

· 论 著 ·

# 耐喹诺酮的铜绿假单胞菌药物外排泵研究

黄 梅,奚海燕,王 颖,潘 红,范 明,胡毓安,史利宁,王卫萍,邵海枫

[摘要] 目的 探讨外排系统在对喹诺酮类药物耐药的铜绿假单胞菌中所起的作用。方法 用含亚抑菌浓度 (20 mg/L) 外排泵抑制剂羰基氰化氯苯脒 (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP) 的 MH 平板和不含泵抑制剂的 MH 平板分别检测对环丙沙星的 MIC 值,比较 MIC 值是否不同;MIC 值降低的菌株用 RT-PCR 检测外排泵蛋白基因表达量的变化,用 PCR 和测序法了解调控外排泵蛋白表达的基因是否存在改变。结果 14 株铜绿假单胞菌的外排泵存在过度表达,环丙沙星的 MIC 值降低至原值的 1/2~1/8,以 mexAB-OprM 和 mexCD-OprJ 表达增加为主,调控 mexAB-OprM 基因的 MexR 有 V126E 突变, mexCD-OprJ 的调控基因 NfxB 有 H109Y 突变。结论 外排泵的高表达在喹诺酮耐药的铜绿假单胞菌中存在近 50%,高于所见国内外的报道。该机制与药物作用靶位改变共同提高了铜绿假单胞菌对喹诺酮类的耐药,外排泵的高表达同时也提升了该菌对头孢吡肟等其他药物的耐药,是需要密切关注和采取相应措施的流行趋势。

[关键词] 铜绿假单胞菌;环丙沙星;左氧氟沙星;耐药机制;外排系统

[中图分类号] R96 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.06.007

## Study on the efflux pump of quinolone resistant *pseudomonas aeruginosa* drugs

HUANG Mei, XI Hai-yan, WANG Ying, PAN Hong, FAN Ming, HU Yu-an, SHI Li-ning, WANG Wei-ping, SHAO Hai-feng. PLA Institute of Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] Objective This study aims to investigate the efflux system in fluoroquinolone resistance of *pseudomonas aeruginosa*. Methods MIC values of ciprofloxacin were detected by MH flat containing sub-inhibitory concentration (20 mg/L) efflux pump inhibitor carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP) and MH flat without CCCP. Then compare the MIC. Results Efflux pump in 14 strains of *pseudomonas aeruginosa* was overexpressed, which were mainly mexAB-OprM and mexCD-OprJ. MIC value of ciprofloxacin decreased 1/2-1/8 times. MexR regulated by mexAB-OprM existed V126E mutation and NfxB regulated by mexCD-OprJ existed H109Y mutation. Conclusion The efflux pump is overexpressed in nearly 50% of fluoroquinolone resistant strains of *pseudomonas aeruginosa*, which is higher than the domestic and foreign reports. The mechanism and drug target change improve the resistance of *pseudomonas aeruginosa* to fluoroquinolones. The overexpression of efflux pump also enhance the resistance of the bacteria to cefepime and other drugs (this is not listed), which need us pay close attention and take measures to control this trend.

[Key words] *pseudomonas aeruginosa*; ciprofloxacin; levofloxacin; efflux system; resistance mechanis

铜绿假单胞菌是医院感染中常见的机会致病菌。在下呼吸道感染和重症肺炎中该菌作为病原菌是提示预后差的重要指标,尤其是多重耐药菌株的出现使治疗更为棘手。在大型综合性医院,喹诺酮类抗生素往往是治疗多重耐药菌感染的主要药物,由此导致铜绿假单胞菌对喹诺酮类抗生素的耐药率逐年上升,2010 年我院耐药性监测显示铜绿假单胞菌对环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别为 37.4% 到 34.7%,2011 年则分别上升至 50.3% 和 48.9%<sup>[1]</sup>。有报道表明,铜绿假单胞菌对环丙沙星及氧氟沙星的耐药率与左氧氟沙星的消耗量密切相关,与环丙沙星的消耗量相关不密切<sup>[2]</sup>。

目前认为铜绿假单胞菌对喹诺酮类抗菌药耐药机制<sup>[3]</sup>主要是编码 DNA 解旋酶和拓扑异构酶 IV 的基因发生突变,导致喹诺酮类药物作用靶位改变;细胞膜外排泵的高表达是铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物耐药的另一因素<sup>[4]</sup>。铜绿假单胞菌最重要的外排系统属于 RND 家族,由 3 部分组成:外膜蛋白,如 OprM、OprJ、OprN 等形成门通道,使药物进入菌体内;内膜蛋白,如 MexB、MexD、MexF、MexY、MexK 等,为主要的泵出蛋白,具有识别药物的作用,但无特异性;连接蛋白,如 MexA、MexC、MexE、MexX 等,能连接内、外膜蛋白,与其共同形成可能是连序的通道并开口于菌体外。以上 3 部分可形成 MexAB-OprM、MexXY-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN 等导致铜绿假单胞菌产生耐药性的主动泵出系统。MexAB-OprM 受 MexR 的负调节, mexR 位于 MexAB-

作者单位: 210002 江苏南京,南京军区南京总医院全军检验医学研究所

OprM 操纵子和转录叉的上游, *mexR* 突变增加 MexAB-OprM 的外排泵的表达量, 伴发 MDR (多重耐药); MexXY-OprM 可被抗菌药物诱导表达, 受上游调控基因表达的 *MexZ* 负调控, 由其过度表达可导致对青霉素、氨基糖苷类、氨基糖苷类、红霉素和四环素等药物耐药。

MexCD-OprJ 的操纵子受 NfxB 负反馈调控, 一旦 *nfxB* 出现突变, 可引起喹诺酮类、大环内酯类和头孢吡肟等药物的交叉耐药。MexEF-OprN 受 MexT 和 MvaT 调控与喹诺酮、甲氧苄啶、氯霉素和亚胺培南的外排和总体调控铜绿假单胞菌致病相关。为了了解和证实外排系统在本组菌喹诺酮类药物耐药中所起的作用, 本研究采用泵抑制、调控基因突变和泵表达量的变化进行研究探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 2012 年 10–12 月收集我院临床分离的 30 株铜绿假单胞菌 (非重复菌株), 标本类型分别为痰液、血液、分泌物、脓液、组织和导管等。入选标准: Vitek-2 Compact 仪, 用 GN-13 药敏卡检测, 表型为环丙沙星 (CIP) 和左氧氟沙星 (LEV) 耐药, 琼脂稀释法复查符合上述表型。质控菌株: 铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

**1.2 仪器和设备** Vitek2-Compact 细菌鉴定仪: 法国 BioMerieux 公司, PCR 扩增仪: 德国 eppendorf 公司, 捷达 801 凝胶电泳图像分析系统、Himac-CR21G 低温高速离心机: 日本日立公司, H. SWX 600BS 数显电热恒温水箱: 上海新苗医疗器械厂, DL-CJ-2N 超净工作台: 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司, ABI 7500 real-time PCR system: 美国 ABI 公司。

**1.3 试剂** RNAiso Plus (D9108A) 总 RNA 提取试剂盒: 日本 TaKaRa 公司, iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit, iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBRGreen Supermix: 美国 Bio-Rad 公司, TaqDNA 聚合酶 (附 10×buffer 和 MgCl<sub>2</sub>)、dNTPs、DNA Marker: 日本 TaKaRa 公司, 蛋白分子量标准: 加拿大 Fermentas 公司, 琼脂糖: 美国 Promega 公司, 引物合成与测序: 上海英骏公司。

### 1.4 方法

**1.4.1 含 CCCP 的 MH 平板检测环丙沙星的 MIC 值** 按美国 CLSI (2012) 标准琼脂稀释法 (琼脂分为含和不含 CCCP) 检测和判读 CIP 对菌株 MIC 值。铜绿假单胞菌 ATCC 27853 为质控菌株, 具体方法如下: ①倍比稀释法制备系列浓度梯度的抗菌药物溶液, 浓度依次为 1280、640、320、160、80、

40、20、10、5、2.5、1.2、0.6 μg/mL。②制备 200 mg/L CCCP 溶液。③M-H 琼脂 (CCCP) 以蒸馏水配制为 85% 浓度, 高压后冷却至 56℃ 左右, 每平板加入 17 mL 及 1 mL CCCP 溶液和 2 mL 对应浓度的药物, 总体积为 20 mL, CCCP 浓度为 20 mg/mL, 药物终浓度依次为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.06 μg/mL。不含 CCCP 的 MH 琼脂琼脂方法同前, CCCP 溶液换为 1 mL 蒸馏水。④挑取过夜培养的新鲜菌落配置为 0.5 麦氏单位浊度的菌液。⑤用无菌棉签接种新鲜配置 0.5 麦氏单位浊度的菌液到测试的 M-H 琼脂平板上, 35℃ 孵箱 18~24 h, 读取 MIC 值。

**1.4.2 实时荧光定量 PCR 检测外排系统基因表达量** 在 CCCP 存在条件下 CIP 的 MIC 值下降的菌株采用 qRT-PCR 检测 *mexA*、*mexC*、*mexE* 和 *mexX* 4 种外排基因的表达量。方法如下: 用日本 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂盒按说明书操作提取细菌的总 RNA, 再使用 Bio-RAD 公司的 iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit 试剂盒按说明书进行总 RNA 逆转录成 cDNA, 采用 iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBRGreen Supermix 试剂盒在 ABI 7500 real-time PCR system 定量分析外排系统 4 种基因的 mRNA 的表达量。所用引物 (由上海英骏公司合成) 见表 1, 铜绿假单胞菌 (*Pa*) ATCC 27853 为正常对照组, *rspl* 基因为内参基因。反应体系: 20 μL, 包括 iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBRGreen Supermix 10 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, 双蒸水 7.2 μL, cDNA 2 μL, 反应条件: 94℃ 预变性 30 s, 94℃ 5 s, 60℃ 35 s, 30 循环; 溶解曲线为 94℃ 15 s, 60℃ 1 min, 94℃ 15 s。每个样品设置 3 个重复孔, 以 *rspl* 基因作为内参基因。结果以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示, 其中 ΔΔCt = 实验组 - 对照组 (Ct<sub>目的基因</sub> - Ct<sub>rspl</sub>) (Ct<sub>目的基因</sub> - Ct<sub>rspl</sub>)。外排泵表达判定标准依据文献<sup>[5]</sup>报道, *mexA* 大于 2 倍, *mexC*、*mexE* 和 *mexX* 大于 5 倍为增加。

**1.4.3 外排泵调控基因扩增** 对外排泵过度表达的菌株, 进行编码相应调控蛋白基因的扩增和测序。方法如下: 煮沸法提取细菌总 DNA 作为模板, 进行 *mexR* 和 *mexZ* 和 *nfxB* 基因扩增。引物见表 1。反应体系: 总反应体系 50 μL, 按 PCR 试剂说明书加样。循环参数: 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 循环 30 次; 最后延伸 72℃ 10 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖中进行凝胶电泳。扩增产物送上海英骏公司测序, 测序结果与 GenBank 数据库的相应基因进行比对。

表 1 4 种外排泵蛋白和调控蛋白基因引物				
基因	引物	序列 (5'-3')	长度 (bp)	参考文献
RT-mexA	A-F	CCTGCTGCTCGCGATTTTCGG	[ 6 ]	
	A-R	CCAGCAGCTTGTAGCGCTGG		
RT-mexC	C-F	TTGGCTATGGCCATCGCGTT	[ 6 ]	
	C-R	ATCGAAGTCCTGCTGGCTGA		
RT-mexE	E-F	ATCCCACTTCTCCTGGCGCT	[ 6 ]	
	E-R	GGTCGCCTTTCTTCACCAGT		
RT-mexX	X-F	GCGATGCGGATTGCGGAACA	[ 6 ]	
	X-R	TGGTCGCCCTATTCCTGCTG		
RT-rspL	L-F	GCAACTATCAACCAGCTG	[ 7 ]	
	L-R	GCTGTGCTCTTGCAGGTTGT G		
mexR	R-F	GATCAACCACATTTACATTAGG	550	[ 8 ]
	R-R	CGGATACCTGAAACGAAAAAC		
mexZ	Z-F	CTTATGATCTGCGGCGCCTTT	700	[ 8 ]
	Z-R	GCACCTGATGGCGGACGATT		
nfxB	B-F	ACGCGAGGCCAGTTTTCT	731	[ 8 ]
	B-R	ACTGATCTTCCCGAGTGCTCG		

2 结 果

2.1 CCCP 抑制后 CIP 的 MIC 值 共有 14 株菌在含 CCCP 的 MH 平板上检测 CIP 的 MICs 值较不含 CCCP 的 MH 平板下降为原值的 1/2~1/8。泵抑制剂未能降低其他 16 株菌和质控菌株 (ATCC27853) 的 MIC 值,结果详见表 2。

2.2 外排系统基因表达量变化 在上述 14 株菌中,外排系统 *mexA*、*mexC*、*mexE* 和 *mexX* 4 种外排基因逆转录实时定量 PCR 检测结果显示,以 *mexA* 和 *mexC* 基因表达增加为主,其中 2 株同时出现 *mexA* 和 *mexC* 表达量增加 (P9、P12);仅 1 株 *mexX* 高表达,未见 *mexE* 基因表达量增加;另有 1 株菌 (P10)4 种外排基因均未出现表达量增加。结果见表 3。

表 2 14 株菌 CIP MIC 值、外排泵蛋白和调控基因的变化					
菌株	MIC CIP (μg/mL)	MIC CIP (μg/mL) 含 CCCP	过度表达泵	突变调节基因	
ATCC *	0. 12	0. 12			
P21	>128	64	MexCD	<i>nfxB</i>	
			MexXY	<i>mexZ</i>	
P30	128	32	MerCD	<i>nfxB</i>	
P8	32	16	MexCD	<i>nfxB</i>	
P24	64	16	MexCD	<i>nfxB</i>	
P9	>128	32	MexAB	<i>nfxB</i>	
P10	>128	64			
P11	>128	64	MexAB	<i>mexR</i>	
P12	>128	32	MexAB	<i>mexR</i>	
			MexXY	<i>mexZ</i>	
P16	>128	64	MexAB	<i>mexR</i>	
P18	>128	128	MexAB	<i>mexR</i>	
P19	>128	128	MexAB	<i>mexR</i>	
P26	>128	64	MexAB	<i>mexR</i>	
P29	>128	128	MexAB	<i>mexR</i>	
P28	8	1	MexXY	<i>mexZ</i>	

注：\* 为铜绿假单胞菌 ATCC27853

表 3 外排系统基因表达结果				
菌株	外排系统			
	<i>mexA</i>	<i>mexX</i>	<i>mexC</i>	<i>mexE</i>
P21	1. 51	6. 10	9. 22	0. 48
P30	1. 23	2. 22	5. 67	1. 35
P8	0. 66	1. 04	6. 31	0. 82
P24	1. 05	2. 44	7. 51	0. 77
P9	11. 58	1. 49	2. 16	0. 41
P10	1. 21	1. 75	1. 96	1. 19
P11	8. 89	2. 21	0. 15	1. 52
P12	25. 06	7. 25	2. 08	0. 84
P16	7. 43	1. 56	1. 97	0. 98
P18	3. 64	1. 61	1. 78	1. 65
P19	2. 93	1. 15	1. 09	1. 82
P26	4. 59	0. 92	0. 98	0. 89
P29	3. 04	1. 67	1. 65	1. 12
P28	0. 94	21. 52	1. 87	1. 36
ATCC	1	1	1	1

注:*mexA* 大于 2 倍,*mexX*、*mexC* 和 *CmexE* 大于 5 倍为增加

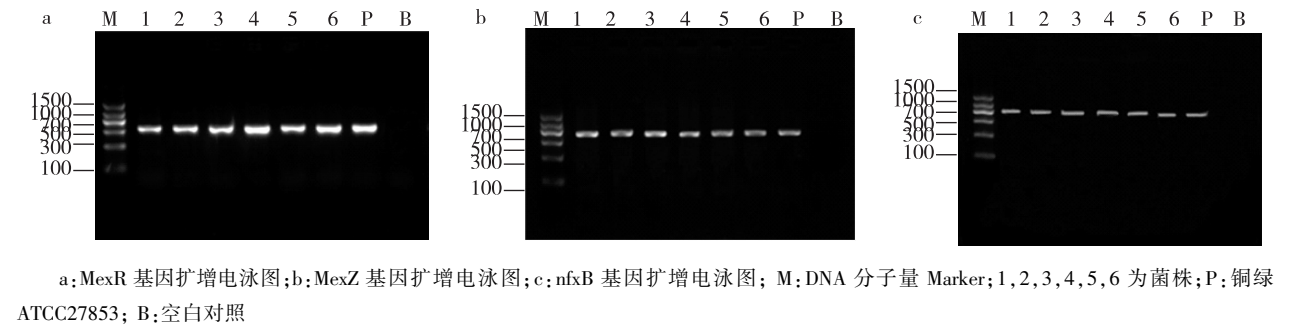


图 1 外排泵调控基因扩增电泳图



**2.3 外排泵调控基因突变** 出现外排泵过度表达的 14 株实验菌和对照菌铜绿假单胞菌 ATCC27853, 均扩增出编码调控蛋白的基因 *mexR* 和 *mexZ* 和 *nfxB* (图 1), 测序结果与基因库比对显示, *MexAB-OprM* 高表达的菌株, 调控基因 *mexR* 377 位 U→A 的点突变导致 *MexR* 蛋白 V126E 改变; *MexXY-OprM* 高表达的菌株, 调控基因 *mexZ* 584 位 G→A 点突变导致 *MexZ* 蛋白 G195E 改变; *MexCD-OprJnfxB* 高表达的菌株, 调控基因 *nfxB* 167 位 A→G 点突变导致 *NfxB* 蛋白 D56G 改变, 结果见表 2。

3 讨论

为了解外排泵的过度表达是否存在于本组喹诺酮类耐药铜绿假单胞菌中, 采用泵抑制剂 CCCP 抑制外排泵的方法进行 CIP 的 MICs 值检测, 筛选出有可能存在外排泵过度表达铜绿假单胞菌。然后再用实时荧光定量 PCR 检测外排泵连接蛋白的基因表达量。泵表达量增加的菌株, 采用扩增和测序技术分析编码调控蛋白的基因是否发生突变, 使调控蛋白的阻遏作用丧失。

实验结果显示本组实验菌近一半菌株 (46.7%) 存在外排泵的过度表达, 以 *MexAB-OprM* 和 *MexCD-OprJ* 型为主。*MexAB-OprM* 过度表达所占菌株数最多。外排泵高表达的部分菌同时还存在头孢他啶敏感, 而头孢吡肟的敏感性下降的非高活性头孢菌素酶介导的耐药表型, 符合外排泵过度表达会同时影响对头孢吡肟的敏感性报道<sup>[9-10]</sup>。P28 株为唯一出现 *MexXY-OprM* 高表达的菌株, 用 CCCP 抑制后 CIP 的 MIC 值由耐药的 8 μg/mL 降至敏感折点 1 μg/mL。相对于野生株较低的 MIC 值, 在 CCCP 抑制外排泵后 CIP 的 MIC 值也达到了敏感折点。P10 株未检测到实验设定的 4 种常见外排泵高表达, 到目前为止, 从铜绿假单胞菌中检出的外排泵已达 9 种甚至更多<sup>[11]</sup>, 不排除可能存在其他类型外排泵的高表达。

本项研究表明, 我院外排泵的高表达在喹诺酮耐药的铜绿假单胞菌中存在近 50%, 外排泵的高表达同时也提升了该菌对头孢吡肟等其他药物的耐药, 是需要密切关注和采取对应措施的流行趋势。

另外杨晓燕等<sup>[12]</sup>首次发现质粒介导的铜绿假单胞菌对喹诺酮类低水平耐药。实验室及时检出感染菌, 提供可靠的药敏结果, 有助于治疗方案的选择<sup>[13]</sup>。

【参考文献】

[1] 王颖, 黄梅, 奚海燕, 等. 耐喹诺酮铜绿假单胞菌药物作用靶位改变的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6): 18-20.

[2] Bhavnani SM, Callen WA, Forrest A, et al. Effect of fluoroquinolone Expenditures on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin in U. S. hospitals [J]. Am J Health Syst Pharm, 2003, 60(19): 1962-1970.

[3] 刘文广, 戴路明. 铜绿假单胞菌对喹诺酮类抗菌药物的耐药机制[J]. 医学综述, 2012, 11(18): 1650-1652.

[4] Drlica K, Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance [J]. Curr Top Med, 2003, 3(3): 249-282.

[5] McCay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GT. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture[J]. Microbiology, 2010, 156(Pt1): 30-38.

[6] Linares JF, López JA, Camafeita E, et al. Overexpression of the multidrug efflux pumps *MexCD-OprJ* and *MexEF-OprN* is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Bacteriol, 2005, 187(4): 1384-1391.

[7] Hammami S, Ghoszi R, Burghoffer B, et al. Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital[J]. Pathol Biol (Paris), 2009, 57(7-8): 530-535.

[8] Pasca MR, Dalla Valle C, De Jesus Lopes Ribeiro AL, et al. Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance clinical Isolates [J]. Microb Drug Resist, 2012, 1(18): 23-32.

[9] 刘洋, 李方法, 蒋伟燕, 等. 外排泵 *MexAB-OprM* 在多重耐药铜绿假单胞菌中的作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 4(20): 830-833.

[10] Laurent P, Vincent C, Patrice N, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(3): 474-478.

[11] Anna F, Sergi M, Ernest G, et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones [J]. Microb Biotechnol, 2009, 2(3): 40-61.

[12] 杨晓燕, 张永标, 梁彩倩, 等. 质粒介导铜绿假单胞菌对喹诺酮类耐药机制的研究[J]. 中华医院感染杂志, 2013, 11(23): 2524-2526.

[13] 黄梅, 王颖, 王卫萍, 等. 两种吸附抗生素血培养瓶对血流感染检测能力的比较[J]. 东南国防医药, 2014, 16(2): 117-120.

(收稿日期: 2015-10-10; 修回日期: 2015-10-21)  
(本文编辑: 齐名; 英文编辑: 王建东)