·基础实验研究论著·

亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌外膜蛋白与外排泵基因 adeB 分析*

张之烽，周万青，曹小利，宁明哲，沈　瀚，张　葵△
（南京大学医学院附属鼓楼医院检验科，江苏南京 210008）

摘　要：目的　了解耐亚胺培南鲍曼不动杆菌中外膜蛋白表达以及外排泵基因 adeB 的分布情况。**方法**　收集该院 2008 年 9 月至 2010 年 12 月亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌 65 株，采用 PCR 方法扩增外膜蛋白 CarO 编码基因及外排泵 adeB 基因；聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析耐药菌与敏感菌外膜蛋白表达的差异。**结果**　65 株菌均检出 CarO 编码基因与 adeB 基因，其中 2 株菌 CarO 编码基因上游存在 ISAba1 插入序列。SDS-PAGE 显示，耐药菌株与敏感菌株在外膜蛋白上存在主要有大约 24×10^3 蛋白的缺失和 48×10^3 蛋白的高表达。**结论**　外膜蛋白 CarO 和 adeB 基因在亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中广泛存在，adeB 基因的高表达以及外膜蛋白表达的差异是鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药的重要机制。

关键词：亚胺培南；　药物耐受性；　不动杆菌属；　抗药性，微生物
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.001　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)23-2817-02

Analysis on the outer membrane protein and efflux pump gene adeB among the imipenem-resistant Acinetobacter baumannii*

Zhang Zhifeng, Zhou Wanqing, Cao Xiaoli, Ning Mingzhe, Shen Han, Zhang Kui△
(*Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu* 210008, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the distribution of outmembrane protein encoding and efflux pump gene adeB among the imipenem-resistant Acinetobacter baumannii. **Methods**　65 imipenem-resistant Acinetobacter baumannii were collected from 2008 September to 2010 December. Polymerase chain reaction (PCR) was implemented to screen the carO and adeB genes. SDS-PAGE was carried out to analyze the differences on the expressions of the Outer membrane proteins between the imipenem-resistant and susceptible strains. **Results**　All the 65 strains contained the carO and adeB genes. Additionally, ISAba1 was detected in the upstream of CarO coding genes in two strains. SDS-PAGE displayed that there was approximately a 24-kDa protein missing and a higher expression in 48-kDa protein. **Conclusion**　There is a wide distribution of CarO encoding and adeB genes among imipenem resistance Acinetobacter baumannii. And imipenem resistance may result from the high expression of adeB and different expression of outmembrane proteins.

Key words: imipenem;　drug tolerance;　acinetobacter;　drug resistance, microbial

近年来随着抗菌药物的广泛使用，临床分离的鲍曼不动杆菌的耐药性日益严峻，尤其在重症监护病房，亚胺培南耐药菌株使得碳青霉烯类药物的使用受限[1]。鲍曼不动杆菌耐药主要是由于灭活酶的产生，外膜蛋白的缺失以及外排泵的高表达等作用产生[2]。法国学者在鲍曼不动杆菌中发现 adeABC 系统[3]，Limansky 等[4]发现的 CarO 通道蛋白为亚胺培南进入细菌的孔道，其表达的降低或缺失与外排泵一起介导鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药[5-6]。为了解本院多药耐药鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药的机制，本研究对 adeB 基因和 CarO 蛋白进行了相关检测分析。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　收集本院 2008 年 9 月至 2010 年 12 月临床分离的耐亚胺培南的鲍曼不动杆菌 65 株，均属多药耐药菌。其中分离自痰液的 43 株、分泌物 9 株、腹水 3 株、导管头和脑脊液各 2 株、尿液和血液各 1 株，其他 5 株，无重复分离株。按来源科室分类，分别为 ICU 27 株，老年科病房 14 株，呼吸科 7 株，其余 17 株。大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 作为药敏试验质控菌株。

1.2　仪器与试剂　PCR 扩增仪为 PE 公司产品；SDS-PAGE 电泳仪为 Bio-Rad 公司产品；凝胶成像分析系统为捷达公司；PCR 引物由英俊公司合成；测序仪为 ABI 公司产品。Taq DNA 聚合酶、10×buffer（含 Mg^{2+}）、dNTPs 为 TaKaRa 公司产品；DNA 标记物为北京全式金公司产品；蛋白分子标记物为 Fermentas 公司产品。ATB 32GN 细菌鉴定板条为法国生物-梅里埃公司产品。

1.3　方法

1.3.1　细菌鉴定和药敏试验　采用 ATB 32GN 鉴定板条对临床分离的鲍曼不动杆菌进行生化鉴定，K-B 法进行药敏试验。

1.3.2　外膜蛋白 CarO 及外排泵 adeB 基因的检测　煮沸法提取细菌基因组 DNA。基因的扩增均参照文献[3-4]合成引物，其中，外膜蛋白 CarO 基因的上游引物 5′-ATG AAA GTA TTA CGT GTT TTA GTG-3′；下游引物 5′-TTA CCA GTA GAA GTT TAC ACC-3′，产物大小为 750 bp。外排泵 adeB 基因：上游引物 5′-AAA GAC TTC AAA GAG CGG ACT A-3′；下游引物 5′-ATT GTC ACC TTG TGG CAA CCC T-3′，产物大小为 273 bp。总反应体系为 50 μL，其中 10×buffer（含 Mg^{2+}）5 μL，dNTPs（各 2.5 mmol/L）4 μL，DNA 模板 2 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 2 μL，Taq DNA 酶 0.3 μL，dH2O 34.7μL。反应条件：94℃预变性 5 min，然后 94 ℃ 30 s，54 ℃ 45 s，72 ℃ 45 s，共 30 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min。PCR 产

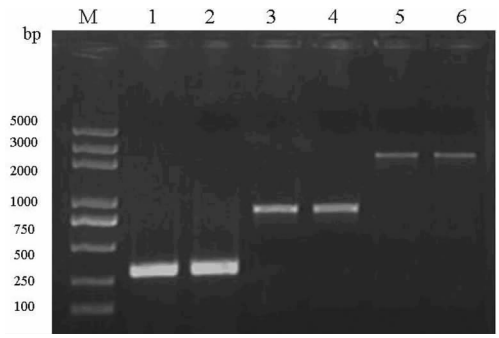
*　基金项目：南京市卫生局医学科技发展项目（YKK10061）。　△　通讯作者：E-mail：zkangkui@yahoo.com.cn。

物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳观察。

1.3.3 外膜蛋白的分析　外膜蛋白的制备：取 0.5 麦氏单位的细菌 100 μL 接种于 4 mL LB 培养液中，37℃ 180 r/min 振荡培养过夜，6 000×g 离心 10 min，沉淀加入 pH 7.0，50 mmol/L PBS 洗 1 次，6 000 ×g 离心 10 min。沉淀加入 1 mL pH 7.0，10 mmol/L Tris-HCL 冰浴超声破碎细胞，然后 4 ℃ 1 600×g 离心 10 min，去除碎片。上清 4℃ 21 500×g 离心 30 min，去除上清。沉淀加入 1 mL 含 2%十二烷基肌氨酸钠的 pH 7.4 10 mmol/L PBS，室温放置 30 min，然后 4 ℃ 20 500×g 离心 40 min，弃上清。沉淀加入 pH 7.0，10 mmol/L PBS 60 μL 溶解，－70 ℃冰冻保存待电泳。SDS-PAGE 电泳：取蛋白提取物25 μL与5 μL 5×SDS 上样缓冲液混合，于 100 ℃水浴 3 min 后上样。分离胶与浓缩胶浓度分别为 15%和 5%丙烯酰胺，考马斯亮蓝 R250 染色观察。

2　结　　果

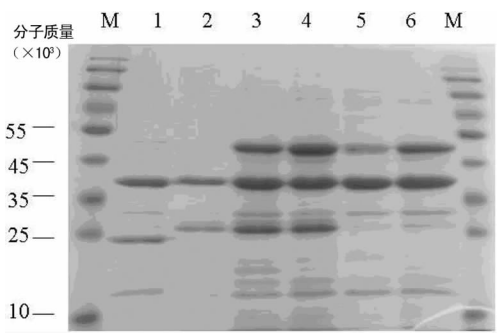
2.1 基因检测及序列分析　65 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌中均检出 CarO 与 adeB 基因。将 PCR 扩增产物纯化后进行测序，结果在 Genbank 进行比对分析，同源性均为 100%。其中 2 株检出 CarO 基因上游存在 ISAba1 插入序列（产物大小为 1 813 bp，登录号为 HQ020498.1）。扩增电泳图见图 1。



M：DNA 标记物；1～2：adeB 基因；3～4：CarO 基因；5～6：CarO 基因中插入 ISAba1 序列。

图 1　PCR 扩增电泳图

2.2 外膜蛋白表达差异　亚胺培南耐药与敏感鲍曼不动杆菌在外膜蛋白表达上存在明显差异。主要在分子量为大约 48×10^3 处蛋白的高表达和 24×10^3 蛋白的缺失。图 2 中泳道 5 和 6 为 CarO 基因上游检出插入序列菌株，大约在 29×10^3 处缺失一蛋白条带。另外，泳道 2 的耐药菌株在外膜蛋白上与敏感菌株并无太大差异。



M：蛋白分子标记物；1：敏感菌株；2～6：耐药菌株。

图 2　SDS-PAGE 电泳结果

3　讨　　论

鲍曼不动杆菌是院内感染的常见致病菌，主要引起免疫缺陷患者的感染，一旦获得耐药，临床治疗就会相当困难。而多药耐药的菌株一般都会合并几种耐药机制，其中，以主动外排系统和外膜蛋白的通透性介导多种抗菌药物的敏感性下降或耐药最为普遍[2]。目前，在不动杆菌中发现的主动外排系统主要是法国学者在鲍曼不动杆菌中发现的 adeABC 系统[3]。adeB 外排基因属于 RND 家族，其底物广泛，对多种类型抗生素及染料均有外排作用[3]。有研究显示，adeB mRNA 水平的高表达可介导细菌对抗生素的高水平耐药[7]；也有研究发现，耐 5 类或是 4 类抗菌药物的多重耐药株的该基因 mRNA 表达水平明显高于敏感菌株，也高于耐一种或两种药物的菌株[8]。本研究中，65 株多药耐药菌株均携带有 adeB 基因，这意味着，本院鲍曼不动杆菌的多药耐药性很可能是由于 adeB 基因的高表达所致。

细菌通过改变外膜蛋白的结构或者调节外膜通道蛋白的表达从而减少抗菌药物进入细菌内部，进而逃逸抗生素的杀菌作用[9]。Limansky 等[4]比较亚胺培南耐药和敏感的鲍曼不动杆菌外膜蛋白的差异，发现耐药菌株的外膜蛋白缺如分子量为 29×10^3 的条带[4]。通过后续的体外诱导，从敏感菌中成功选择出了 29×10^3 外膜蛋白的缺失耐药突变体。王辉等[10]采用 SDS-PAGE 分析体外诱导的亚胺培南耐药突变子，发现 20×10^3 蛋白的缺失、29×10^3 和 21×10^3 蛋白的表达降低是突变子耐药的主要原因。本研究发现，CarO 基因在 65 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中都存在，而 CarO 蛋白的表达水平与亚胺培南耐药之间的关系则需要进一步的研究。此外，还有研究发现当 CarO 编码基因中有插入序列时，会发生插入失活导致 CarO 基因不表达[11]。在检测的 65 株菌株中，有 2 株细菌的 CarO 基因上游有插入 ISAba1 序列，这两株细菌的亚胺培南耐药可能与 ISAba1 有关。

外膜蛋白 SDS-PAGE 电泳结果显示，耐药菌株与敏感菌株在外膜蛋白的表达上存在一定的差异，主要表现在大约 48×10^3 蛋白条带的高表达和 24×10^3 条带的缺如。图 2 中泳道 2 菌株为临床分离的一株黏液型多重耐药鲍曼不动杆菌，CarO 与 adeB 基因检测均为阳性，其外膜蛋白的表达与敏感菌株之间并无太大差异，其耐药性可能由其他耐药机制造成[12]。

本文通过分析了耐亚胺培南鲍曼不动杆菌外排泵基因及外膜蛋白的分布和表达情况，外排泵基因的广泛存在以及可能的外膜蛋白表达改变在多重耐药鲍曼不动杆菌对多种药物耐药机制中发挥着重要作用。

参考文献

[1] 黄健云，陈光辉，王前，等. 多重耐药鲍曼不动杆菌感染情况调查及耐药分析[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(16)：1923-1927.

[2] Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(6): 1210-1215.

[3] Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance nodulation cell division type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3375-3380.

[4] Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in Acinetobacter baumannii is associated with imipenem resistance[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4776-4778.

[5] Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, et al.（下转第 2821 页）

分子量约 35×10^3，是一种分泌性糖蛋白。它与细胞膜上的 wnt 受体 LRP5(或 LRP6)和 DKK1 共受体 Kremen1(或 Kremen2)结合，形成内吞小体，从而关闭 Wnt 信号通路。DKK1 是一类分泌性蛋白，已有研究表明，DKK1 在正常成人组织中仅胎盘存在表达，而在多种肿瘤中表达异常。在体外培养的 Hela 细胞中导入 DKK1 表达缺失的质粒会导致肿瘤细胞异常增生[8]，在宫颈癌 Hela 细胞株中 DKK1 存在表达沉默现象[9]，在宫颈癌 Hela 细胞株培养中发现分离的非瘤性回复体中，发现 DKK1 蛋白的高表达[10]，提示 DKK1 在宫颈癌的发生中存在重要作用。种种研究结果表明 DKK1 蛋白很可能是 1 种肿瘤特异性蛋白，可用于肿瘤的诊断或靶向治疗。因此。获得具有天然生物活性的人 DKK1 蛋白对于研究其生物学结构与功能及在肿瘤中的应用至关重要。

目前有多种表达系统应用于蛋白的制备，主要包括大肠埃希杆菌，酵母菌，植物、昆虫和哺乳动物细胞表达系统。其中以哺乳动物细胞表达系统在蛋白可溶性、蛋白折叠和翻译后修饰等方面更接近天然活性蛋白，因而应用越来越广泛[1]。人胚肾(HEK)293 细胞及其衍生细胞是常用的用于蛋白制备的哺乳动物细胞[11]。

本研究采用真核表达载体 pCMV-HA2 和哺乳动物细胞 Free-Style 293-F 表达系统，可获得大量更接近天然活性的人 DKK1 重组蛋白。通过宫颈癌组织提取癌细胞，常规抽提细胞总 mRNA，通过 RT-PCR、PCR 获得人 DKK1 基因片断，构建重组质粒 pCMV-HA2/DKK1，经细菌扩增后提取重组质粒，酶切后电泳获得的插入片段长度大约 750 bp 与预期片段长度一致。测序结果与 GenBank 中检索获得的人 DKK1 基因 cDNA 序列(NM_012242.2)完全一致，初步证实 pCMV-HA2/DKK1 重组质粒构建成功。借助脂质体将载体瞬时转染入 Free-Style 293-F 细胞(无血清培养)，经培养后对上清和细胞裂解物进行蛋白印迹法检测 DKK1 蛋白。Western Blot 鉴定表达产物为 DKK1 蛋白。本研究成功构建了人 DKK1 的真核表达质粒，并对该基因的真核表达产物进行鉴定，为下一步的 DKK1 蛋白对肿瘤发生中的生物学活性研究奠定基础[12]。

参考文献

[1] Fedi P, Bafico A, Nieto Soria A, et al. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling[J]. J Biol Chem, 1999. 274(27): 19465-19472.

[2] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators[J]. Oncogene, 2006, 25(57): 7469-7481.

[3] 余艳军，万晓桢，于彬，等. Dickkopf(DKKI)在肝癌组织及多种人肿瘤细胞系中的表达分析[J]. 肿瘤，2006，26(12)：1109-1112.

[4] Yu B, Yang X, Xu Y, et al. Elevated expression of DKKl is associated with cytoplasmic/nuclearbeta-catenin accumulation and poor prognosis jn hepatocellular carcinomas[J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 948-957.

[5] Sheng SL, Huang G, Yu B, , et al. Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer[J]. Clin Chem, 2009, 55(9): 1656-1664.

[6] 徐吟亚. 血清 Dickkopf-1 水平在诊断肺癌及其骨转移中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(3)：379-380.

[7] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 13): 2627-2634.

[8] Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, et al. A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(1): 47-59.

[9] Lee J, Yoon YS, Chung JH. Epigenetic silencing of the WNT antagonist DICKKOPF-1 in cervical cancer cell lines[J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(2): 270-274.

[10] Tsai JF, Jeng JE, Chuang WL. Dickkopf-1 and hepatocellular carcinoma[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(10): e410.

[11] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(11): 1393-1398.

[12] 朱建坤，李道堂. Dickkopf-1 与肿瘤[J]. 国际肿瘤学杂志，2010，37(8)：565-567.

(收稿日期：2012-06-20)

(上接第 2818 页)

Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of Acinetobacter baumannii[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(9): 2053-2056.

[6] Luo L, Jiang X, Wu Q, et al. Efflux pump overexpression in conjunction with alternation of outer membrane protein may induce Acinetobacter baumannii resistant to imipenem[J]. Chemotherapy, 2011, 57(1): 77-84.

[7] Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, et al. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of Acinetobacter baumannii[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 54(4): 821-823.

[8] 陈敏，王跃，刘明方. 主动外排机制在鲍曼不动杆菌耐药性中的作用[J]. 中国微生态学杂志，2008，20(2)：150-153.

[9] 史利宁，张慧，邵海枫，等. 泛耐型鲍曼不动杆菌耐药机制的探讨[J]. 临床检验杂志，2008，26(5)：327-330.

[10] 王辉，郭萍，孙宏莉，等. 碳青霉烯类耐药的不动杆菌分子流行病学及其泛耐药的分子机制[J]. 中华检验医学杂志，2006，29(12)：1066-1073.

[11] Lee Y, Kim CK, Lee H, et al. Anovel insertion sequence, ISAba10, inserted into ISAba1 adjacent to the bla(OXA-23) gene and disrupting the outer membrane protein gene carO in Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrobiob Agents Chemother, 2011, 55(1): 361-363.

[12] 陈鹏，丁进亚. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J]. 医学综述，2012，18(15)：2463-2466.

(收稿日期：2012-07-22)