

外排泵 adeB 基因与鲍曼不动杆菌多重耐药的关系

阳志勇¹, 尹文君², 谢海涛², 张秋桂²

(1. 南华大学附属第一医院输血科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附属第一医院检验科)

摘要: **目的** 探讨临床分离鲍曼不动杆菌主动外排基因 adeB 的表达与其多重耐药的关系。 **方法** 对临床分离的 64 株鲍曼不动杆菌采用纸片扩散法检测对抗菌药物的敏感性; 罗丹明 6G 检测外排活性, RT-PCR 检测外排泵基因 adeB 的分布和表达水平。 **结果** 64 株鲍曼不动杆菌耐 0~2 种抗菌药物 4 株, 耐 3~5 种抗菌药物 33 株, 耐 6~8 种抗菌药物 27 株; 罗丹明 6G 外排实验显示, 外排增强的多重耐药菌株其外排基因 adeB 的表达明显增高。 **结论** 药物主动外排增强与鲍曼不动杆菌多重耐药相关; 外排基因的过度表达可能是导致鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 多重耐药; adeB

中图分类号: R378.21 **文献标识码:** A

Relationship of Multidrug Resistance with Active Efflux Gene adeB in Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii

YANG Zhiyong, YIN Wenjun, XIE Haitao, et al

(The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship of multidrug resistance with adeB gene in the clinical isolates of Acinetobacter baumannii. **Methods** The agar doubling dilution method was used to identify the minimal inhibitory concentration (MIC) of 8 antibiotics for Acinetobacter baumannii. The efflux of Rhodamine 6G in 64 strains of clinical Acinetobacter baumannii was tested and the Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of active efflux gene adeB. **Results** Among 64 strains of clinical Acinetobacter baumannii 4 strains was resistant to 0~2 antibiotics, 33 strains was resistant to 3~5 antibiotics, 27 strains was resistant to 6~8 antibiotics. The expression levels of efflux gene adeB in the multiple drug-resistant strains which enhanced the efflux were also increased. **Conclusions** The effect of active efflux system of adeB may be one of the important multidrug resistance mechanisms of Acinetobacter baumannii.

Key words: Acinetobacter baumannii; multiple resistance; adeB

鲍曼不动杆菌 (Acinetobacter baumannii, Ab) 是常见的导致医院感染的主要条件致病菌之一, 广泛存在于自然界与机体表面, 当机体的抵抗力以及免疫能力低下更易导致机会感染^[1-3]。近年来, 随着抗菌药物及免疫抑制剂的广泛应用, 多重耐药呈逐年上升的趋势, 而报道鲍曼不动杆菌耐药的主要机制仍由主动外排作用所介导^[1-3]。本研究通过罗丹明 6G 筛选出外排明显的菌株, 再通过 RT-PCR 检测外排泵基因 adeB 的分布和表达水平, 进而分析外排泵基因

adeB 与鲍曼不动杆菌多重耐药之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 64 株临床分离株来自 2013 年 1 月~2014 年 2 月南华大学附属第一医院住院患者, 标本来源主要为痰、伤口分泌物、血液、引流物、大便和尿液。

1.1.2 主要试剂及仪器 罗丹明 6G 购自 Sigma 公司; DNA Marker、RT-PCR 逆转录试剂盒购自北京鼎

国公司;Trizol 试剂盒和 DNA 纯化试剂盒均购自天根生物公司;ABI7500 Realtime PCR 仪;法国 VL 公司凝胶成像分析系统。adeB 引物:P1:5'-GTATGAATTGATGCTGC-3';P2:5'-CACTCGTAGCCAATACC-3';内参照基因 16sRNA:C1:5'-GGAGGAAGGTGGGGATGACG-3';C2:5'-ATGGTG TGACGGGCGGTGTG-3'均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及药敏实验 采用法国生物梅里埃 ATB 药敏系统进行药物敏感实验, BD CRYSTAL 细菌鉴定系统进行细菌检测, 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922;金黄色葡萄球菌 ATCC25923;绿脓假单胞菌 ATCC27853。根据药敏结果显示耐药种类的数量将 64 株受检菌分为 A 组(耐 0~2 种抗菌药物)、B 组(耐 3~5 种抗菌药物)和 C 组(耐 6~8 种抗菌药物)。

1.2.2 罗丹明 6G 外排实验 将单个菌落接种于 LB 培养基中, 37℃ 恒温箱培养 8 h, 收集 2 mL 在 600 nm 波长处的吸光值(OD₆₀₀)为 1.0 的菌悬液, 用 PBS 1 mL 洗涤 3 次。取 1 mL 混合 PBS 菌悬液, 加罗丹明 6 G, 终浓度为 5 μmol/L, 放置于 37℃ 震荡仪 30 min, PBS 水洗。将其加入 1 mL 含 1% 葡萄糖的 PBS 中, 37℃ 水浴震荡仪 15 min。取 0.8 mL 上清液测定其荧光强度。1% 葡萄糖 PBS 溶液为空白对照。计算公式为: 罗丹明 6G 外排活性 ES = (样本的荧光强度 - 空白管的荧光强度) / OD₆₀₀。

1.2.3 提取 DNA 于 1 mL Trizol 中加入 1 mL 菌液, 按 5:1 加入氯仿, 振荡约 30 S, 4℃ 静置。13 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入等量的异丙醇混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 再加入 75% 乙醇 300 μL 混匀, 12 000 r/min 离心 1 min, 常温阴干 10 min, 加入 30 μL 经焦碳酸二乙酯处理过的纯水。

1.2.4 DNaseI 消化 DNA 及逆转录 DNaseI 消化 DNA: 总 RNA 20~50 μg; DNase (DNase-free) 2 μL; 10 × DNase Buffer 2 μL; 10 × DNaseI Buffer 5 μL; RNase Inhibitor 0.55 μL; DEPC 处理水 50 μL, 37℃ 反应 20~30 min, 加入 DEPC 50 μL, 加入异戊醇/氯仿/苯酚(1:24:25) 10 μL 混匀, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清液, 加入异戊醇/氯仿(1:24), 同上离心取上清液, 加入 3M NaOAc (pH5.2) 10 μL, 加入 250 μL 无水乙醇, -20℃ 放置 20~30 min, 同上离心回收沉淀, 75% 乙醇清洗沉淀, 同上离心回收沉淀, 加 DEPC 20 μL 处理沉淀, -70℃ 保存。

逆转录: 按试剂盒说明加以改良进行, RP1 μL,

10 mm dNTP mixture 1 μL, 5 × RT buffer 4 μL, 酶混合液 1 μL, 总 RNA 样品 1 μL, DEPC 11 μL, 30℃ 保温 10 min, 37℃ 30 min, 95℃ 5 min, 4℃ 5 min, 1 个循环将上述逆转录的产物进行 PCR 扩增。扩增体系: 25 μL, cDNA 模板 1 μL, adeB 引物 1 μL, 内参引物 1 μL, Master mix 12.5 μL, 去离子水 7.5 μL, 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 25 个循环, 延伸 7 min, 置 4℃ 保存。在同等条件下通过凝胶成像系统测定 PCR 产物的密度值, 计算出 16sRNA 与 adeB 的密度比值。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 软件进行数据分析, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异用 F 检验, 组与组之间比较用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 罗丹明 6G 外排实验 鲍曼不动杆菌罗丹明 6G 外排活性以公式 $ES = (\text{样本的荧光强度} - \text{空白管的荧光强度}) / OD_{600}$ 为计算依据, 计算出 A、B、C 组的外排量分别为 $0.253 \pm 0.010 \mu\text{mol/L}$ ($n=4$)、 $0.570 \pm 0.021 \mu\text{mol/L}$ ($n=33$)、 $0.793 \pm 0.035 \mu\text{mol/L}$ ($n=27$), 可见 $ESA < ESB < ESC$ ($P < 0.05$)。表明 C 组的罗丹明 6G 外排活性最强。

2.2 总 RNA 检测 提取 64 株鲍曼不动杆菌总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果可见 16 s 和 23 s 两个清晰的条带, 说明 RNA 无明显降解(见图 1)。

2.3 adeB 基因表达 A、B、C 三组中, A 组的 4 株为非多重耐药菌株, 罗丹明 6G 外排实验无明显阳性, B 组的 33 株与 C 组的 27 株为多重耐药菌株, 罗丹明 6G 外排实验阳性, RT-PCR 测定该三组的 adeB 基因的 mRNA 表达水平。以总 DNA 为模板进行逆转录, mRNA 半定量结果示: C 组表达量为 2.506 ± 0.253 ; B 组表达量为 2.152 ± 0.186 ; A 组表达量为 1.652 ± 0.175 ; 可见 B 组和 C 组 adeB mRNA 的表达量均高于 A 组(见图 2, 3)。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌为一类生化反应不活跃的非发酵革兰阴性杆菌, 广泛存在于自然界, 也可存在于人体体表的条件致病菌, 是引起医院感染的常见致病菌, 其耐药机制复杂, 主动外排机制仍然是其耐药的主

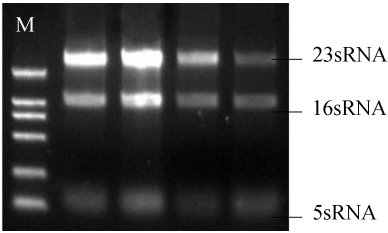


图1 鲍曼不动杆菌总 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

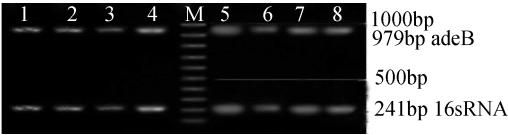


图2 部分鲍曼不动杆菌 *adeB* mRNA 基因扩增图 1~4: A 组; 5~8: B 组; M: marker

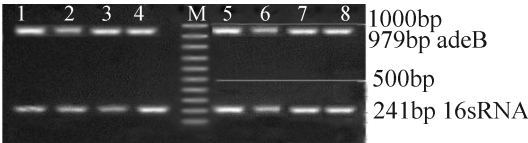


图3 部分鲍曼不动杆菌 *adeB* mRNA 基因扩增图 1~4: A 组; 5~8: C 组; M: marker

要机制之一,经证实 AdeA、B、C 是鲍曼不动杆菌所特有的生物外排胞膜蛋白基因^[3-6]。

有机染料罗丹明 6G 是常用检测微生物外排蛋白功能的一种底物,本实验将罗丹明 6G 作为 AdeA、B、C 的作用底物,筛选出由主动外排介导的多重耐药鲍曼不动杆菌,三组鲍曼不动杆菌对罗丹明 6G 外排量分别为 $0.253 \pm 0.010 \mu\text{mol/L}$ (A 组)、 $0.570 \pm 0.021 \mu\text{mol/L}$ (B 组) 和 $0.793 \pm 0.035 \mu\text{mol/L}$ (C 组),C 组的罗丹明 6G 外排活性最强,B 组次之,三组间差异均有统计学意义。表明多重耐药组(C 组,B 组)较非多重耐药组(A 组)外排程度更高,进一步提示外排泵蛋白的过度表达,易致抗菌药物的外排增加,导致多重耐药的产生。

RT-PCR 是将 PCR 和 RNA 的反转录相结合的技术,并广泛应用于基因检测^[5-7]。为了进一步研究生物外排泵蛋白 B 的表达水平与外排强度的相关性,本研究采用 RT-PCR 技术检测该三组鲍曼不动杆菌的 *adeB* 基因的 mRNA 表达水平,mRNA

半定量结果显示:C 组表达量为 2.506 ± 0.253 ;B 组表达量为 2.152 ± 0.186 ;A 组表达量为 1.652 ± 0.175 ,C 组和 B 组均大于 A 组,C 组大于 B 组,各组间差异均有统计学意义,说明多重耐药菌株的罗丹明 6G 外排增加,其外排基因 *adeB* 的表达水平也较非多重耐药菌株(A 组)高,结果提示该菌株耐药种类越多,其外排基因 *adeB* 的表达水平也越高。进一步证实了鲍曼不动杆菌主动外排基因的高水平表达是多重耐药的重要耐药机制之一。

鲍曼不动杆菌的耐药机制复杂,由主动外排介导的多重耐药机制仍可能是其主要的耐药机制,外排基因的高表达能导致对多种抗菌药物的外排,外排泵抑制剂能够部分逆转这种外排。因此,加强外排泵的研究,为开发更有效的外排泵抑制剂,避免药物成为外排泵的底物,为临床更有效地避免抗菌药物的耐药具有重要的意义。

参考文献:

[1] 匡艳华,袁秀琴. 2004~2007 年鲍曼不动杆菌的分布特征及耐药性分析[J]. 南华大学学报:医学版,2008, 36(5):646-648.

[2] 葛学顺,陶晓军,陈维开,等. 鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药情况分析[J]. 中国实验诊断学,2014, 18(7):1162-1164.

[3] 张辉,张小江,徐英春,等. 2011 年中国 CHINET 不动杆菌属细菌耐药性监测[J] 中国感染与化疗杂志, 2013,13(5):342-347.

[4] 杨爱平,李向阳. 外排泵 *adeB* 基因表达与鲍曼不动杆菌泛耐药的关系[J]. 浙江检验医学,2010,8(1):7-10.

[5] 刘振茹,凌保东. 鲍曼不动杆菌耐药性与 16s rRNA 甲基化酶基因表达相关性研究[J]. 川北医学院学报, 2012,27(6):526-528

[6] Yangsoon L, Jong HY, Chang-KK. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene[J]. Ann Clin Lab Sci,2010,40(1):43-48.

[7] 王同慧,凌保东. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌 *adeB* 外排基因表达与多重耐药相关的研究[J]. 中国抗生素杂志,2013,38(11):859-862.

(此文编辑:秦旭平)