

· 论 著 ·

碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌外膜蛋白表达的分析*

王同慧^{1,2}, 袁清强², 凌保东^{3△}

(1. 川北医学院药物研究所暨药理学教研室, 四川南充 637000; 2. 齐鲁医药学院, 山东淄博 255213; 3. 成都医学院结构特异性小分子药物研究实验室, 四川成都 610500)

摘要:目的 筛选碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌并了解其耐药情况, 分析碳青霉烯类耐药菌及碳青霉烯类敏感菌的外膜蛋白表达情况。方法 采用琼脂二倍稀释法筛选碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌, 运用聚合酶链反应(PCR)技术检测外膜蛋白基因 *carO*; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析细菌外膜蛋白的表达情况。结果 110 株临床分离鲍曼不动杆菌中的 32 株细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药, 此 32 株碳青霉烯类耐药菌除对多黏菌素 B 敏感性为 100%, 对其他所试药物均呈不同程度耐药; 碳青霉烯类鲍曼不动杆菌均携带 *carO* 基因, SDS-PAGE 分析显示碳青霉烯类耐药菌株与敏感菌株相比, 在相对分子质量约 22×10^3 和 50×10^3 等处的蛋白条带存在差异。结论 鲍曼不动杆菌对抗菌药物的耐药情况严重, 且碳青霉烯类耐药菌与敏感菌的外膜蛋白在表达上存在明显差异。

关键词:碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌; *carO* 基因; 外膜蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)16-2295-03

Analysis of the expression of the outer membrane protein in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii**

Wang Tonghui^{1,2}, Yuan Qingqiang², Ling Baodong^{3△}

(1. Institute of Materia Medica and Department of Pharmacology, North Sichuan Medical College,

Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. QiLu Medical University, Zibo, Shandong 255213, China;

3. Structure-specific Small Molecule Drug Research Laboratory, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China)

Abstract: Objective To Screen the carbapenem-resistant acinetobacter baumannii so as to understand the drug resistance, and to analyze the outer membrane protein expression between the carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and the sensitive strains. **Methods** The twofold agar dilution method was used to screen the carbapenem-resistant acinetobacter baumannii. PCR technique was used to detect the outer membrane protein-encoding gene *carO*. SDS-PAGE was used to analyze the expression of outer membrane protein. **Results** 32 strains were carbapenem-resistant acinetobacter baumannii separated from 110 strains, which were 100% sensitive to polymyxin B and were resistant to other drugs with different degrees O. They all carried *carO* gene. There were different protein bands between the carbapenem-resistant strains and the sensitive strains, in which two protein bands of 50×10^3 and 22×10^3 were recognized as outer membrane proteins through the analysis of SDS-PAGE. **Conclusion** Drug resistance of acinetobacter baumannii is serious, and the outer membrane protein expression between the carbapenem-resistant strains and the sensitive strains presents discrepancy.

Key words: carbapenem-resistant acinetobacter baumannii; *carO* gene; outer membrane proteins

全球范围内, 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药现象日益严峻, 中国 CHNET 细菌耐药性监测数据显示, 2009~2012 年, 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物(亚胺培南、美罗培南)的耐药率总体呈现上升趋势^[1-4]。国内外对 29×10^3 大小的外膜蛋白参与鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类药物均有相关报道^[5-6], 而其他大小的外膜蛋白在碳青霉烯类耐药菌和敏感菌间是否存在差异引发了笔者的关注与思考。为了解碳青霉烯类耐药菌及碳青霉烯类敏感菌的外膜蛋白表达情况, 本研究对鲍曼不动杆菌分离株的外膜蛋白进行了相关检测分析。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集 2010 年 9 月至 2012 年 3 月川北医学院附属医院临床分离的非重复鲍曼不动杆菌 110 株, 所有菌株均经法国 Bio-Merieux 公司 Vitek32 全自动微生物分析系统鉴定。鲍曼不动杆菌标准菌株 ATCC19606 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)菌种库。

1.2 仪器与试剂 日本 Sakuma 公司 MIT-P 型细菌多点接种仪, 德国 Eppendorf 公司 PCR 扩增仪, 美国 Thermo ST16R 台

式高速冷冻离心机、美国 BIO-RAD 蛋白电泳仪和凝胶成像分析系统, JY92-II 型超声波细胞粉碎仪等。20 种抗菌药物(亚胺培南、美罗培南、头孢唑林、头孢哌酮、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁、阿莫西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、氨基曲南、左氧氟沙星、环丙沙星、庆大霉素、链霉素、卡那霉素、阿奇霉素、多黏菌素 B、四环素、氯霉素、利福霉素); $2 \times$ Taq PCR Master-Mix、预染蛋白质分子质量标准; N-十二烷基肌氨酸钠、1.5M Tris-HCl(pH 8.8)、1.0M Tris-HCl(pH 6.8)。

1.3 合成引物 参照文献[5], 由上海生工生物工程有限公司合成, 具体序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

引物	序列(5'~3')	长度(bp)
<i>carO</i>	F: ATG AAA GTA TTA CGT GTT TTA GTG R: TTA CCA GTA GAA GTT TAC ACC	750

F: 上游引物; R: 下游引物。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373454); 四川省重点科技资助项目(2013jy0065)。 作者简介: 王同慧, 女, 硕士研究生, 主要从事细菌耐药研究。 △ 通讯作者, E-mail: lingbaodong@cmc.edu.cn。

1.4 方法

1.4.1 药敏试验 采用琼脂二倍稀释法测定以上 20 种抗菌药物对 110 株鲍曼不动杆菌分离株的最低抑菌浓度(MIC)。结果判定标准参照 2011 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)公布标准。

1.4.2 基因检测 煮沸法制备 DNA 模板,PCR 扩增引物见表 1,扩增体系:DNA 模板 1 μL,2×Taq PCR MasterMix 10 μL,上、下游引物各 1 μL,DDW 7 μL,共 20 μL,瞬时离心混匀。94 °C 预变性 5 min,循环参数:94 °C 变性 1 min,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共循环 30 次,72 °C 延伸 7 min。并设空白对照。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4.3 外膜蛋白表达检测 随机抽取 17 株碳青霉烯类耐药菌组成 R 组、8 株碳青霉烯类敏感菌为 S 组和标准菌株 ATCC19606 共 26 株菌,检测其外膜蛋白的表达情况。

1.4.3.1 提取外膜蛋白 取过夜培养的菌液 2 mL 转入 200 mL 营养肉汤,37 °C 200 r/min 振荡培养 4~5 h,12 000×g 离心 10 min 收集菌体,菌体以预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,沉淀悬浮于 PBS 中,冰浴下超声破碎细菌,4 °C 6 000×g 离心 10 min 去除未破碎细菌碎片。上清液于 4 °C 25 800×g 离心 1.5 h,沉淀用 2% N-十二烷基肌氨酸钠重悬,室温置 30 min,4 °C 25 800×g 离心 1 h,沉淀用 0.2 mL PBS 悬浮,蛋白样品与适量 5×十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液混匀,100 °C 煮沸 10 min 并分装保存于一 80 °C 备用。

1.4.3.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 蛋白样品以 5% 积层胶,15% 分离胶进行电泳。电压设为 94 V 直至样品达分离胶底部停止电泳,用考马斯亮兰 R250 染色 1 h,更换 3~4 次脱色液,最后一次换液后脱色过夜。

2 结果

2.1 药敏试验结果 以 MIC≥16 μg/mL 为耐药标准,亚胺培南、美罗培南耐药率分别为 28.18% (31/110) 和 29.09% (32/110);两者均耐药率为 96.88%。此 32 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌(CRAB)除对多黏菌素 B 保持 100% 的敏感性外,对其他 17 种抗菌药物的耐药率见图 1。

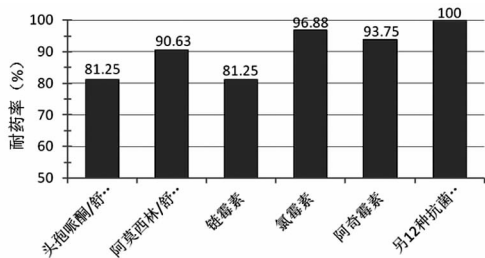
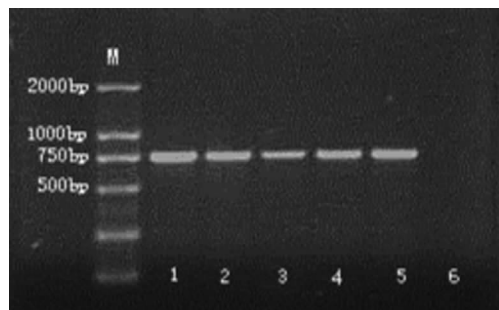


图 1 32 株 CRAB 对 17 种抗菌药物的耐药率

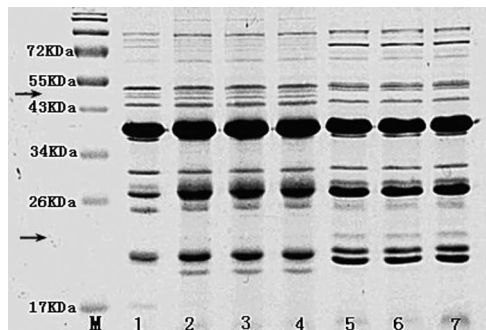
2.2 基因检测结果 32 株 CRAB 均检出 carO 基因条带,大小约为 750 bp,未见额外基因片段插入,见图 2。



M:DNA 标记物;1~5:CarO 基因;6:空白对照。

图 2 部分 carO 基因 PCR 扩增电泳图

2.3 外膜蛋白表达结果 所测 17 株碳青霉烯类耐药菌(R 组菌)与敏感菌(S 组菌)、标准菌株(ATCC19606)比较在外膜蛋白表达上存在明显差异,相对分子质量约 50×10³ 处存在蛋白条带缺失,在约 22×10³ 处出现一条新的蛋白条带。部分菌株 SDS-PAGE 电泳图谱见图 3。



M:蛋白质标记物;1:ATCC19606;2~4:碳青霉烯类敏感菌;5~7:碳青霉烯类耐药菌;2~7:临床分离菌。

图 3 外膜蛋白 SDS-PAGE 电泳图

3 讨论

鲍曼不动杆菌是引起院内感染的主要病原菌之一,近年来在抗菌药物的选择压力下,耐药菌的临床分离率逐年上升。而碳青霉烯类抗菌药物由于具有抗菌作用强、抗菌谱广、耐酶且稳定等优点成为目前治疗鲍曼不动杆菌感染最有效的药物之一。但此类药物的广泛应用也导致了 CRAB 的产生。2012 年中国 CHINET 细菌耐药监测数据显示临床分离鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 56.8% 和 61.4%,2009 年国外也有报道全球范围内鲍曼不动杆菌对美罗培南的耐药率高达 47.1%^[4,7]。细菌一旦对碳青霉烯类抗菌药物耐药,就往往呈现多重耐药、泛耐药甚至全耐药^[8]。本组 110 株试验菌中有 32 株对碳青霉烯类药物耐药,此 32 株 CRAB 除对多黏菌素 B 保持 100% 的敏感性外,对其他所试抗菌药物的耐药率则均高于 80%,提示本组细菌耐药情况严重。

鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药机制复杂,其中细菌外膜蛋白的改变有助于细菌逃避此类药物的杀菌作用,在耐药产生的过程中发挥一定作用^[9]。有研究发现 ISAbal 插入序列插入到 carO 基因时,会发生插入失活导致 carO 基因不表达^[10],以致外膜蛋白改变,从而减少抗菌药物进入菌体。国外学者发现 29×10³^[6]、(33~36)×10³ 外膜蛋白的缺失^[11],可能在鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药中发挥一定作用。国内也有报道 48×10³ 处蛋白高表达和 24×10³ 蛋白缺失是鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药的重要机制^[5]。本研究中对外膜蛋白基因检测结果显示所有 CRAB 均携带 carO 基因,未发现 carO 内含有的额外的 ISAbal 片段插入。提取鲍曼不动杆菌标准菌株、碳青霉烯类敏感菌株和耐药菌株外膜蛋白,SDS-PAGE 电泳图谱显示所测碳青霉烯类耐药菌株(R 组菌)与敏感菌株(S 组菌、标准菌株)比较存在明显差异蛋白条带。笔者推测 50×10³ 处外膜蛋白的缺失,22×10³ 处外膜蛋白的出现可能与本试验菌耐碳青霉烯类抗菌药物有关。但不同大小外膜蛋白的改变在鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药过程中的具体作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(5):325-334.
[2] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET(下转第 2300 页)

- glycated hemoglobin measurement [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(9):1719-1726.
- [12] Hare MJ, Shaw JE, Zimmet PZ. Current controversies in the use of haemoglobin A1c[J]. *J Intern Med*, 2012, 271(3):227-236.
- [13] Amer DA. Standards of medical care in diabetes-2010[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(1):S11-S61.
- [14] Kim TH, Choi SH. Diagnosing diabetes with hemoglobin a1c: current debates and considerations for anemic patients[J]. *Diabetes Metab J*, 2013, 37(5):340-342.
- [15] Pinna A, Contini EL, Carru C, et al. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency and diabetes mellitus with severe retinal complications in a sardinian population, Italy[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(13):1907-1913.
- [16] Carette C, Dubois-Laforgue D, Gautier JF, et al. Diabetes mellitus and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; from one crisis to another[J]. *Diabetes Metab*, 2011, 37(1):79-82.
- [17] Adinortey MB, Owusu RK, Galyuon I, et al. G-6-PD deficiency-a potential risk factor for development of diabetes mellitus[J]. *J Medicine and Medical Science*, 2011, 2(8):1017-1021.
- [18] Santana MS, Monteiro WM, Costa MR, et al. High frequency of diabetes and impaired fasting glucose in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Western Brazilian Amazon[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2014, 91(1):74-76.
- [19] Schneider AM, Rawat D, Weinstein L, et al. Effects of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass on glucose-6 phosphate dehydrogenase activity in obese type 2 diabetics[J]. *Surg Endosc*, 2012, 26(3):823-830.
- [20] Pari L, Murugan P. Effect of tetrahydrocurcumin on blood glucose, plasma insulin and hepatic key enzymes in streptozotocin induced diabetic rats[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2005, 16(4):257-274.
- [21] Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS, et al. Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(1):153-162.
- [22] Zhang Z, Liew CW, Handy DE, et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis[J]. *FASEB J*, 2010, 24(5):1497-1505.
- [23] 阮林海, 韦学卿. 年轻红细胞采集及其临床应用[J]. *洛阳医学专学报*, 1996, 7(1):54-56.
- [24] Gu XJ, Chen SP, Ge SJ, et al. G6PD deficiency-induced hemolysis in a Chinese diabetic patient: a case report with clinical and molecular analysis[J]. *Acta Diabetol*, 2013, 50(1):89-92.
- [25] Messina MF, Lombardo F, Crisafulli G, et al. Hemolytic crisis in a non-ketotic and euglycemic child with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and onset of type 1 diabetes mellitus[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2004, 17(12):1671-1673.
- [26] Shalev O, Eliakim R, Lugassy GZ, et al. Hypoglycemia-induced hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. *Acta Haematol*, 1985, 74(4):227-229.
- [27] Mahmoud AA, Nor El-Din AK. Glucose-6-Phosphate dehydrogenase activity and protein oxidative modification in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Biomarkers*, 2013, 3(1):115-116.
- [28] Zhang W, Ni C, Sheng J, et al. TLQP-21 protects human umbilical vein endothelial cells against High-Glucose-Induced apoptosis by increasing G6PD expression[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):79760.
- [29] Zhang Z, Yang Z, Zhu B, et al. Increasing glucose 6-phosphate dehydrogenase activity restores redox balance in vascular endothelial cells exposed to high glucose[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):49128.
- [30] Saha N. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with diabetes mellitus in ethnic groups of Singapore[J]. *J Med Genet*, 1979, 16(6):431-434.
- [31] Heymann AD, Cohen Y, Chodick G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(8):58.

(收稿日期:2015-05-25)



(上接第 2296 页)

- 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2011, 11(5):321-329.
- [3] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2012, 12(5):321-329.
- [4] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2013, 13(5):321-330.
- [5] 张之烽, 周万青, 曹小利, 等. 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[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(23):2817-2818.
- [6] Lee YS, Kim CK, Lee HK, et al. A novel insertion sequence, ISA-ba10, inserted into ISAba1 adjacent to the blaOXA-23 gene and disrupting the outer membrane protein gene *carO* in acinetobacter baumannii[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(1):361-363.
- [7] Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009[J]. *Clin Ther*, 2012, 34(1):101-112.
- [8] Grosso F, Quinteira S, Peixe L. Emergence of an extreme-drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii* carrying blaOXA-23 in a patient with acute necrohaemorrhagic pancreatitis[J]. *J Hosp Infect*, 2010, 75(1):82-83.
- [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] Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(11):1393-1398.
- [11] del Mar Tomás M, Beceiro A, Pérez A, et al. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33-to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(12):5172-5175.

(收稿日期:2015-02-21)