制作用。除大肠杆菌的最佳协同抗生素磷酸替米考星与最敏感抗生素头孢噻唑钠不一致外,其他4种细菌的最佳协同抗生素均为各自的最敏感抗生素。

单独使用1C糜蛋白酶或胰蛋白酶分别对5种细菌的作用结果显示,糜蛋白酶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、停乳链球菌和巴氏杆菌抑菌效果优于胰蛋白酶;但其对无乳链球菌的效果明显低于其他4种。这可能是由于胰蛋白酶能够切割L-精氨酸和L-赖氨酸,裂解胞壁质脂蛋白,使细菌的胞外蛋白发生变形,造成细胞壁皱缩,黏附性增加,致使细菌聚集在一起,并表现出皱缩形态。胰蛋白酶通过切割L-精氨酸和L-赖氨酸,能够分解组织内发生变形的蛋白,但对正常组织没有任何不良作用。糜蛋白酶是一种内肽酶,对L-酪氨酸氨基和L-苯丙氨酸的羧基所形成的肽键识别和水解作用最强^[12]。糜蛋白酶的酶原由胰蛋白酶激活,能够破坏革兰氏阳性菌的肽聚糖^[7]。而大肠杆菌属于革兰氏阴性菌,细胞壁较薄,糜蛋白酶对其细胞壁的破坏作用不明显。在扫描电镜下观察到胰蛋白酶使大肠杆菌的细胞壁产生了皱缩。

扫描电镜结果显示,头孢噻唑钠对细菌(大肠杆菌)细胞壁具有破坏作用,可使细菌细胞壁结构发生破损。这主要是由于 β -内酰胺化合物头孢噻唑钠的代谢物作用于细菌转肽酶阻断黏肽的合成,使细菌细胞壁缺失而达到杀菌作用^[13]。 β -内酰胺还可与 β -内酰胺结合蛋白结合,这些蛋白质的本质可能是细胞膜上的一些酶,由此改变细菌细胞膜的通透性,抑制蛋白质合成,并释放自溶素,因此有溶菌作用。与头孢噻唑钠相比,硫氰酸红霉素和磷酸替米考星属于大环内酯类抗生素,能够与细菌核蛋白体50S亚基结合,阻断转肽作用,影响蛋白质的合成。胰糜蛋白复合酶和头孢噻唑钠作用效果一样,在一定程度上也呈现出破坏细菌细胞壁的作用,且能促进细菌表面多糖的分泌,使细菌发生黏连聚集,但其具体机制还有待进一步研究。试验结果同时显示,胰糜蛋白复合酶和抗生素联合使用时,二者在破坏细菌细胞壁结构方面具有协同作用。

综合分析试验结果,胰糜蛋白复合酶表现出不同程度的抑菌效果,这可能是因为它具有破坏细菌表面结构的作用。在生长曲线前8 h时间中,由于胰糜蛋白复合酶的对细菌的破坏作用,致使细菌进入对数生长期的时间延后,而空白组细菌由于也处于适应期,故胰糜蛋白复合酶的抑制作用在生长曲线上体现不明显。在后8 h中,菌浓度增长迅速,而遭到胰糜蛋白复合酶破坏的细菌由于活力下降,细菌生长在一定程度上被抑制,菌浓度升高缓慢,这体现在其8 h后的生长曲线明显低于空白对照组。在临床上单独使用胰糜蛋白复合酶时,推荐选择1C胰糜蛋白复合酶;如果将胰糜蛋白复合酶与抗生素配合使用,则2C浓度最佳。鉴于临床应用的胰糜蛋白复合酶载体溶剂对酶的承载量限制,胰蛋白酶和糜蛋白酶的溶解性能限制以及成本因素,我们推荐使用1C浓度胰糜蛋白复合酶与抗生素配合使用^[14]。

参考文献 Reference:

- [1] 曹立亭,胡松华. 奶牛乳房炎重要致病菌和常用抗菌药物在牛奶中的分布[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(10): 1381-1384
[Cao L T, Hu S H. Distribution of major mastitis-causing bacteria and common antimicrobial drugs in milk[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2010, 30(10): 1381-1384 (in Chinese with English abstract)]
- [2] Martin G J. Anti-inflammatory effect of trypsin[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1957, 68: 70-88
- [3] Innerfield I. The anti-inflammatory effect of parenterally administered proteases[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1957, 68: 167-177
- [4] 聂陆娥,胡卿香,程丽红,等. 糜蛋白酶治疗褥疮的疗效评价[J]. 中华国际护理杂志, 2004, 3(12): 882-884

- [Nie L E. Effectiveness of chymotrypsin in treatment of pressure sore[J]. Chinese International Journal of Nursing 2004 3(12): 882-884(in Chinese with English abstract)]
- [5] 孙逸佃. 胰蛋白酶在治疗蛇伤中的应用[J]. 中国医院药学杂志, 1984(6): 10-11
[Sun Y D. Application of trypsin in the treatment of snake injury[J]. Chinese Hospital Pharmaceutical Journal, 1984(6): 10-11(in Chinese)]
- [6] 刘明峰, 陈立祥. 复合酶制剂在动物生产中的应用研究进展[J]. 饲料博览, 2014(3): 32-34
[Liu M F, Chen L X. Research progress of complex enzyme preparation in animal production[J]. Feed Review, 2014(3): 32-34(in Chinese)]
- [7] Herzog P. Wirkung der Enzymkombination trypsin-chymotrypsin papain auf enterohämolyisierende *E. coli* und *salmonellen* [D]. Leipzig, Germany: Universität Leipzig, 2005:
- [8] 颜友荣, 方向红. 替米考星对鸡败血支原体的体外抑菌试验[J]. 畜牧兽医杂志, 2007, 26(1): 8-10
[Yan Y R, Fang X H. Antibacterial activity of *M. gallisepticum* by the tilmicosin phosphate *in vitro* [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2007, 26(1): 8-10(in Chinese)]
- [9] 张伟娜, 白佳桦, 黄正, 等. 连翘对奶牛子宫内膜炎致病菌(乳房链球菌和无乳链球菌)生长曲线的影响[A]. 中国农学通报, 2011, 27(17): 54-57
[Zhang W N, Bai J H, Huang Z, et al. Effects of Forsythia suspense on growth curve of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* about endometritis pathogens in dairy cows [A]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(17): 54-57(in Chinese with English abstract)]
- [10] 钱晓璐. 双重外排泵介导猪链球菌对环丙沙星耐药的机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013
[Qian X L. A correlation of double-efflux pump in contributing to ciprofloxacin resistance in streptococcus suis [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013(in Chinese with English abstract)]
- [11] 杨雪峰, 欧阳王庆, 李向辉, 等. 复方阿莫西林纳米乳对奶牛乳房炎3种主要病原菌的体外联合抗菌效应[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 35(5): 585-590
[Yang X F, Ouyang W Q, Li X H, et al. Antibacterial effect of compound amoxicillin nanoemulsion on 3 kinds of main pathogenic bacteria of cow mastitis *in vitro* [J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science Edition, 2009, 35(5): 585-590(in Chinese with English abstract)]
- [12] 田允波. 饲料酶制剂及其应用进展[J]. 内蒙古畜牧科学, 1991(3): 20-25
[Tian Y B. Progress of material enzymes and its application [J]. Inner Mongolian Journal of Animal Sciences and Production, 1991(3): 20-25 (in Chinese)]
- [13] 韩克光, 王安如, 古少鹏, 等. 复配头孢噻唑对大肠杆菌的药敏试验[J]. 中国农学通报, 2007, 23(2): 39-41
[Han K G, Wang A R, Gu S P. Reconstituted ceftiofur sodium drug sensitivity test against *E. coli* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(2): 39-41(in Chinese with English abstract)]
- [14] 罗士津, 翟明仁, 张铁鹰. 复合酶制剂的研究及应用进展[J]. 饲料与畜牧, 2007(4): 11-15
[Luo S J, Zhai M R, Zhang T Y. Progress of research and application of compound enzyme preparation [J]. Feed and Animal Husbandry, 2007(4): 11-15(in Chinese)]

责任编辑: 周广礼