

• 临床检验研究论著 •

# 多重耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 的表达及 mexR 基因的突变\*

吴祥林<sup>1</sup>, 肖丽霞<sup>2</sup>, 马东礼<sup>2</sup>, 管有理<sup>1</sup>, 刘青<sup>1</sup>

(1. 深圳市光明新区人民医院检验科, 广东深圳 518106; 2. 深圳市儿童医院检验科, 广东深圳 518026)

**摘要:**目的 分析 MexAB-OprM 主动外排系统在铜绿假单胞菌耐药性中的作用, 并讨论 MexAB-OprM 高表达与 mexR 基因突变的关系。方法 L-酚丙氨基-L-氨基酰-β-萘胺(MC207, 110)联合环丙沙星(CIP)筛选 13 株多重耐药铜绿假单胞菌主动外排系统表型; RT-PCR 检测 13 株多重耐药和 7 株全敏感的铜绿假单胞菌结构基因 mexB 的 mRNA 相对含量, 推测 MexAB-OprM 表达水平; 对 6 株 MexAB-OprM 高表达的多重耐药铜绿假单胞菌进行 mexR 基因扩增、测序和比对。结果 13 株多重耐药铜绿假单胞菌 9 株主动外排系统表型阳性, 阳性率 69.2%; 所有检测株中均有 MexAB-OprM 表达, 其中有 6 株多重耐药株高表达; 6 株多重耐药高表达株中有 5 株存在 mexR 基因的突变。结论 MexAB-OprM 主动外排系统高表达是导致本院铜绿假单胞菌多重耐药的重要原因, 而 mexR 基因的突变又是导致 MexAB-OprM 高表达的主要原因。

**关键词:**假单胞菌, 铜绿; 抗药性, 多药; 外排系统; MexAB-OprM; mexR

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)03-0288-03

## Expression of MexAB-OprM and mutation of mexR in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*\*

Wu Xianglin<sup>1</sup>, Xiao Lixia<sup>2</sup>, Ma Dongli<sup>2</sup>, Guan Youli<sup>1</sup>, Liu Qing<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Peoples' Hospital of Guangming New District, Shenzhen, Guangdong 518106, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Municipal Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China)

**Abstract: Objective** To analyze the effect of active efflux system MexAB-OprM in the multi-drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* (PA), and to study the relationship between expression of MexAB-OprM and mutation of mexR. **Methods** The active efflux phenotype in the 13 strains of multi-drug resistant PA were screened by efflux inhibitors MC207, 110. The levels of mexR mRNA of 13 MDR strains and 7 standard susceptible strains were determined by real time PCR. The mexR gene in 6 strains of high level MexAB-OprM was amplified and the gene sequence were analyzed. **Results** The active efflux phenotype was identified in 9 strains. MexAB-OprM was over expressed in 6 strains, in which there were 5 strains carrying mexR gene mutation. **Conclusion** The high level expression of MexAB-OprM active efflux system played an important role in PA multi-drug resistance. The mutation of mexR might be the main reason for the over expression of MexAB-OprM.

**Key words:** pseudomonas aeruginosa; drug resistance, multiple; efflux system; MexAB-OprM; mexR

铜绿假单胞菌(PA)是临床常见的条件致病菌,是医院内感染的主要致病菌。近年来,临床上分离的 PA 逐渐增多,同时其耐药率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>,且各单位分离 PA 的耐药性各有其特点<sup>[2]</sup>。从重症监护病房、脑外科病房及烧伤病房的患者分离的 PA 出现了多重耐药菌株(MDR-PA),给临床抗感染治疗带来挑战<sup>[3-4]</sup>。研究表明,主动外排系统在 PA 多重耐药形成过程中起重要的作用,其中 MexAB-OprM 的作用尤为明显,具有最广的底物特异性,它会造成 PA 对多种类型的抗生素天然耐药,主动外排 β-内酰胺类、四环素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、大环内酯类等抗生素,但碳青霉烯中的亚胺培南、羧苄西林等却不是其底物<sup>[5]</sup>。本课题采用实时荧光定量 PCR 的方法检测了临床分离的 13 株多重耐药和 7 株对所测药物全敏感的铜绿假单胞菌的 MexAB-OprM 主动外排系统基因表达情况,探讨这种外排系统与 MDR-PA 的关系,同时检测了其负调控基因 mexR,观察突变与表达之间的关系。

### 1 材料与方 法

**1.1 菌株来源** 收集 2010 年 1 月至 2011 年 6 月从临床分离的 13 株铜绿假单胞菌。所有细菌均选择患者的初次分离菌株,分离自痰液 6 株、伤口分泌物 4 株、尿液 2 株、血液 1 株。野生株 PAO1 购自卫生部药品生物制品检定所。

**1.2 仪器与试剂** 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒及 pMD18-T 载体为

TaKaRa 公司产品; L-酚丙氨基-L-氨基酰-β-萘胺 (MC-207, 110) 为 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶为英国 OXOID 公司产品; 琼脂糖、Trizol Reagent 为美国 Invitrogen 公司产品; 质粒提取和胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; mexR、mexB 及内参 16S rDNA 的引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列如下, MexB 基因 P1: 5'-CAA GGG CGT CGG TGA CTT CCA G-3', P2: 5'-ACC TGG GAA SSG TCG GGA TTG A-3', 244 bp。内参基因 16S rDNA P1: 5'-CAG CTC GTG TCG TGA GAT GT-3', P2: 5'-CGT AAG GGC CAT GAT GAC TT-3', 241 bp。MexR P1: 5'-ACC AAT GAA CTA CCC CGT GA-3', P2: 5'-AAT GTT CTT AAA TAT CCT CAA-3', 453 bp。荧光定量 PCR 仪器采用美国 Applied Biosystems 公司 ABI 7300 型。

### 1.3 方法

**1.3.1 细菌总 RNA 的提取** 接种 PA 于 3 mL M-H 肉汤培养基, 37 °C, 200 r/min 过夜培养, 于对数生长期取 250 μL 细菌培养液离心, 沉淀物按 TaKaRa 总 RNA 提取试剂盒说明进行操作。将标本中提取的总 RNA 在紫外分光光度仪上进行定量, RNA 样品完整性用 1% 甲醛变性凝胶电泳鉴定, 取总 RNA 约 2 μg 用于 cDNA 的合成。

**1.3.2 反转录合成 cDNA 第一链** 按试剂盒操作说明进行反转录, 取总 RNA 样品 5 μL, 70 °C 变性 10 min, 然后在冰上

\* 基金项目: 深圳市科研项目(201103209)。 作者简介: 吴祥林, 男, 主任检验技师, 主要从事细菌耐药机制研究。

准备反应混合物,按如下 20 μL 反应体系进行反转录。室温放置 10 min, 42 °C 反应 60 min, 95 °C 灭活 5 min, 即合成了 cDNA, 作为模板。

**1.3.3 实时荧光定量 RT-PCR** 以标准野生株 PAO1 为标准参考菌株,以表达恒定的管家基因 16S rDNA 为内参基因。冰上配置 PCR 反应液:SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL, PCR 上游和下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 2 μL, 去离子水 9.5 μL, 反应最终体系为 25 μL。扩增条件:第 1 步 95 °C 15 min;第 2 步 95 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。目的基因的反应根据相应的标准曲线进行定量,反应结束后得到每个反应体系中目的基因的初始模板量。目的基因的初始模板量与相应的内参基因的初始模板量的比值,就是目的基因的相对表达量。根据重复试验得到的数据进行平均化统计。

**1.3.4 克隆制备定量阳性模板和内参照模板、建立标准曲线**按照吴春明等建立的方法操作<sup>[6]</sup>。具体如下:采用美国 Omega 公司小量胶回收试剂盒将 mexB 和 16S rDNA 的 PCR 产物进行纯化。然后将纯化的 PCR 产物与 pMD-T 载体进行连接。反应体系和条件等按说明书操作。抽提、纯化重组质粒 pMD18-T-mexB 和 pMD18-T-16S rDNA, 以重组质粒作为模板, PCR 法和酶切鉴定阳性克隆, 并测序。抽提得到的 pMD18-T-mexB 和 pMD18-T-16S rDNA 质粒经紫外分光光度仪测定浓度, 分别换算为  $3.3 \times 10^{12}$  copy/mL 和  $1.5 \times 10^{12}$  copy/mL, 用灭菌水将质粒梯度稀释为  $1 \times 10^{10}$ 、 $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  copy/mL 等不同浓度的模板。SYBR Green I 实时定量 PCR: (1) 反应体系按说明书操作。(2) 溶解曲线分析是利用扩增仪配套软件中的 Dissociation Protocol 程序, 在反应结束后, 反应管内温度从 50 °C 开始缓慢升至 99 °C, 扩增产物双链随温度的升高渐变变性解链为单链, SYBR Green I 释放出来, 荧光信号随之衰减, 仪器逐点检测反应管内荧光信号的变化, 然后绘制出扩增产物荧光信号随温度变化的溶解曲线 (melting curve)。片段基因有不同的长度、GC 含量和碱基组成而有不同的 T<sub>m</sub> 值, 在溶解曲线上的形状和峰值也各不相同, 据此可通过溶解曲线的分析找出不同扩增产物的 T<sub>m</sub> 值。(3) 扩增条件: 预变性 93 °C 15 min; 变性 93 °C 15 s, 退火 55 °C 15 s, 延伸 72 °C 20 s, 循环次数 45 次。反应结束后, 计算机自动绘出 pMD18-T-mexB 和内参 pMD18-T-16S rDNA 的标准曲线。

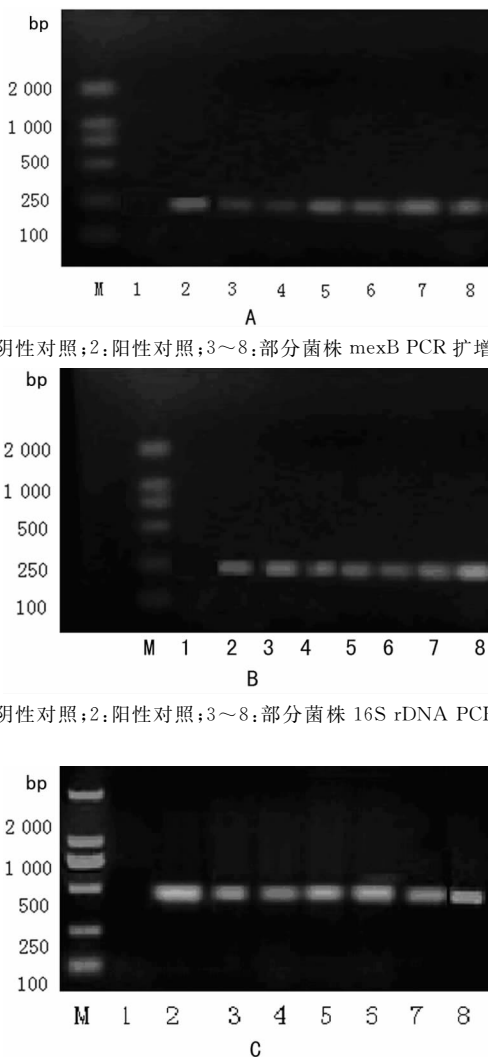
**1.3.5 MC207, 110 联合环丙沙星 (CIP) 测定 MIC 值** 选择终浓度为 20 μg/mL 的 MC207, 110 联合 CIP, 参照美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 用琼脂稀释法测定 13 株多耐药铜绿假单胞菌的 MIC 值, 大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为质控菌株。

**1.3.6 PCR 扩增 mexR 基因** 按如下 25 μL 反应体系进行 PCR 扩增。10×PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTPs 2 μL, 10 μmol/mL 的上游引物 1 μL, 10 μmol/mL 的下游引物 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.125 μL, cDNA 模板 2 μL。PCR 反应参数为: 95 °C 10 min 预变性; 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物 5 μL 在 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色紫外灯下成像, 观察结果。mexR 基因扩增产物送上海生工生物工程公司进行纯化, 双向测序后经 Blast 比对。

**2 结 果**

MC207, 110 联合 CIP 检测 13 株多重耐药株的主动外排表型, 有 9 株阳性, 阳性率 69.2%。多重耐药株、敏感株及野生株均存在 mexB mRNA 的表达, 见图 1(A、B)。6 株多重耐药株高表达, 其他低水平表达。对 6 株 MexAB-OprM 高表达

的多重耐药株进行其负调控基因 mexR 的扩增, 见图 1(C), 扩增产物测序并与 GenBank 中公布的序列比对, 有 5 株发生了突变, 均为 336G-A, 603G-A, 653T-A, 660G-A 突变。



1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3~8: 部分菌株 mexB PCR 扩增产物。

1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3~8: 部分菌株 16S rDNA PCR 扩增产物。

1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3~8: 菌株 mexR 的 PCR 产物。

图 1 扩增产物电泳图

**3 讨 论**

PA 是临床上重要的条件致病菌之一, 是引起本院院内感染的第一致病菌, 尽管多重耐药株不多, 但可以预见耐药率会逐渐上升, 关注其耐药机制成为必然。其对多种抗菌药物表现为天然耐药和获得性耐药, 所涉及耐药机制相当复杂, 包括抗生素灭活酶或修饰酶的生成、外膜低渗透性、外膜通道蛋白缺失、形成生物膜以及主动外排系统等<sup>[7]</sup>。其中, 主动外排系统占有重要地位, 决定了 PA 的固有耐药, 当其表达增高时还导致多重耐药。目前发现了 7 种主动外排系统, 均属于 RND 家族, MexAB-OprM 是在 PA 中发现的第 1 个 RND 家族外排系统, 其作用底物广泛, 是最有临床意义的药物外排系统。MexAB-OprM 由 3 部分组成: (1) 外膜通道蛋白 OprM, 形成门通道, 位于细胞外膜, 使药物排出到菌体外。(2) 内膜蛋白 MexB 主动外排蛋白, 具有识别药物并将其主动转运出细胞膜的功能, 但不具有特异性。(3) 膜融合蛋白 MexA, 位于细胞内膜和外膜之间, 具有连接内、外膜蛋白的功能, 与它们一起形成了主动外排系统并开口于外膜的复合体, 使药物直接泵出到菌体外。这 3 种蛋白由同一操纵子所编码, 其结构蛋白的 mRNA 水平可以推测 MexAB-OprM 的表达。本实验用 RT-PCR 检测内膜蛋白 MexB 结构基因 mexB 的 mRNA 转录水平。结果

显示所有菌株均扩增出目的基因,表明其固有存在,但多重耐药株的检出水平显著高于敏感株,证明 MexAB-OprM 主动外排系统与铜绿假单胞菌多重耐药性密切相关。

L-酚丙氨基-L-氨基酰-β-萘胺(MC-207,110)为广谱外排泵抑制剂,对铜绿假单胞菌引起临床耐药的 4 类主要的外排泵(MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN 和 MexXY-OprM)均有抑制作用<sup>[8]</sup>,因此其可较好地选出外排表型阳性的铜绿假单胞菌。本次检测的 13 株重药耐药菌株中 9 株外排表型阳性,占 69.2%,与张鹏和姚慧林<sup>[9]</sup>报道的 66.7%(24/36)相近,弱高于夏景洋等<sup>[10]</sup>报道的 61%(50/82),说明主动外排在多药耐药铜绿假单胞菌中普遍存在,其中 6 株 mexB 基因 mRNA 相对表达量高于野生株铜绿假单胞菌,可认为 MexAB-OprM 表达的增加是这些菌株耐药的主要原因,但也存在其他主动外排系统。近年来研究发现,mexR 是 MexAB-OprM 的负调控基因<sup>[11]</sup>,当其突变时,可导致 MexAB-OprM 去抑制而表达增强,从而形成获得性耐药。为了进一步研究 MexAB-OprM 高表达的机制,本实验扩增了 6 株 MexAB-OprM 高表达菌株的 mexR 基因,并对产物进行测序,发现其中有 5 株 mexR 发生变异,均发生点突变,出现了氨基酸替换,氨基酸的替换和插入都可能会影响阻遏蛋白 MexR 的结构,使其不能与操纵子结合,从而导致主动外排泵 MexAB-OprM 的高表达,导致对多种抗菌药物的耐药<sup>[12]</sup>。mexR 基因发生突变的 5 株铜绿假单胞菌,其 mexB 相对表达量都高于野生株。因此 mexR 基因的突变导致了这些菌株 MexAB-OprM 表达的增强。另外 1 株没有发生 mexR 突变的铜绿假单胞菌,表明这些菌株中存在其他机制导致了 MexAB-OprM 的高表达。

这 5 株 mexR 突变为相同位点,是否有同源性,有待进一步作分子流行病学调查。

参考文献

[1] 鲍红荣. 医院铜绿假单胞菌的分布与耐药性变迁分析[J]. 中华医

院感染学杂志,2010,20(4):573-575.  
[2] 陈日炳,胡琴. 深圳东部地区临床常见病原菌分布及铜绿假单胞菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1276-1277.  
[3] 胡会平. 重症监护病房铜绿假单胞菌的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(1):107-108.  
[4] 陈键. 重症监护病房老年患者感染铜绿假单胞菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(16):1826-1827.  
[5] Jo JT, Brinkman FS, Hancock RE. Aminoglycoside efflux in pseudomonas aeruginosa: Involvement of novel outer membrane proteins [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(3): 1101-1111.  
[6] 吴春明,李洪涛,覃慧敏,等. 建立 SYBR Green 实时 RT-PCR 定量方法检测铜绿假单胞菌 MexAB-OprM mRNA 水平[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(11):1349-1352.  
[7] 施凯舜,潘发慎. 铜绿假单胞菌耐药研究进展[J]. 浙江医学,2008,30(20):199-202.  
[8] 骆俊,朱德妹. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2008,8(1):76-79.  
[9] 张鹏,姚慧琳. 铜绿假单胞菌主动外排表型及 OprM 基因检测[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(6):538-539.  
[10] 夏景洋,何刘媛,陈建江. 多药耐药铜绿假单胞菌的 MexAB-OprM 表达水平研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(2):221-223.  
[11] Poole K, Tetro K, Zhao O, et al. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in pseudomonas aeruginosa: mexR encodes a regulator of operon expression[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(9): 2021-2028.  
[12] 魏志华,沈继录,徐元宏. 多药耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 主动外排系统的耐药作用[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(9):1205-1207.

(收稿日期:2012-09-01)

(上接第 287 页)

[22] Yates JR, Sepp T, Matharu BK, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration[J]. N Engl J Med, 2007, 357(6): 553-561.  
[23] Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, et al. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration[J]. Nat Genet, 2007, 39(10): 1200-1211.  
[24] Thakkinstian A, McEvoy M, Chakravarthy U, et al. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis[J]. Am J Epidemiol, 2012, 176(5): 361-372.  
[25] Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration[J]. Science, 2006, 314(5801): 989-992.  
[26] Lu F, Hu J, Zhao P, et al. HTRA1 variant increases risk to neovascular age-related macular degeneration in Chinese population [J]. Vision Res, 2007, 47(24): 3120-3123.  
[27] Lin JM, Wan L, Tsai YY, et al. HTRA1 polymorphism in dry and wet age-related macular degeneration [J]. Retina, 2008, 28(2): 309-313.  
[28] Tam PO, Ng TK, Liu DT, et al. HTRA1 variants in exudative age-related macular degeneration and interactions with smoking and CFH[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(6): 2357-2365.  
[29] Yoshida T, DeWan A, Zhang H, et al. HTRA1 promoter polymor-

phism predisposes Japanese to age-related macular degeneration [J]. Mol Vis, 2007, 13: 545-548.  
[30] Kondo N, Honda S, Ishibashi K, et al. LOC387715/HTRA1 variants in polypoidal choroidal vasculopathy and age-related macular degeneration in a Japanese population [J]. Am J Ophthalmol, 2007, 144(4): 608-612.  
[31] Chen Y, Zeng J, Zhao C, et al. Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with genetic markers and environmental factors[J]. Arch Ophthalmol, 2011, 129(3): 344-351.  
[32] Liu X, Zhao P, Tang S, et al. Association study of complement factor H, C2, CFB, and C3 and age-related macular degeneration in a Han Chinese population[J]. Retina, 2010, 30(8): 1177-1184.  
[33] Yang Z, Camp NJ, Sun H, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration[J]. Science, 2006, 314(5801): 992-993.  
[34] Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The international ARM epidemiological study group[J]. Surv Ophthalmol, 1995, 39(5): 367-374.  
[35] Kim SJ, Lee SJ, Kim NR, et al. Association of polymorphisms in C2, CFB and C3 with exudative age-related macular degeneration in a Korean population[J]. Exp Eye Res, 2012, 96(1): 42-47.

(收稿日期:2012-08-09)