

# 鲍曼不动杆菌耐药性与相关外排泵机制的初步研究

赵亚运, 王鑫玲, 朱云竹, 叶英

**摘要** 目的 研究鲍曼不动杆菌外排泵基因的分布与抗菌药物的关系。方法 分别应用稀释法和纸片扩散法检测 26 株临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌对 18 种常用抗菌药物的最低抑菌浓度 (MIC), PCR 扩增 *adeB*、*adeJ*、*macB*、*emrB*、*abeS*、*abeM*、*craA* 外排泵基因, 实时荧光定量 RT-PCR 检测外排泵基因的 mRNA 表达水平。结果 26 株多重耐药的鲍曼不动杆菌对 18 种抗菌药物耐药情况严重, 其中 3 株为替加环素耐药菌株, 所有菌株均对多粘菌素 B 敏感。临床分离的多重耐药的鲍曼不动杆菌株 *adeJ* 和 *abeM* 的检出率达到了 100% (26/26), *abeS*、*adeB*、*craA* 的检出率分别为 96.15% (25/26)、92.31% (24/26)、84.62% (22/26), 外排泵基因 *macB*、*emrB* 检出率在 80% 以上。在转录水平上, 替加环素耐药菌株的 *macB* 平均表达量水平是标准菌株的 5.8 倍。结论 多重耐药的鲍曼不动杆菌外排泵基因 *macB*、*emrB*、*craA* 检出率较高, *macB* 的相对表达量与替加环素耐药相关。

**关键词** 鲍曼不动杆菌; 外排泵; 耐药机制

中图分类号 R 978.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1574-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.016

鲍曼不动杆菌 (*A. baumannii*, AB) 是引起医院感染的条件致病菌<sup>[1]</sup>, 2017 年由中国 CHINET 细菌耐药数据显示<sup>[2]</sup>, 鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南耐药率在 60% 以上, 替加环素成为治疗的基石药物。近年来的研究表明鲍曼不动杆菌的替加环素耐药与外排泵系统有关, 目前与鲍曼不动杆菌相关的外排泵系统共有 5 个家族, 其中 ATP 结合盒家族的 MacAB-tolC<sup>[3]</sup> 和主要易化子超家族的外排泵 EmrAB<sup>[4]</sup> 已在其他菌中虽有报道, 但在鲍曼不动杆菌中尚未进行详细研究。迫切需要了解不同类型的外排泵基因在临床分离的多重耐药的鲍曼不动杆菌中的分布及表达量与抗菌药物的关系。本研究探讨外排泵基因的表达水平与鲍曼不动杆菌耐药性的关

系, 尤其与替加环素的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 收集 2017 年 9 月份安徽地区 10 家三甲医院临床科室分离出的多重耐药的鲍曼不动杆菌 26 株作为实验组, 筛选标准为 3 类或 3 类以上抗菌药物均耐药, 选择野生菌种 ATCC17978 作为标准菌株, 2 株诱导菌株由标准菌株分别经过替加环素、亚胺培南诱导产生, 分别命名为: 17978TGC、17978IMP。所有菌株经过法国梅里埃全自动生物检定仪鉴定。

**1.1.2 替加环素及亚胺培南诱导耐药菌株选择** ATCC17978 菌株替加环素诱导过程如下: 接种单个菌落于含有 0.5 倍的 ATCC17978 替加环素最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的 LB 肉汤培养液中, 37 °C 210 r/min 过夜, 第 2 天, 取 10 μl 过夜菌加入含 1 倍 MIC 浓度的 LB 培养液中, 37 °C 210 r/min 过夜, 第 3 天重复前 1 d 操作, LB 培养液含有 2 倍 MIC 浓度, 连续诱导至 64 倍 MIC 为最终诱导浓度, 诱导株和原始菌株利用 16rRNA、rpoB 进行鲍曼不动杆菌菌种鉴定。亚胺培南诱导株及鉴定同上。

**1.1.3 主要仪器** 细菌多点接种仪 (英国 AQS-Manufacturing 公司); PCR 扩增仪 (德国 Biometra 公司); 核酸电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像及分析系统 (上海天能公司); 荧光定量 PCR 仪 (Light-Cycler® 96 System, 瑞士罗氏公司)。

**1.1.4 主要试剂** 哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢曲松、亚胺培南、美罗培南、多粘菌素、庆大霉素、阿米卡星、米诺环素、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星购自大连美仑生物技术有限公司。替加环素 (美国辉瑞公司); M-H 琼脂粉和药敏纸片 (英国 Oxoid 公司); 细菌基因组试剂盒 (Tiagen); RNA 提取试剂盒、SYBR Green 逆转录 PCR 试剂盒、PCR Master Mix、DNA marker DL2000 均购自日本 TaKaRa 公司; 琼脂糖及染料购自上海生工工程有限公司。

2019-06-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81373072)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院感染科, 合肥 230022

作者简介: 赵亚运, 男, 硕士研究生;

叶英, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yeying2@139.com

**1.1.5 引物合成** 外排泵基因中的引物设计参考文献<sup>[5-6]</sup>委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。见表1。

表1 RT-PCR 引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	文献来源
<i>adeB</i> -R	GCTTTTCTACTGCACCCAAA	6
<i>adeB</i> -F	CTTGCAATTTACGTGTGGTGT	
<i>adeJ</i> -R	GGTACGAATACCGCTGTCA	6
<i>adeJ</i> -F	GGTCATTAATATCTTTGGC	
<i>macB</i> -R	CGGCTCATGACCGTGGTATAA	5
<i>macB</i> -F	CGGAATGGGTTCCGATGAC	
<i>emrB</i> -R	TGAGCGTTTGGTTCTGGAAA	5
<i>emrB</i> -F	GCGGATGATTCCGACTTC	
<i>abeS</i> -R	GGCATAGGCAATCCCGATT	5
<i>abeS</i> -F	TGTGGGTTATGCAGTTGCTTTT	
<i>abeM</i> -R	ATGGCCTAATGCTTCGGAATAG	5
<i>abeM</i> -F	TGGGTATGCCCCTGTAAC	
<i>craA</i> -R	GAAGACGGCGCCCAAGT	5
<i>craA</i> -F	CCTGATTACGCCAGCCATGT	
<i>rpoB</i> -R	TCCGCACGTAAAGTAGGAAC	6
<i>rpoB</i> -F	ATGCCCGCTGAAAAAGTAAC	
16s rRNA-R	AGCATTTCCGGATGGGAACCTTA	5
16s rRNA-F	GTCGTCCCGCCTTCCT	

## 1.2 方法

**1.2.1 药敏实验** 采用 M-H 琼脂稀释法进行 MIC 检测,以大肠埃希菌标准菌(ATCC25922)和铜绿假单胞菌(ATCC27853)作为质控菌株,并以2017版美国临床和实验室标准协会(CLSI)<sup>[7]</sup>的标准判断抗菌药物敏感性。通过肉汤稀释法检测MDR-AB临床分离株对替加环素的敏感性,由于CLSI上无替加环素对不动杆菌的MIC折点解释标准,参照欧洲药敏试验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)标准。解释标准为: $>2 \mu\text{g/ml}$ 为耐药; $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ 为敏感。

**1.2.2 外排泵基因的检测** 按照细菌基因组试剂盒说明提取各株菌的基因组。PCR反应体系及条件: $2 \times \text{Taq PCR Master Mix } 12.5 \mu\text{l}$ ,上、下游引物各 $0.5 \mu\text{l}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O } 10.5 \mu\text{l}$ , DNA模板 $1 \mu\text{l}$ 。以 $\text{ddH}_2\text{O}$ 为空白对照。第1步 $94^\circ\text{C}$ 预热变性5 min;第2步 $95^\circ\text{C}$ 变性1 min, $53^\circ\text{C} \sim 58^\circ\text{C}$ 退火复性30 s, $72^\circ\text{C}$ 延伸1 min,进行30个循环;第3步 $72^\circ\text{C}$ 延伸10 min;第4步 $4^\circ\text{C}$ 静止10 min。PCR反应产物取 $5 \mu\text{l}$ 与 $0.5 \mu\text{l}$   $10 \times$ 上样缓冲液混合,用1%琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后在凝胶成像仪上观察结果保存。

**1.2.3 外排泵表型抑制试验** 将临床菌株及诱导菌株作为研究对象,采用稀释法,分别加入不同浓度

的外排泵抑制剂苯丙氨酸-精氨酸- $\beta$ -苯胺(PA $\beta$ N)进行筛选,比较菌株加入外排泵抑制剂前后对替加环素及亚胺培南MIC值的变化,其MIC较使用前下降4倍以上,判断为外排泵阳性<sup>[8]</sup>。

**1.2.4 RT-PCR 检测外排泵基因的表达水平** 取上一步筛选出的外排泵基因阳性的菌株进行实验,并以标准菌株ATCC17978为对照组进行实验。

**1.2.4.1 提取菌株 RNA** 挑选平板上单个菌落接种于4 ml LB培养基中, $37^\circ\text{C}$  210 r/min 过夜,取40  $\mu\text{l}$ 的菌液加入4 ml LB培养基中, $37^\circ\text{C}$  210 r/min 培养6~8 h, $12\,000 \text{ r/min}$  离心1 min,收菌液于无酶的EP管中,按照试剂盒操作说明书步骤提取细菌RNA,最后测其浓度。

**1.2.4.2 逆转录(冰上操作)** 按照试剂盒说明书进行,反应体系如下: $5 \times \text{primerscript buffer } 4 \mu\text{l}$ ,  $\text{primerscript RT Enzyme Mix I } 1 \mu\text{l}$ , RT primer Mix  $1 \mu\text{l}$ , RNase Free  $\text{ddH}_2\text{O}$  和 RNA Template 共 $14 \mu\text{l}$ ,总反应体系 $20 \mu\text{l}$ 。逆转录反应条件 $37^\circ\text{C}$ 、15 min, $85^\circ\text{C}$ 、5 s, $4^\circ\text{C}$ 保存。

**1.2.4.3 荧光定量 PCR** 取逆转录后的cDNA按照试剂盒说明进行荧光定量PCR,以管家基因 $\text{rpoB}$ <sup>[6]</sup>为内参基因,反应条件及体系为:SYBR Premix Ex TaqII  $12.5 \mu\text{l}$ ,模板cDNA  $2 \mu\text{l}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O } 8.5 \mu\text{l}$ ,总共 $25 \mu\text{l}$ 。反应步骤为: $95^\circ\text{C}$ 预变性30 s, $95^\circ\text{C}$ 变性5 s, $60^\circ\text{C}$ 延伸50 s,共45个循环。使用Roche Lightcycler<sup>®</sup> 96 System 配套软件分析样本中 $\text{rpoB}$ 和外排泵基因的CT值,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行耐药菌株间的外排泵基因表达水平进行分析。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本之间的比较采用student  $t$  检验进行, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 药物敏感结果分析** 26株临床分离的多重耐药的鲍曼不动杆菌体外抗菌活性见表2。从表中可以看出,临床分离的多重耐药的鲍曼不动杆菌对临床常用的头孢类、青霉素类、氨基糖苷类、亚胺培南及美罗培南抗菌药物耐药率超过80%,米诺环素的耐药率46.15%,头孢哌酮钠/舒巴坦钠耐药率46.16%以上,替加环素耐药率11.55%,所有实验菌株对多粘菌素均敏感。其中17978TGC对亚胺培南、美罗培南、多粘菌素敏感,其他抗菌药物都产生不同程度的耐药,17978IMP中除米诺环素、替加环

素、多粘菌素都敏感,其他药物都产生了不同程度的耐药。

表2 26株鲍曼不动杆菌对18种抗菌药药敏实验结果[n(%)]

抗菌药物	耐药(R, %)	中介(I, %)	敏感(S, %)
哌拉西林	26(100.00)	0(0)	0(0)
哌拉西林/他唑巴坦	24(96.15)	1(3.85)	0(0)
头孢他啶	24(92.30)	1(3.85)	1(3.85)
头孢吡肟	23(88.45)	1(3.85)	2(7.70)
头孢噻肟	24(92.30)	1(3.85)	1(3.85)
头孢曲松	24(92.30)	1(3.85)	1(3.85)
亚胺培南	26(100.00)	0(0)	0(0)
美罗培南	26(100.00)	0(0)	0(0)
庆大霉素	24(92.30)	0(0)	2(7.70)
阿米卡星	23(88.45)	0(0)	3(11.55)
米诺环素	12(46.15)	2(7.70)	12(46.15)
环丙沙星	24(92.30)	0(0)	2(7.70)
左氧氟沙星	21(80.77)	1(3.85)	4(15.38)
加替沙星	22(84.60)	1(3.85)	3(11.55)
替加环素	3(11.55)	7(26.92)	16(61.53)
头孢哌酮钠/舒巴坦钠	12(46.16)	8(30.76)	6(23.08)
多粘菌素B	0(0)	-	26(100.00)
甲氧苄啶/磺胺甲恶唑	26(100.00)	-	0(0)

注:在CLSI琼脂稀释和纸片扩散法中以头孢哌酮钠舒巴坦钠的折点为判断标准,本研究K-B纸片扩散法采用头孢哌酮对铜绿假单胞菌的敏感性判断标准;即S:  $\geq 21$  mm, I: 16~20 mm, R:  $\leq 15$  mm

**2.2 外排泵基因的检测结果** 26株临床分离株中20株菌均检出了 $adeB$ (571 bp)、 $adeJ$ (471 bp)、 $abeM$ (460 bp)、 $abeS$ (148 bp)、 $macB$ (540 bp)、 $emrB$ (570 bp)、 $craA$ (930 bp),并经过了测序确认,2株诱导菌株全部测出以上外排泵基因,从数据上可以了解到多重耐药的鲍曼不动杆菌中均有外排泵基因分布,其中 $macB$ 、 $emrB$ 的检出率在90%以上。部分菌株外排泵基因的PCR产物电泳结果见图1。

**2.3 外排泵抑制试验** 经预实验筛选后,添加

PA $\beta$ N(50 mg/L)后,3株替加环素耐药菌株的MIC值下降了4~8倍,26株碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌中13株的MIC下降了4~16倍以上,2株诱导耐药菌株的MIC下降了16倍。

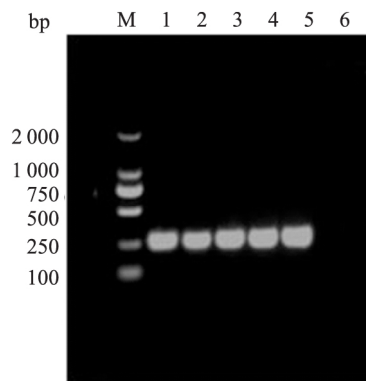


图1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

M: DNA Marker; 1~5: 鲍曼不动杆菌; 6: 空白对照

**2.4 外排泵基因 mRNA 表达水平和抗菌药物之间的关系** 本实验所用菌株与标准菌株主动外排泵基因 $adeB$ 、 $adeJ$ 、 $adeS$ 的mRNA表达量具有明显的差异且具有统计学意义(表3),部分菌株外排泵基因的mRNA表达量差异无统计学意义但表达量高于标准株。由于多重耐药的鲍曼不动杆菌抗菌药物选择压力,替加环素和亚胺培南是临床治疗多重耐药的鲍曼不动杆菌的首选药物,因此选择替加环素和亚胺培南作为分析用来反映外排泵的表达量和抗菌药物的关系,3株替加环素耐药菌株中 $adeB$ ( $P < 0.05$ )、 $adeJ$ ( $P < 0.05$ )、 $macB$ ( $P < 0.05$ )的表达量高于标准菌株(图2),亚胺培南耐药菌株中 $adeB$ ( $P < 0.05$ )、 $adeJ$ ( $P < 0.05$ )表达明显高于标准菌株(图3)。

表3 多重耐药的鲍曼不动杆菌和诱导耐药菌株外排泵基因 mRNA 的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

菌株	$adeB$	$adeJ$	$emrB$	$macB$	$abeS$	$abeM$	$craA$
17978	1.08 $\pm$ 0.32	1.03 $\pm$ 0.31	1.00 $\pm$ 0.23	1.04 $\pm$ 0.32	1.03 $\pm$ 0.11	1.05 $\pm$ 0.23	1.06 $\pm$ 0.32
17978TGC	551.98 $\pm$ 137**	8.65 $\pm$ 0.81**	0.52 $\pm$ 0.41	10.84 $\pm$ 1.32**	0.45 $\pm$ 0.13*	10.63 $\pm$ 1.48**	0.97 $\pm$ 0.09
17978IMP	12.42 $\pm$ 4.12**	18.18 $\pm$ 8.15*	0.97 $\pm$ 0.41	3.34 $\pm$ 0.27**	8.14 $\pm$ 0.29*	3.56 $\pm$ 0.34*	4.53 $\pm$ 1.56**
GN172587	33.34 $\pm$ 11.41**	3.06 $\pm$ 0.71**	0.52 $\pm$ 0.35	2.97 $\pm$ 0.62**	0.54 $\pm$ 0.24*	1.13 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.08**
GN172015	12.54 $\pm$ 2.15**	12.83 $\pm$ 0.77*	1.05 $\pm$ 0.49	3.64 $\pm$ 0.57*	10.67 $\pm$ 4.06*	1.59 $\pm$ 0.13	0.82 $\pm$ 0.14*
GN172837	38.81 $\pm$ 7.84**	35.92 $\pm$ 1.24**	0.28 $\pm$ 0.06	4.71 $\pm$ 0.21**	7.43 $\pm$ 1.13	1.39 $\pm$ 0.45	0.77 $\pm$ 0.18
GN170678	78.00 $\pm$ 13.82**	16.45 $\pm$ 2.77*	0.30 $\pm$ 0.03*	1.06 $\pm$ 0.11	14.37 $\pm$ 4.84*	1.32 $\pm$ 0.28	0.78 $\pm$ 0.18
GN170685	16.79 $\pm$ 1.73*	10.23 $\pm$ 0.02**	0.33 $\pm$ 0.16*	1.41 $\pm$ 0.35	0.42 $\pm$ 0.12*	1.50 $\pm$ 0.26	1.62 $\pm$ 0.22*
GN170182	20.44 $\pm$ 2.44*	5.58 $\pm$ 0.14**	0.52 $\pm$ 0.10**	1.70 $\pm$ 0.33	7.19 $\pm$ 1.02*	1.17 $\pm$ 0.30	0.75 $\pm$ 0.11**
GN172740	27.83 $\pm$ 3.59*	59.40 $\pm$ 11.41*	0.36 $\pm$ 0.01**	3.56 $\pm$ 0.34*	8.66 $\pm$ 2.06*	0.58 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.06**
GN171396	31.36 $\pm$ 7.68*	13.22 $\pm$ 1.90**	0.22 $\pm$ 0.06*	1.27 $\pm$ 0.12*	4.76 $\pm$ 1.24*	2.10 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.22*

17978TGC: 替加环素诱导耐药菌株; 17978IMP: 亚胺培南诱导菌株; 与17978组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

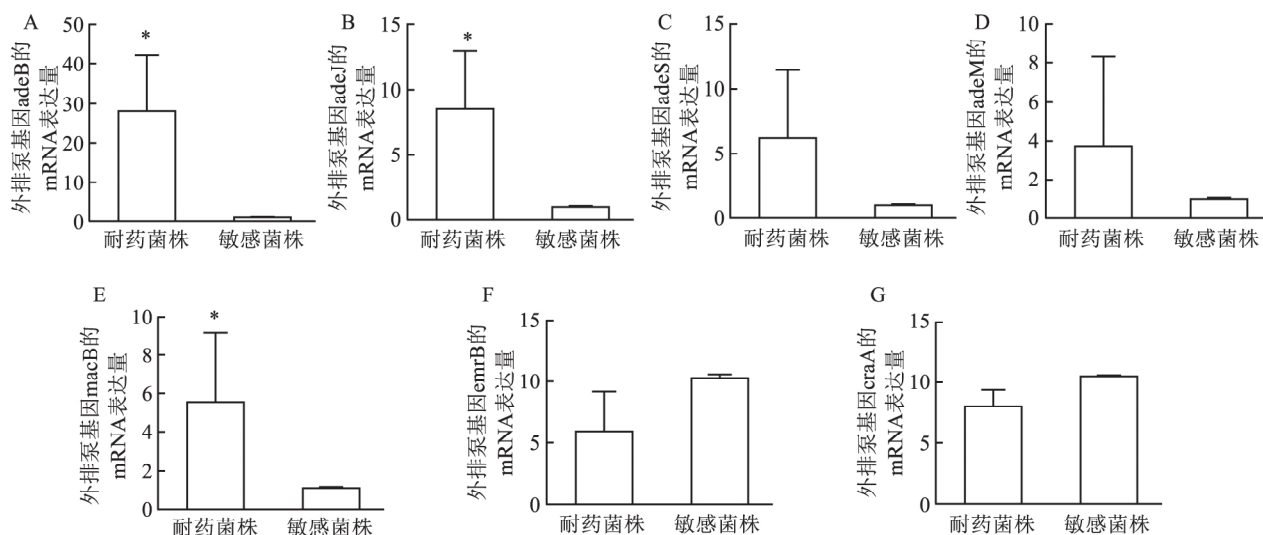


图2 替加环素耐药菌株和敏感菌株外排泵基因的表达量

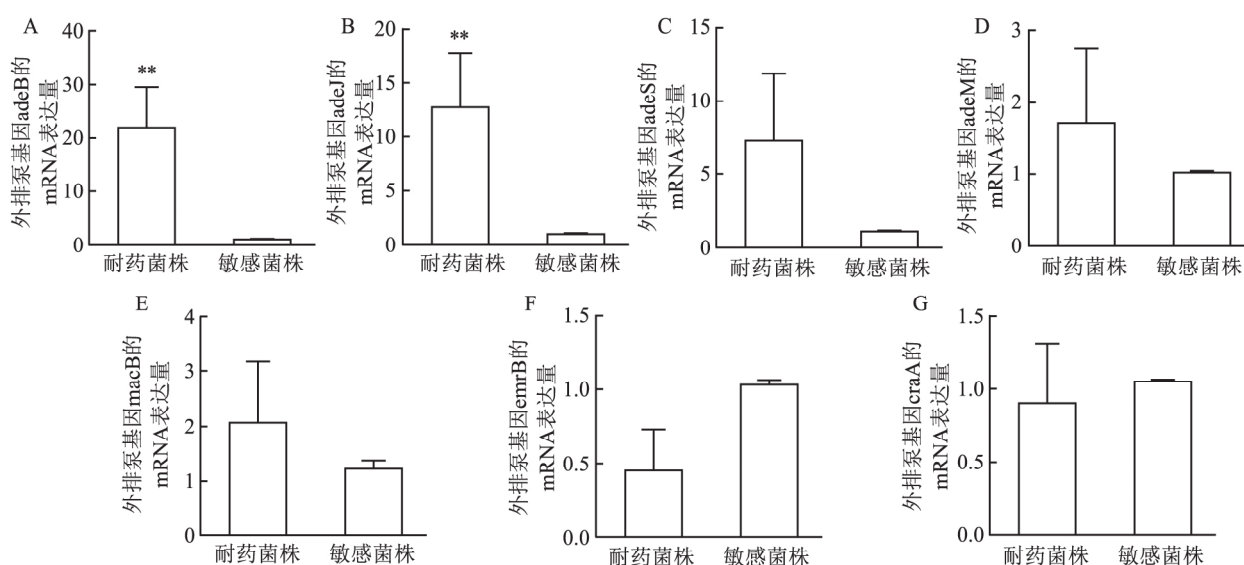
A: *adeB* 基因; B: *adeJ* 基因; C: *abeS* 基因; D: *abeM* 基因; E: *macB* 基因; F: *emrB* 基因; G: *CraA* 基因; 与敏感菌株比较: \*  $P < 0.05$ 

图3 亚胺培南耐药菌株和敏感菌株外排泵基因的表达量

A: *adeB* 基因; B: *adeJ* 基因; C: *abeS* 基因; D: *abeM* 基因; E: *macB* 基因; F: *emrB* 基因; G: *CraA* 基因; 与敏感菌株比较: \*\*  $P < 0.01$ 

### 3 讨论

鲍曼不动杆菌是一种需氧的革兰阴性条件致病菌,广泛存在于医院环境中,由于具有较强的存活力和抵抗力,鲍曼不动杆菌的感染已经成为全球医院需要解决的难题。本实验收集的26株临床分离的多重耐药的鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物产生不同程度的耐药,其中碳青霉烯类亚胺培南和美罗培南为100%耐药,头孢菌素类抗菌药物耐药率比较相近,氨基糖苷类抗菌药物阿米卡星耐药率较庆

大霉素低,喹诺酮类抗菌药物左氧氟沙星耐药率较环丙沙星低,上述结果证实了多重耐药的鲍曼不动杆菌对多粘菌素和替加环素保持较高的敏感性。2株诱导菌株与标准菌株相比对青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、喹诺酮类抗菌药物均产生了耐药。本实验收集的菌株均对多粘菌素敏感。鲍曼不动杆菌在亚胺培南、替加环素的作用下可以发展成为多重耐药,并同时对抗生素类、头孢菌素类、氨基糖苷类等抗菌药物也耐药。

目前在鲍曼不动杆菌中报道的有 AdeABC、

AdeIJK<sup>[9]</sup>、AdeFGH<sup>[10]</sup>、AdeDE<sup>[11]</sup>、AdeXYZ、AbeM、AbeS 等主动外排泵系统。本实验探讨了在鲍曼杆菌 ATP 结合盒家族 MacAB-tolC 外排泵基因 *macB* 和主要易化子超家族 EmrAB 外排泵基因 *emrB* ,其中 *macB* 基因<sup>[3]</sup> 的表达上调和替加环素的耐药有关, Lin et al<sup>[4]</sup> 发现 *emrB* 基因敲除的鲍曼不动杆菌比野生株对多粘菌素更敏感。结果显示, 外排泵基因 *adeB*、*adeJ*、*abeM*、*abeS*、*macB*、*emrB*、*craA*<sup>[12]</sup> 广泛分布于临床分离株中, 3 株临床分离的替加环素耐药菌加入替加环素与 PaβN 后 MIC 下降了 4~8 倍, 诱导耐药菌株下降了 8 倍, 表明外排泵在替加环素耐药的鲍曼不动杆菌有一定的作用, 在转录水平中 *macB* 和 *adeB*、*adeJ* 的表达明显高于标准菌株, 替加环素诱导耐药菌株中 *adeB* 的表达水平高于耐药菌株。同时验证了 Lee et al<sup>[13]</sup> 报道的 *adeB* 基因的表达水平可反映外排泵 *AdeABC* 基因的过表达是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药的一个机制。本研究尚未发现 *abeM*<sup>[14]</sup> 在亚胺培南耐药菌中的作用, 但发现了在多重耐药的鲍曼不动杆菌中 *adeJ* 基因高表达。本实验收集的菌株均对多粘菌素敏感, 因此 *emrB* 基因的表达量相对较低。由于鲍曼不动杆菌耐药机制比较复杂, 除外排泵基因外还有产生 β-内酰胺酶、外膜蛋白改变、青霉素结合蛋白位点的改变、生物被膜形成、核糖体保护机制<sup>[15]</sup> 等。因此鲍曼不动杆菌的耐药机制仍需要进一步研究。

综上, 在抗菌药物大量使用的压力下使细菌固有的主动外排系统表达增强, 其质粒、转座子、耐药岛等遗传元件在不同细菌之间广泛的传播, 使主动外排泵基因等水平转移, 导致多重耐药的鲍曼不动杆菌发生迅速播散, 通过主动外排系统的研究可以为临床鲍曼不动杆菌耐药机制提供新的科学依据。由于主动外排泵的机制比较复杂, 种类繁多, 多个外排泵之间可以相互作用, 本文通过分析了多重耐药的鲍曼不动杆菌与外排泵之间的关系, 旨在为临床抗菌药物及非抗菌药物的研发提供新的靶点。

### 参考文献

- [1] 倪语星, 尚红. 临床微生物学与检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 159-62.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017 年中国 CHINET 细菌耐药性检测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-51.

- [3] Li H, Wang X, Zhang Y, et al. The role of RND efflux pump and global regulators in tigecycline resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates [J]. *Future Microbiol* 2015, 10(3): 337-46.
- [4] Lin M F, Lin Y Y, Lan C Y. Contribution of EmrAB efflux pumps to colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Microbiol*, 2017, 55(2): 130-6.
- [5] Lin M F, Lin Y Y, Tu C C, et al. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance [J]. *J Microbiol Immunol Infect* 2017, 50(2): 224-31.
- [6] He X, Lu F, Yuan F, et al. Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(8): 4817-25.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement [S]. M100-S25, CLSI, 2017.
- [8] 王友梅, 沈继龙, 沈继录, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌外排泵机制的初步研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(1): 38-40.
- [9] Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al. A resistance-modulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, 52(2): 557-62.
- [10] Su X Z, Chen J, Mizushima T, et al. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(10): 4362-4.
- [11] Srinivasan V B, Rajamohan G, Gebreyes W A. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12): 5312-6.
- [12] Roca I, Marti S, Espinal P, et al. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(9): 4013-4.
- [13] Lee Y, Yum J H, Kim C K, et al. 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): 43-8.
- [14] Hou P F, Chen X Y, Yan G F, et al. Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Chemother*, 2012, 58(2): 152-8.
- [15] 刘秋萍, 徐凌. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(10): 1179-87.

网络出版时间: 2019-09-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.018.html>

## IL-1 $\beta$ 对华勒变性早期雪旺细胞增殖与凋亡的影响

罗晓荷<sup>1</sup>, 陈刚<sup>2</sup>, 王宜梅<sup>3</sup>, 王炜<sup>2</sup>, 朱飞<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨周围神经系统华勒变性(WD)早期白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )对雪旺细胞(SCs)增殖和凋亡的影响,并研究相关作用机制。方法 取6~8周龄健康雄性SD大鼠双侧坐骨神经制备WD体外模型,分别给予0 ng/ml IL-1 $\beta$ (对照组)和5 ng/ml IL-1 $\beta$ (实验组)干预培养。培养48 h后免疫荧光染色检测SCs增殖标志物Ki67表达情况;Tunel法细胞凋亡染色检测细胞凋亡情况。培养24 h Western blot检测B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白和Bcl-2关联X蛋白(Bax)的蛋白表达。结果 免疫荧光染色显示干预48 h后实验组Ki67阳性率高于对照组( $P < 0.05$ );Tunel法染色显示干预

48 h后实验组SCs凋亡率较对照组降低( $P < 0.05$ );Western blot显示干预24 h后实验组较对照组中SCs凋亡抑制蛋白Bcl-2/凋亡促进蛋白Bax表达量比例升高( $P < 0.05$ )。结论

WD早期适当浓度IL-1 $\beta$ 具有促进SCs增殖和抑制SCs凋亡的积极作用,并认为IL-1 $\beta$ 可通过Bcl-2/Bax通路抑制SCs凋亡。

**关键词** 白细胞介素-1 $\beta$ ; 雪旺细胞; 华勒变性; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号 R 741.02

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1579-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.017

2019-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81601700)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院整形外科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 上海交通大学附属第九人民医院整复外科, 上海 200011

<sup>3</sup> 南昌大学第一附属医院整形美容科, 南昌 330006

作者简介: 罗晓荷, 女, 硕士研究生;

朱飞, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfzfx@163.com;

陈刚, 男, 主治医师, 博士, 责任作者, E-mail: chengang0626@foxmail.com

再生医学作为极具潜力的新兴医学领域,通过修复、替换或再生器官和组织的方式恢复受损组织的功能<sup>[1]</sup>。人类具有有限的再生修复组织和器官的能力,当周围神经损伤后即发生华勒变性(wallerian degeneration, WD),损伤处残存的雪旺细胞(schwann cells, SCs)的数量和增殖分化能力是影响神经再生修复的关键因素。在此过程中SCs去分化,分泌大量生长因子,促进轴突生长和髓鞘形成,

## Preliminary study on the resistance of *Acinetobacter baumannii* and mechanism of drug efflux pumps

Zhao Yayun, Wang Xinling, Zhu Yunzhu et al

(Dept of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the distribution of efflux pump gene and its relationship with drug resistance.

**Methods** The minimal inhibitory concentration (MIC) of 18 antimicrobial agents against 26 multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates were determined by dilution method and disk diffusion method respectively. *adeB*, *adeJ*, *macB*, *emrB*, *abeS*, *abeM*, *craA* efflux pump genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Quantitative gene real-time PCR was performed to investigate the expression of efflux pump genes. **Results**

All twenty-six multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* showed highly resistant to 18 antimicrobial agents and three of them were tigecycline-resistant isolates. The detectable rate of clinically isolated multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* strains of *adeJ* and *abeM* were 100% (26/26), and the detection rates of *abeS*, *adeB* and *craA* were 96.15% (25/26) and 92.31% (24/26), 84.62% (22/26), respectively. The detection rate of efflux pump gene *macB* and *emrB* was more than 80%. The average expression levels of *macB* of tigecycline-resistant strains was 5.8-fold than that of the standard strain. **Conclusion** The detection rate of efflux pump gene *macB*, *emrB*, *craA* in multi-drug resistant *Acinetobacter* are higher, and the expression of *macB* is related to tigecycline resistance.

**Key words** *Acinetobacter baumannii*; efflux pump; resistance mechanisms