

• 论 著 •

主动外排系统与阴沟肠杆菌多重耐药关系的研究

胡小行¹, 李国明^{1△}, 刘 军², 石正琪¹

(广东医学院: 1. 微生物学与免疫学教研室, 2. 病原生物学实验室, 广东湛江 524023)

摘要:目的 观察泵抑制剂氟氯苯脒对阴沟肠杆菌耐药水平的降低作用, 并扩增外排基因, 以探讨主动外排系统的基因分布及与阴沟肠杆菌多重耐药的关系。方法 采用琼脂稀释法测定氟氯苯脒应用前后 83 株阴沟肠杆菌对头孢他啶、阿米卡星、阿奇霉素、左氧氟沙星、四环素的最小抑菌浓度变化, PCR 扩增外排系统基因 *acrA*、*acrB*、*toiC*, PCR 产物连接转化后采用 sanger 末端终止法进行测序。结果 以上述 5 种抗生素为底物, 分别有 30、36、19、32、28 株显示外排表型阳性。PCR 扩增结果显示, 分别有 55、57、62 株菌检测得到 *acrA*、*acrB*、*toiC*, 并通过测序证实。结论 主动外排泵抑制剂可降低阴沟肠杆菌对抗生素的耐药水平, 相对于非多重耐药株, 外排泵对多重耐药株的影响较大。主动外排系统是阴沟肠杆菌多重耐药的重要机制之一。

关键词: 肠杆菌, 阴沟; 抗药性, 细菌; 主动外排作用; 外排基因

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 01. 008

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0018-03

The Study of Relationship between Active Efflux System and Multidrug resistance of *Enterobacter cloacae*

Hu Xiaohang¹, Li Guoming^{1△}, Liu Jun², Shi Zhengqi¹

(1. Department of Microbiology, Zhanjiang 524023, China; 2. Pathogen Biology Laboratory, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To observe the effect of efflux inhibitor CCCP on the resistance decreased level of *E. cloacae* and analyze distribution of efflux system genes. To explore the relationship between active efflux system and multidrug resistance of *E. cloacae*. Methods To detect minimum inhibitory concentration change of *E. cloacae* to ceftazidime, amikacin, azithromycin, levofloxacin and tetracycline with and without CCCP by using agar dilution method, PCR amplified *acrA*, *acrB*, *toiC*, PCR products were confirmed by Sanger termination sequencing. Results Efflux phenotype showed to be positive in 30, 36, 19, 32 and 28 strains to the five antibiotics, respectively, with 10 μg/mL CCCP. PCR amplification showed 55, 56, 61 strains were detected to carry *acrA*, *acrB*, *toiC*, respectively, and confirmed by DNA sequencing. Conclusion The efflux pump inhibitor CCCP can increase susceptibility to antibiotics of *E. cloacae*. Compared with susceptible strains, the effect of active efflux system on resistant strains is more significant. Active efflux system is one of important mechanisms leading to multidrug resistance of clinical isolated *E. cloacae*.

Key words: *enterobacter cloacae*; active efflux system; CCCP; efflux genes

主动外排系统是 1 种特殊的能量依赖性外排系统, 以质子移动力 (PMF) 或 ATP 的分解为能量来源, 能将进入体内的药物泵出体外, 使菌体内的药物浓度不足而导致耐药。1980 年, Ball 等^[1]在研究大肠杆菌对四环素的耐药性时首次发现了抗生素的主动外排机制。随后研究者又逐渐发现多种外排系统, 其中研究比较透彻的是大肠杆菌的 AcrAB。近年来, 阴沟肠杆菌耐药水平不断上升, 这可能与主动外排作用有关, 但这方面的研究尚不多见。氟氯苯脒 (CCCP) 作为 1 种主动外排泵抑制剂, 通过抑制外排泵能量来源起作用。作者通过研究泵抑制剂 CCCP 对粤西地区 83 株阴沟肠杆菌耐药水平的影响, 对外排系统基因进行扩增, 以探讨主动外排机制与阴沟肠杆菌多重耐药的关系。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 2008 年 6 月至 2010 年 5 月临床分离阴沟肠杆菌来自广东医学院附属医院和湛江中心人民医院门诊和住院感染者标本。

1.2 主要试剂 头孢他啶 (CAZ) 购自海南卫康制药 (潜江) 有限公司, 阿奇霉素 (AZM) 和左氧氟沙星 (LEV) 购自浙江医药股份有限公司新昌制药厂, 阿米卡星 (AMK) 购自大理药业有限公司, 四环素 (TET) 购自北京经科宏达技术有限公司。CCCP 标准品购自 sigma 公司。LB 肉汤、营养琼脂培养基、MH 培养基均购自杭州天和微生物试剂有限公司。DNA 提取试剂盒、PCR 反应体系、DNA Marker、琼脂糖凝胶回收试剂盒、载体 pMD18-T 均购自大连宝生物生物技术有限公司。琼

脂糖购自广州英韦创津。感受态细胞制备试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 分离鉴定 阴沟肠杆菌接种于营养琼脂培养基, 37 °C 培养 18~24 h, 挑取单个菌落, 配制成菌液, 利用 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪 (法国生物梅里埃公司) 进行鉴定, 细菌培养方法参照《全国临床检验操作规程》2 版进行操作。

1.4 外排表型测定 采用琼脂稀释法测定^[2]。抗生素的终浓度依次为 0.062 5、0.125 0、0.500 0、1.000 0……256.000 0、512.000 0 mg/L, 药液和培养基按 2 mL : 18 mL 配制药用琼脂平板, 用生理盐水稀释菌液为 0.5 个麦氏浊度, 取 2 μL 菌液接种于培养基相应位置, 37 °C 培养 18~24 h, 读取最小抑菌浓度 (MIC)。药敏结果均依照临床实验室标准化研究所 (CLSI) 2006 年 M100-S16 标准判读^[3]。以大肠埃希菌 (ATCC25922) 作为质控菌株。制备同时含有 CCCP 的 MH 琼脂, 使其终浓度为 10 μg/mL, 检测对头孢他啶、阿米卡星、阿奇霉素、左氧氟沙星、四环素的 MIC 值。以加入 CCCP 后的 MIC 值比不加时的 MIC 值, 降低 4 倍或以上者作为外排表型阳性判定标准。同时, 将各菌株接种于只含上述浓度的 CCCP 而不含抗生素的 MH 琼脂作为生长对照^[4]。

1.5 PCR 扩增外排基因

1.5.1 DNA 模板制备 挑取营养琼脂培养基上过夜培养的单个菌落, 接种于 2 mL LB 肉汤中过夜培养, 然后严格按照 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板。

△ 通讯作者, E-mail: lgming@gdmc.edu.cn.

1.5.2 扩增引物序列及设计 *acrA* 引物根据登录号为 AJ306389 的铜绿假单胞菌全序列设计, *acrB* 和 *toiC* 引物根据登录号为 NC_014121 的阴沟肠杆菌设计, 各引物序列及主要反应条件见表 1。

1.6 PCR 扩增 反应体系总体积为 50 μ L: 蒸馏水 35 μ L, 模板 1.75 μ L, dNTP 4 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, 上下游引物各 2 μ L, Taq 酶 0.25 μ L, 离心混匀后置 PCR 仪上进行扩增。 *acrA* 基因反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。 *acrB* 基因反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。 *toiC* 基因反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸

10 min。扩增产物均保存于 4 $^{\circ}$ C。每次都以蒸馏水为阴性对照, 以已测序证实菌株为阳性对照。取 5 μ L PCR 产物和 1 μ L 6 \times loading buffer 充分混合后加样, *acrA* 和 *acrB* 以 DL2000 为 Marker 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, *toiC* 以 DL500 为 Marker 在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 80 V 电泳 50 min, 然后用凝胶成像系统观察并照相。

1.7 测序及序列分析 PCR 产物用凝胶回收试剂盒进行纯化, 与载体 pMD18-T 连接过夜, 然后转化到感受态细菌中, 接种于含 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 平板中过夜培养, PCR 扩增鉴定连接成功后, 转化菌液送广州英俊公司进行测序。用美国国立生物医学信息中心 (NCBI, <http://www.nlm.nih.gov/>) 上的 blast 分析, 将测序结果与 Genbank 中的核苷酸序列进行同源性比较。

表 1 引物序列和主要反应条件

扩增基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)	延伸时间(s)
<i>acrA</i>	F: AAG ATA TCA TGA ACA AAA ACA GAG GGT TAA CG	1 194	58	40
	R: AAA AGC TTT TAA GAC TTG GTT TGT TCA GAC TG			
<i>acrB</i>	F: GAA AGG CCA ACA GCT TAA C	800	54	40
	R: GAG CTG GAG TCA GGA TCA AC			
<i>toiC</i>	F: TGC CGC AGT TAG GCT TAG GT	139	56	20
	R: CTC AGT TCA CGC CGT TTG GA			

2 结 果

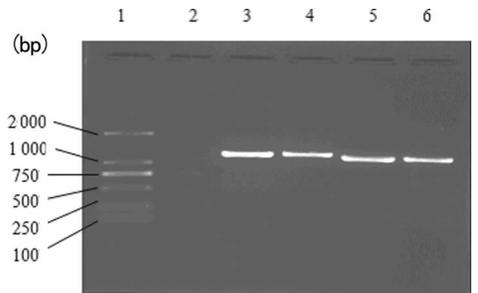
2.1 CCCP 对药物抗菌活性的影响 应用泵抑制剂 CCCP 共筛选出 68 株外排泵阳性菌株, 以头孢他啶、阿米卡星、阿奇霉素、左氧氟沙星、四环素为底物, 分别有 30、36、19、32、28 株阴沟肠杆菌在 10 μ g/mL CCCP 条件下 MIC 值降低 4 倍或 4 倍以上, 其中有 19 株同时对 3 种及 3 种以上抗生素有外排作用。加入 CCCP 后, 对 5 种药物的耐药率均呈不同程度下降, 下降率分别为 15.7%、10.9%、6.0%、10.8%、10.9%, 经 *t* 检验, 比较 CCCP 应用前后 5 种抗生素 MIC 值变化, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 应用 CCCP 前后 5 种抗生素对阴沟肠杆菌 MIC 值变化情况

抗生素	几何平均数(mg/L)	MIC(mg/L)	R[n(%)]
CAZ	28.0	0.062 5~512.000 0	60(72.3)
CAZ+CCCP	13.3	0.062 5~256.000 0	47(56.6)
AMK	84.3	1.000 0~512.000 0	52(62.7)
AMK+CCCP	16.9	0.500 0~128.000 0	41(49.4)
AZM	84.3	8.000 0~512.000 0	69(83.1)
AZM+CCCP	49.8	2.000 0~256.000 0	64(77.1)
LEV	8.3	0.062 5~256.000 0	52(62.7)
LEV+CCCP	3.8	0.062 5~128.000 0	43(51.9)
TET	87.9	8.000 0~512.000 0	72(92.8)
TET+CCCP	41.1	4.000 0~128.000 0	68(81.9)

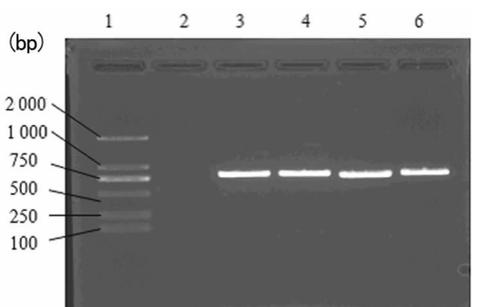
2.2 外排泵基因 *acrA* 扩增结果 83 株阴沟肠杆菌中, 55 株菌检出 *acrA* 基因, 检出率为 66.27%, 目的片段 1 194 bp。57 株菌检出 *acrB* 基因, 检出率 68.67%, 目的片段 800 bp。62 株菌检出 *toiC* 基因, 检出率 74.70%, 目的片段 139 bp。外排泵基因 *acrA*、*acrB*、*toiC* 扩增产物电泳结果分别见图 1、2 和 3。3 种基因全部为阳性的菌株有 51 株, 占总数的 61.45%; 全部为阴性的有 17 株, 其中部分基因检出的菌株有 15 株, 根据基因检出情况, 将细菌分为 5 个组, 结果见表 3。测序结果与 Genbank 上的相应基因信息进行 Blast 比对分析, 所测 *acrA* 基因序列与登录号为 DQ679966 阴沟肠杆菌同源性为 95%, *acrB*

基因序列与登录号为 AM287287 阴沟肠杆菌同源性为 100%, *toiC* 基因序列与登录号为 AM287288 同源性为 100%。



注: 1 表示 DNA Marker(DL 2 000 bp); 2 表示阴性对照; 3 表示阳性对照; 4 表示待测标本。

图 1 *acrA* 基因 PCR 扩增结果电泳图



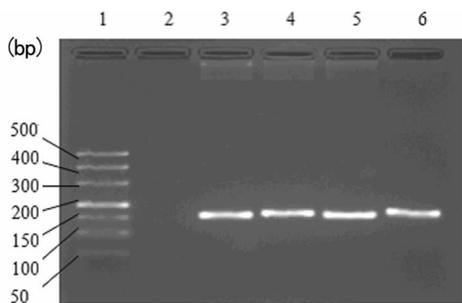
注: 1 表示 DNA Marker(DL 2 000 bp); 2 表示阴性对照; 3 表示阳性对照; 4 表示待测标本。

图 2 *acrB* 基因 PCR 扩增结果电泳图

表 3 外排系统基因分组情况

组别	<i>acrA</i>	<i>acrB</i>	<i>toiC</i>	n(%)
1	+	+	+	51(61.45)
2	+	+	-	4(4.82)
3	-	+	+	2(2.41)
4	-	-	+	9(10.84)
5	-	-	-	17(20.48)

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。



注:1 表示 DNA Marker(DL 2 000 bp);2 表示阴性对照;3 表示阳性对照;4 表示待测标本。

图 3 *toiC* 基因 PCR 扩增结果电泳图

3 讨 论

随着抗生素广泛应用,细菌耐药性越来越严重,甚至出现了多重耐药株。外排泵系统作为细菌的 1 种非特异性耐药机制,可引起细菌对部分药物的固有耐药。Schumacher 等^[5]报道,由于 RND 家族外排系统的有效表达,导致细菌体内利奈唑胺浓度明显下降。后来大量研究证明,外排泵和许多细菌耐药性有关,如大肠埃希菌、绿脓杆菌、枯草杆菌、鲍曼不动杆菌等^[6]。目前共发现 20 多种外排系统,根据氨基酸序列的同源性可分为 5 个超家族:易化子家族、多药和毒物外排家族、耐药结节细胞分化家族、小多重耐药家族以及 ATP 结合盒家族^[7]。其中耐药结节细胞分化家族 AcrAB-TolC 外排系统是导致革兰阴性菌多重耐药性的重要因素,以消耗质子动力而实现外排,由泵转运子 AcrB、周质融合蛋白 AcrA、外膜通道蛋白 TolC 三部分构成^[8-10]。

CCCP 是 1 种解耦联剂,通过抑制质子转运阻断外排泵能量来源而破坏其主动外排作用,使药物在细菌体内的积累量增加,从而使细菌对药物的敏感性增加。本次研究结果显示,应用 CCCP 后,83 株阴沟肠杆菌对药物的耐药水平呈现不同程度下降,表明 CCCP 对于药物外排作用有预定的抑制功能,主动外排系统在阴沟肠杆菌中普遍存在。其中有 68 株(81.93%)在 10 μg/mL CCCP 条件下,对药物的 MIC 值降低 4 倍或 4 倍以上,部分多重耐药菌株的药物敏感性大幅度提高,甚至达到了敏感株水平,这表明主动外排系统在阴沟肠杆菌多重耐药中具有重要作用,外排泵抑制剂的开发对于治疗由外排泵引起耐药的细菌引起的感染具有重要意义。本次研究结果显示,有 19 株(22.90%)菌同时对 3 种及 3 种以上抗生素有外排作用,表明外排系统具有底物广泛性特点,这也是外排系统导致细菌多重耐药的 1 个重要原因。

本次 PCR 扩增结果显示,83 株阴沟肠杆菌 *acrA*、*acrB*、*toiC* 3 种外排系统的基因阳性率均大于 65.00%,55 株菌检出 *acrA* 基因,检出率为 66.27%;57 株菌检出 *acrB* 基因,检出率为 68.67%;62 株菌检出 *toiC* 基因,检出率为 74.70%。其中 3 种基因均为阳性的菌株有 51 株(61.45%),全部为阴性的有 17 株(20.48%),表明外排系统在多重耐药阴沟肠杆菌中广泛存在,与外排表型测定结果基本一致。结合外排表型实验分析,68 株外排阳性菌株中有 60 株外排基因阳性,其中 49 株 3 种外排基因均为阳性,6 株 3 种外排基因均为阴性,表明阴沟肠杆菌中还存在其他外排系统;15 株外排表型阴性菌株中有 11 株 3 种基因均阴性,但也有 8 株外排基因测定阳性,其中 3 种基因均阳性有 2 株,这表明可能由于外排系统在这些菌株中作用不明显、药物本身结构差异性或者不同基因之间表达水平不同,导致测定结果具有一定的差异。结合药敏实验结果分析得

知,外排系统既存在于耐药株又存在于敏感株中,但对耐药株的影响更大。

综上所述,CCCP 作为 1 种质子转运解耦联剂,能提高细菌对部分药物的敏感性。主动外排系统普遍存在于阴沟肠杆菌中,与其耐药性尤其是多重耐药具有一定的关系。但是关于外排系统本身的研究及与耐药性的关系还有一系列问题要阐明,如外排基因表达水平与细菌耐药水平的关系,外排泵底物与耐药表型的关系及外排基因表达调控机制等。因此,对于阴沟肠杆菌外排系统的研究,必将为寻求新的、更有效的外排泵抑制剂或开发新的抗生素奠定坚实的理论基础。

参考文献

- [1] Ball PR, Shales SW, Chopra I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, 93(1):74-81.
- [2] 刘蓉, 谢芬, 管晓琳, 等. 噻克硝唑对厌氧菌的体内外抗菌活性[J]. *四川生理科学杂志*, 2008, 23(3):120-123.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16. CLSI, 2006.
- [4] Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists [J]. *Pharmacotherapy*, 2003, 23:916-924.
- [5] Schumacher AR, Trittler JA, Bohnert, et al. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*; role of enhanced efflux pump activity and inactivation[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59:1261-1264.
- [6] Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria[J]. *Anti-microb Agents Chemother*, 2002, 44(9):2233-2241.
- [7] Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56(1):20-51.
- [8] Jie Z, Sheng HC, Jiang HM, et al. Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhimurium*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(1):95-102.
- [9] Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. RamA, a transcriptional regulator, and AcrAB, an RND-type efflux pump, are associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Enterobacter cloacae*[J]. *Microb Drug Resist*, 2007, 13:1-6.
- [10] Simona B, David L, Avrille G, et al. Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(2):278-283.