

阿司匹林提高幽门螺杆菌对克拉霉素敏感性的机制

张孝平, 王蔚虹, 田雨, 高文, 胡伏莲, 李江

■背景资料

早期研究表明, 水杨酸盐可以抑制某些细菌的生长, 并影响其毒力因子的活性, 从而可能改变细菌的致病性。水杨酸盐制剂对不同细菌的不同抗生素敏感性影响却显示不同: 水杨酸盐可以部分细菌产生多重抗生素耐药, 但却可以提高这些细菌对氨基糖甙类抗生素的敏感性。

张孝平, 王蔚虹, 田雨, 高文, 胡伏莲, 李江, 北京大学第一医院消化内科北京市 100034

张孝平, 北京大学第一医院消化内科硕士, 主要从事非甾体消炎药对幽门螺杆菌作用机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30470777

作者贡献分布: 王蔚虹与张孝平对此文所作贡献两均等; 此课题由王蔚虹设计; 研究过程由张孝平, 田雨, 高文及李江操作完成; 数据分析由张孝平与王蔚虹完成; 本论文写作由张孝平与王蔚虹完成; 胡伏莲负责本课题的理论指导。

通讯作者: 王蔚虹, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科。wangweihong@medmail.com.cn
电话: 010-66551122-2581 传真: 010-66518105

收稿日期: 2008-02-26 修回日期: 2008-04-02

Mechanisms of aspirin increasing the susceptibility of *Helicobacter pylori* to clarithromycin

Xiao-Ping Zhang, Wei-Hong Wang, Yu Tian, Wen Gao, Fu-Lian Hu, Jiang Li

Xiao-Ping Zhang, Wei-Hong Wang, Yu Tian, Wen Gao, Fu-Lian Hu, Jiang Li, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30470777

Correspondence to: Wei-Hong Wang, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Avenue, Xicheng District, Beijing 100034, China. wangweihong@medmail.com.cn

Received: 2008-02-26 Revised: 2008-04-02

Abstract

AIM: To investigate the mechanisms of aspirin increasing the susceptibility of *H pylori* to clarithromycin.

METHODS: Mutations in V function domain of 23S rRNA gene were identified by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism analysis. *H pylori* strain 26695 treated with or without aspirin was incubated with [7-³H] tetracycline. Endocellular radioactivity at different time points was analyzed in a liquid scintillation counter. Outer membrane proteins (OMPs) of *H pylori* 26695 were deputed and analyzed by SDS-PAGE. Total RNA of *H pylori* 26695 was extracted and the cDNA of the 5 porins (*hopA*, *hopB*, *hopC*, *hopD*, *hopE*) and the putative RND efflux system (*hefABC*) were obtained by reverse tran-

scription (RT). The expression of the above 8 cDNAs were analyzed using Taqman-based real-time PCR.

RESULTS: Position 2143A-G mutations in V function domain of 23S rRNA gene did not change in clarithromycin resistant strains treated with aspirin. The radioactivities of *H pylori* cells increased when treated with aspirin, indicating that aspirin improved the permeability of the outer membrane of *H pylori* to antimicrobials. The OMP profiles of *H pylori* treated with aspirin were similar to that of controls. However, the expression of two OMPs between 55-72 kDa altered in the presence of aspirin. Irrespective of the presence of aspirin, the expression of *hopA*, *hopB*, *hopC*, *hopD*, *hopE* and *hefA*, *hefB*, *hefC* did not change at the mRNA level.

CONCLUSION: Aspirin may enhance the permeability of the outer membrane of *H pylori* to antimicrobials, and thus increase the endocellular concentrations of antimicrobials probably by altering the OMP expression.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Aspirin; Clarithromycin; Real-time PCR

Zhang XP, Wang WH, Tian Y, Gao W, Hu FL, Li J. Mechanisms of aspirin increasing the susceptibility of *Helicobacter pylori* to clarithromycin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(18): 1990-1996

摘要

目的: 探讨阿司匹林提高幽门螺杆菌(*H pylori*)对克拉霉素敏感性的机制。

方法: 二氧化硅法提取细菌基因组DNA, 限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测阿司匹林处理前后23S rRNA突变位点的变化。液体闪烁计数法与SDS-PAGE电泳法分别测定阿司匹林处理前后*H pylori*胞内[7-³H]四环素的放射活性和外膜蛋白的变化。实时定量PCR(Taqman探针法)测定编码*H pylori*孔蛋白基因(*hopA*、*hopB*、*hopC*、*hopD*和*hopE*)及外流泵蛋白基因(*hefA*、*hefB*和*hefC*)的变化。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化病研究所; 杨建民, 教授, 浙江省人民医院消化内科

结果: 阿司匹林不改变*H pylori*克拉霉素耐药菌株23SrRNA基因的2143A-G突变位点, 其增加*H pylori*胞内放射活性. 阿司匹林处理后*H pylori*外膜蛋白在分子量55-72 kDa之间有两条带表达改变, 其不改变*H pylori*孔蛋白基因*hopA*、*hopB*、*hopC*、*hopD*、*hopE*及外流泵蛋白基因*hefA*、*hefB*、*hefC*的mRNA水平.

结论: 阿司匹林可能通过改变*H pylori*外膜蛋白的表达, 提高*H pylori*外膜对抗生素的通透性, 增加*H pylori*胞体内抗生素浓度.

关键词: 幽门螺杆菌; 阿司匹林; 克拉霉素; 实时定量PCR

张孝平, 王蔚虹, 田雨, 高文, 胡伏莲, 李江. 阿司匹林提高幽门螺杆菌对克拉霉素敏感性的机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(18): 1990-1996
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1990.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染在世界范围内广泛存在, 被认为是导致慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌的重要致病因子. 预防及根除*H pylori*感染已成为预防和治疗上述疾病的主要措施. 近年随着*H pylori*对抗生素耐药性的逐年增加, 目前国内外共识推荐的质子泵抑制剂加克拉霉素、甲硝唑或阿莫西林的三联方案的根除率正在逐年下降, 临床迫切需要寻找根除*H pylori*的新方案及克服细菌耐药性的新方法. 非甾体类消炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)是临床应用最广泛的药物之一, 很久以来就有学者注意到NSAIDs特别是阿司匹林可抑制某些细菌的生长, 改变细菌毒力因子的产生, 并影响某些细菌对抗生素的敏感性^[1]. 近年研究显示, 在体外培养的条件下, 阿司匹林(乙酰水杨酸), 水杨酸钠, 吡啶美辛及选择性的环氧化酶抑制剂SC-236均可剂量依赖性的抑制*H pylori*生长^[2-4], 并可降低*H pylori*尿素酶和空泡毒素活性^[4-5]. 在较低的体外抑菌浓度下, 阿司匹林, 吡啶美辛及SC-236还可以降低*H pylori*对克拉霉素, 阿莫西林及甲硝唑的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 从而提高*H pylori*对这些临床一线使用的抗生素的敏感性, 甚至使某些*H pylori*的耐药菌株变为敏感菌株^[2-4]. 本研究以限制性片段长度多态性的方法, 检测阿司匹林对克拉霉素耐药菌株的23SrRNA基因突变位点的影响, 初步探讨阿司匹林提高*H pylori*对克拉霉素敏感性的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 标准菌株*H pylori* 26695及3株临床分离的克拉霉素耐药菌株. 阿司匹林及CCCPC自Sigma公司, 分别溶于二甲基亚砜(DMSO)中备用; [7-³H]tetracycline(0.6 Ci/mmol; 22.2 GBq/mmol; Dupont/NEN Research Products, Boston, Mass.)自Perkin-Elmer公司, 溶于稀盐酸中备用; 限制性内切酶*Bsa* I酶自New England Biolabs公司.

1.2 方法

1.2.1 E-test检测*H pylori*的MIC: 收集含80 g/L羊血的Columbia琼脂培养基上培养48 h的克拉霉素耐药*H pylori*菌株, 调整浓度至 3×10^{11} cfu/L, 接种于含和不含阿司匹林(1 mmol/L)的平皿中, L棒均匀涂开, 晾干后放置一条含克拉霉素的E-test药条(OXOID公司), 37°C微需氧培养72 h.

1.2.2 *H pylori*液体培养体系的建立: 收集培养48 h的*H pylori*, 于含有100 mL/L胎牛血清的布氏肉汤培养液中, 调整浓度在 1×10^{10} - 1×10^{11} cfu/L, 20 mL菌液加入灭菌10 cm的培养皿中, 37°C, 微需氧, 空气摇床60 r/min, 培养48 h.

1.2.3 *H pylori*基因组DNA的提取: 收集液体培养的*H pylori*, 以Tris-HCl洗涤, 细菌沉淀溶于100 μ L TE中, 加入二氧化硅溶液5 μ L及结合液(4 mol/L异硫氰酸胍, 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA)400 μ L, 55°C加热5 min, 每分钟振摇1次. 室温8000 r/min离心, 30 s, 弃上清. 以清洗液(20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl高压消毒后加入等量无水乙醇)反复洗涤3次. 沉淀置于55°C干燥后溶于50 μ L TE中备用.

1.2.4 克拉霉素耐药基因突变位点的检测: PCR扩增包含23SrRNA基因V功能区的DNA片段: 上游引物: 5'-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3', 下游引物: 5'-CTCCATAAGAGCCA AAGCCC-3'. PCR反应总体积50 μ L, 包括*H pylori*基因组DNA 5 μ L、10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTPs(各2.5 mmol/L)5 μ L, 上、下游引物(各5 μ mol/L)2 μ L、1 U TaqDNA聚合酶0.5 μ L. 反应条件: 94°C预变5 min, 94°C变性1 min、55°C退火1 min、72°C延伸1 min, 35个循环, 72°C延伸10 min. 扩增产物预期长度为425 bp. 10 μ L PCR产物用*Bsa* I限制性内切酶酶切, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳观察PCR产物及酶切产物.

1.2.5 检测*H pylori*外膜对抗生素通透性: 收集液体培养6 h的*H pylori* 26695, 以HEPES

■ 研发前沿

*H pylori*感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡的主要致病因素, 与胃癌、胃黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤的发生密切相关. 近年研究表明, *H pylori*感染在心脑血管性疾病、免疫性疾病、血液系统疾病、营养代谢性疾病和皮肤病等疾病的发病中起一定的作用. 根除*H pylori*对治疗和预防上述疾病是十分重要的. 但*H pylori*的耐药问题已经显得越来越突出, 临床研究表明, *H pylori*对克拉霉素耐药是导致根除治疗失败的主要原因.

■相关报道

Wang *et al* 研究发现, 在体外培养条件下, 阿司匹林及呋喃唑酮不仅剂量依赖性地抑制 *H pylori* 的生长, 而且可以降低 *H pylori* 对甲硝唑、阿莫西林和克拉霉素的体外 MIC, 从而提高 *H pylori* 对这三种抗生素的敏感性, 甚至使耐药菌株转变为敏感菌株。Gu *et al* 研究发现, 呋喃唑酮及选择性 COX-2 抑制剂 SC-236 可以抑制 *H pylori* 的生长及其尿素酶的活性, 还可以提高 *H pylori* 对甲硝唑和克拉霉素的敏感性。马惠霞 *et al* 研究发现阿司匹林及 COX-2 抑制剂塞来昔布可以剂量依赖性地抑制 *H pylori* 的生长, 还可以抑制其毒力因子尿素酶及细菌空泡毒素的活性, 并可能改变其外膜蛋白的表达。

Buffer (pH 7.2, 内含 100 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2) 洗涤、悬浮。10 mL 细菌悬液 (约 $3-5 \times 10^{12}/\text{L}$) 加入 $[7-^3\text{H}]$ tetracycline 至 5 μCi , 室温下孵育, 每 10 min 取 1 mL。20 min 后, 将细菌悬液分成两份, 其中 1 份中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ CCCP, 继续每 10 min 取 1 mL, 直至 60 min。取出的每份菌液立即离心, 以 PBS 洗涤 3 次, 沉淀以闪烁液稀释后, 用液体闪烁计数仪 (TRI-CARB 2100TR) 测定其放射性。

1.2.6 *H pylori* 外膜蛋白的提取: 收集液体培养的 *H pylori* 26695, 以 Tris-Mg 液洗涤三次并重悬, 超声破碎 (每次 30 s, 间隔 3-5 s, 总时间 5 min) 细菌至镜下呈细颗粒状。6000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 取上清。50 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 60 min, 弃上清。沉淀重悬于含 20 mL/L Triton Tris-Mg (pH 7.5) 液中, 室温孵育 30 min, 重复离心、孵育, 再次离心得到沉淀即为细菌外膜蛋白。考马斯亮蓝 G250 法测定细菌外膜蛋白浓度。

1.2.7 SDS-PAGE 凝胶电泳: 取外膜蛋白 10 μg , 进行 SDS-PAGE 垂直电泳, 分离胶 100 g/L, 浓缩胶 50 g/L, 恒压电泳, 浓缩胶 60 V, 分离胶 100 V, 固定液固定 30 min, 2.5 g/L 考马斯亮蓝 R250 染色 30 min, 脱色液反复脱色后观察。

1.2.8 *H pylori* 总 RNA 的提取: 收集液体培养的 *H pylori* 26695, 以 Tris-HCl 洗涤。依次采用 TRIzol 裂解细菌, 氯仿进行液相分离, 异丙醇沉淀 RNA, 最后以 750 mL/L 乙醇洗盐。得到的 RNA 经无 RNA 酶的 DNA 酶 I 处理以去除 DNA 污染。紫外分光光度法测定 RNA 浓度, 置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2.9 实时定量 PCR: 取 RNA 4 μg , DEPC 水稀释后 70 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 冰上 15 min, 加入 5 \times RT Buffer 4 μL , RNasin 0.4 μL , dNTPs 4 μL , Random Primers 2 μL , M-MLV 1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 得到 cDNA 20 μL 。Taqman 探针 5' 端标记的 FAM 为荧光报告基因, 3' 端标记的 TAMRA 为荧光淬灭基因。 *H pylori* 孔蛋白基因 (*hopA*, *hopB*, *hopC*, *hopD* 和 *hopE*) 及外流泵蛋白基因 (*hefA*, *hefB*, *hefC*) Tagman 探针及引物设计采用 Primer Express 3.0 软件 (Applied Biosystem Perkin-Elmer), 核苷酸序列 5'-3' 如下: *hopA* F: ATCATGCTAGTGATGGCGTTAAAG, *hopA* R: CAGGCATAGACGGAGGCAAT, *hopA* Probe: CCAAAAATATTGCATGCGTTCCCGC; *hopB* F: CTTGGTGCAAAACATCGTCAAT, *hopB* R: CCCGCCATAGCTCACTTGAT, *hopB* Probe: TAACGCTAGCCAAAC AACGCTAACATCAGCA; *hopC* F:

CGCTCTTTATAACGCGCAAGTAA, *hopC* R: GCTGTTCCCGGCTCTGAAT, *hopC* Probe: TGGATAAAATCAACGCGCTCAACAATCAG; *hopD* F: CTGCTTGAGCGCGGTTTAA, *hopD* R: CAACCTAGACACTGGGAAAGCAT, *hopD* Probe: CTTGCGCTCTAGCGTTAGCGAACAT GC; *hopE* F: GGATTGCACAGGGAGTGTGT, *hopE* R: GCCCCATTAGCGTATTTAGCAT, *hopE* Probe: TTGCCCCCAGGTCCTACCGCT; *hefA* F: AGGGCGTTTTGGGAATTTCT, *hefA* R: GCATGATGGATTGTTTTTGCA, *hefA* Probe: CCCCCGTCAGCAAAATACGGC TG; *hefB* F: AGGGCGATGTTTTGTTGCTT, *hefB* R: CCCCCAATTTTGCTGTATCGT, *hefB* Probe: AATCAAGACAAACAGGCTCAAAGCGATT CC; *hefC* F: GTTTGC GTTCTTGCGTAAACG, *hefC* R: TGTTTAATGAAAAGCCCATCCA, *hefC* Probe: CACGATCACCTCGTTTCAGCGATC. 50 μL PCR 反应体系包括: 10 \times PCR Buffer (内含 15 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2) 5 μL , cDNA 4 μL , 上下游引物 (各 5 $\mu\text{mol/L}$) 3 μL , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μL , Tagman 探针 2 μL , ROX 1 μL , 1 U TaqDNA 聚合酶 0.5 U。反应循环参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。ABI PRISM 7300 Detector System 自动检测每个 PCR 循环 Reporter 荧光的释放, 根据已知初始 cDNA 分子数的标准曲线, 得出样本的 cDNA 分子数。

统计学处理 实验数据 mean \pm SD 表示, 采用 *t* 检验, 以软件 SPSS 13.0 处理。

2 结果

2.1 对克拉霉素耐药菌株 MIC 的影响 在培养基中含 1 mmol/L 阿司匹林条件下, 3 株克拉霉素耐药的 *H pylori* 菌株的 MIC 均减小: 其中 C1 菌株的 MIC 由 16 mg/L 降低为 <0.016 mg/L, C2 菌株由 12 mg/L 降低为 <0.016 mg/L, C3 菌株由 64 mg/L 降低为 8 mg/L。说明阿司匹林可以提高 *H pylori* 对克拉霉素的敏感性, 其中 C1 及 C2 株菌株由克拉霉素耐药菌株转变为敏感菌株。

2.2 对克拉霉素耐药菌株 23SrRNA 突变位点的影响 3 株克拉霉素耐药菌株经 PCR 均扩增出 425 bp 的 DNA 片段, 其中包含 23SrRNA 基因 V 功能区, C1 及 C2 菌株的 PCR 产物可以被 *Bsa* I 限制性内切酶酶切成两个片段, 提示 C1、C2 菌株在 23SrRNA 基因 V 功能区第 2143 位点有 A-G 突变。C3 菌株的 425 bp 的 DNA 片段未能被 *Bsa* I 酶完

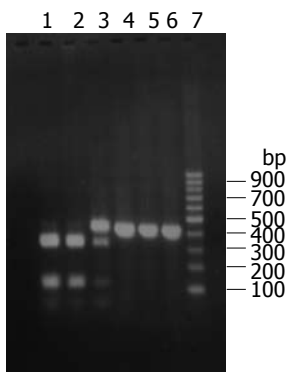


图1 23SrRNA基因的PCR产物及Bsa I 酶切后的DNA片段琼脂糖凝胶电泳图. 1-3: 菌株C1-C3 PCR产物经Bsa I 酶切后的DNA片段; 4-6: 菌株C1-C3的PCR产物; 7: 分子质量Marker.

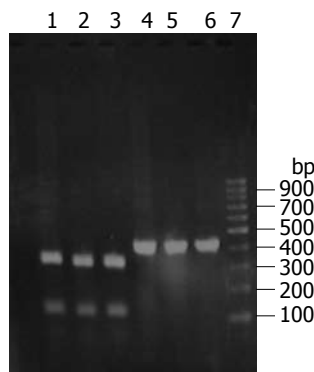


图2 阿司匹林处理前后C2菌株23SrRNA基因的PCR产物及Bsa I 酶切后的琼脂糖凝胶电泳图. 1-3: 阿司匹林处理前、处理后、溶媒对照的C2菌株PCR产物经Bsa I 酶切后的DNA片段; 4-6: 阿司匹林处理前、处理后、溶媒对照的C2菌株PCR产物; 7: 分子质量Marker.

创新盘点
本研究是在针对临床根除*H pylori*治疗中突出的耐药问题, 发现阿司匹林可以提高*H pylori*对克拉霉素敏感性的基础上, 进一步探讨阿司匹林提高*H pylori*根除一线方案的关键抗生素克拉霉素敏感性的机制.

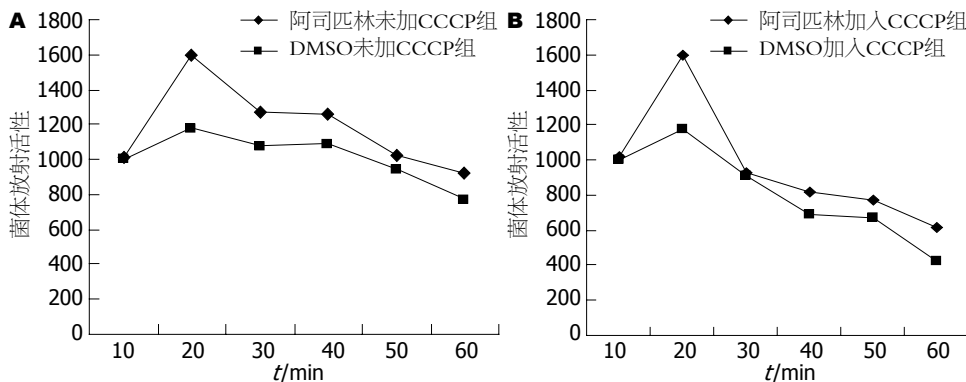


图3 阿司匹林组及DMSO对照组各时间点*H pylori*菌体内的放射性. A: 未加入CCCp组; B: 加入CCCp组.

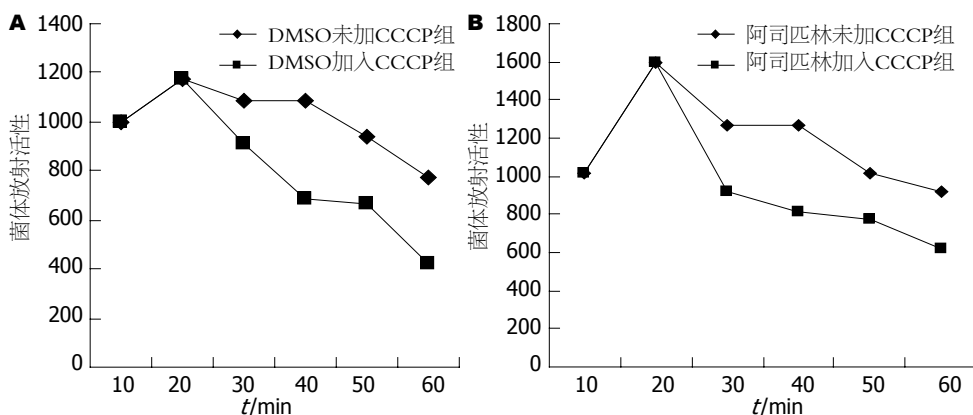


图4 各处理组加入CCCp前后各时间点*H pylori*菌体内的放射性. A: DMSO对照组; B: 阿司匹林组.

全酶切(图1). 经阿司匹林处理后C2菌株转变为克拉霉素敏感菌株C2a, 其PCR产物仍可被Bsa I 限制性内切酶酶切成两个片段, 提示阿司匹林不改变C2菌株在23SrRNA基因V功能区的第2143位A-G突变位点(图2).

2.3 阿司匹林对*H pylori*外膜通透性的影响 未加入CCCp及加入CCCp实验组中, 经阿司匹林处理的*H pylori*在各时间点上与DMSO溶媒对照组相比放射性较高, 说明在阿司匹林作用下, 进入*H pylori*胞体内的[7-³H]tetracycline增多, 提示阿司匹林增加*H pylori*外膜对抗生素的通透性

(图3). 阿司匹林组与DSMO对照组在加入外流泵抑制剂CCCp后, *H pylori*胞体内放射性均下降, 说明药物在细菌胞内聚集减少(图4), 提示CCCp破坏细菌膜两侧的pH梯度, 使得细菌内的药物浓度下降.

2.4 阿司匹林对*H pylori* 26695外膜蛋白的影响 阿司匹林处理后的*H pylori* 26695外膜蛋白经100 g/L SDS-PAGE得到多条电泳条带, 与对照组相比基本相同, 但在分子质量55-72 kDa之间有两蛋白条带1、2, 阿司匹林处理后表达改变, 其中条带1似有增加, 条带2似有减少(图5).

应用要点

通过对阿司匹林提高*H pylori*抗生素敏感性的相关分子机制的研究,将有助于更进一步认识*H pylori*的耐药机制,并为临床上探寻更加有效的根除*H pylori*方案打下基础。

表 1 实时定量PCR检测的*H pylori*外膜孔蛋白和外流泵蛋白基因cDNA相对含量

基因	阿司匹林组	DMSO对照组	空白对照组
<i>hopA</i>	963.60 ± 23.33	1087.75 ± 26.42	856.27 ± 25.43
<i>hopB</i>	84.00 ± 15.97	91.45 ± 14.83	100.15 ± 16.28
<i>hopC</i>	52.98 ± 11.67	51.77 ± 12.01	52.79 ± 10.27
<i>hopD</i>	83.86 ± 14.09	92.46 ± 17.78	89.92 ± 13.72
<i>hopE</i>	54.07 ± 10.58	52.77 ± 11.93	52.12 ± 9.92
<i>hefA</i>	12.31 ± 2.12	12.51 ± 1.99	12.97 ± 2.76
<i>hefB</i>	25.47 ± 4.73	28.48 ± 5.07	25.60 ± 4.99
<i>hefC</i>	55.62 ± 8.89	52.08 ± 9.78	53.37 ± 10.04

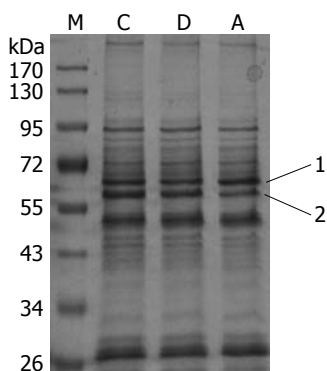


图 5 阿司匹林处理前后*H pylori*外膜蛋白SDS-PAEG电泳条带. M: 分子质量Marker; C: 空白对照组; D: DMSO对照组; A: 阿司匹林组. 1-2: 分子质量在55-72 kDa两蛋白条带.

2.5 阿司匹林对*H pylori*外膜孔蛋白及外流泵蛋白基因的影响 阿司匹林处理后, *H pylori*孔蛋白基因*hopA*、*hopB*、*hopC*、*hopD*、*hopE*及外流泵蛋白基因*hefA*、*hefB*、*hefC*的cDNA相对含量与DSMO对照组及空白对照组相比均无明显差别($P>0.05$, 表1), 提示阿司匹林不改变*H pylori*上述孔蛋白及外流泵蛋白基因的mRNA含量。

3 讨论

*H pylori*感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡的主要致病因素,与胃癌、胃黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤的发生密切相关. 1994年世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)将其列为人类I类致癌原. 近年研究表明, *H pylori*感染在心脑血管性疾病、免疫性疾病、营养代谢性疾病和皮肤病等疾病的发病中起一定的作用^[6]. 根除*H pylori*对治疗和预防上述疾病是十分重要的. 但随着抗生素在临床上的广泛应用, *H pylori*的耐药问题已经显得越来越突出, 临床研究表明, *H pylori*对克拉霉素耐药是导致根除治疗失败的主要原因^[7-9].

早期研究表明, 水杨酸盐可以抑制大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、铜绿假单胞菌及表皮葡萄球菌的生长, 并影响细菌的菌毛、鞭毛、

生物被膜等毒力因子的活性, 从而可能改变细菌的致病性^[10-17]. 水杨酸盐制剂对不同细菌对不同抗生素敏感性的影响却显示不同: 水杨酸盐可以诱导大肠杆菌、鼠伤寒沙门杆菌、金黄色葡萄球菌产生对多种抗生素的多重耐药, 但却可以提高这些细菌对氨基糖甙类抗生素的敏感性^[18-25]. 我们近期研究也显示, 在体外培养条件下, 阿司匹林不仅抑制*H pylori*的生长, 而且可以降低*H pylori*对甲硝唑, 阿莫西林和克拉霉素的体外MIC, 从而提高*H pylori*对这三种抗生素的敏感性, 甚至使耐药菌株转变为敏感菌株^[2-4]. 本研究在此基础上, 进一步探讨阿司匹林提高*H pylori*根除一线方案的关键抗生素克拉霉素敏感性的机制。

通常情况下, 细菌是通过以下途径产生对抗生素耐药: (1)产生抗生素的灭活酶; (2)减低膜对抗生素的通透性; (3)增加抗生素外流; (4)改变细菌药物作用的靶位结构. 克拉霉素、甲硝唑和阿莫西林分属于不同类型的抗生素, 分别作用于细菌的不同位点而发挥抗菌作用, *H pylori*对这些抗生素耐药性的产生也是通过各自不同的作用机制实现的. 我们推测阿司匹林使这些具有不同作用机制的抗生素对*H pylori*的敏感性提高, 并不是通过分别作用于细菌体内不同的靶位点, 而是通过某种机制提高菌体内抗生素的浓度, 增加抗生素对*H pylori*菌靶位点的作用, 使得*H pylori*对相应抗生素的敏感性提高. 本研究使用^[7-³H]tetracycline以同位素闪烁技术测定了阿司匹林对*H pylori*菌体内抗生素浓度的影响, 结果显示阿司匹林增加^[7-³H]tetracycline进入细菌胞体内, 证实了阿司匹林增加*H pylori*外膜对抗生素的通透性的推测。

*H pylori*对克拉霉素耐药是由于细菌23SrRNA发生点突变, 使得*H pylori*核糖体结构发生改变, 减少药物与细菌的结合造成的。

Taylor *et al*将这两个与克拉霉素耐药有关的位置定为A2142和A2143^[26], 现有较多学者将这两个位点称为A2143和A2144. 本研究应用*Bsa* I 限制性内切酶进行PCR-RFLP分析显示, 阿司匹林使*H pylori*由克拉霉素耐药菌株转变为敏感菌株并未导致23S*rRNA* A2143G突变位点发生改变.

细菌胞体内抗生素浓度的增加可能有两方面的原因, 一是药物被动进入细菌的量增加, 二是细菌主动泵出药物减少. 早期在大肠杆菌对多种抗生素耐药机制的研究显示, 水杨酸盐可作用于大肠杆菌多抗生素耐药基因(*mar*), 改变细菌膜蛋白的表达, 减低膜对抗生素的通透性, 增加抗生素的外流, 从而增加大肠杆菌对多种抗生素的耐药性^[27-29]. 就*H pylori*而言, 大多数抗生素进入细菌胞体内的通道是Porin蛋白所形成的亲水性孔道, 现已发现了至少五种微孔蛋白命名为*HopA*至*HopE*^[30-31], 并认为可能与细菌的耐药性有关^[30]. 此外, *H pylori*有三种RND(resistance-nodulation-division)家族外流系统可能与抗生素耐药有关, 即*HefABC*, *HefDEF*, *HefGHI*^[32], 而在体外培养的条件下, 与多重抗生素耐药相关的外流泵系统只有*HefABC*^[33]. 然而本研究以实时定量PCR技术对*H pylori*编码的Porin蛋白基因*hopA*、*hopB*、*hopC*、*hopD*、*hopE*及编码外流泵蛋白基因*hefA*、*hefB*、*hefC*的检测, 未发现阿司匹林从基因转录水平改变*H pylori*上述8种外膜蛋白的表达. 然而, 细菌外膜对药物通透性的改变必然伴随着外膜相关蛋白的改变, *H pylori*外膜蛋白的SDS-PAGE分析发现, 经阿司匹从处理后的细菌外膜蛋白电泳条带与对照组比较, 在分子质量55-72 kDa之间有两条蛋白条带表达改变. 因此, 阿司匹林对*H pylori*外膜蛋白从功能到表型上的改变作用是源于蛋白质翻译水平、还是翻译后蛋白质的修饰过程, 抑或影响其他Porin蛋白及外流泵系统的表达尚有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Christopher TD, Lee IR, Gustafson JE. The effects of salicylate on bacteria. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 1029-1043
- 2 Wang WH, Hu FL, Benjamin CY, Wong WM, Berg DE, Lam SK. Inhibitory effects of aspirin and indometacin on the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Chinese J Dig Dis* 2002; 3: 172-177
- 3 Wang WH, Wong WM, Dailidiene D, Berg DE, Gu Q, Lai KC, Lam SK, Wong BC. Aspirin inhibits the growth of *Helicobacter pylori* and enhances its susceptibility to antimicrobial agents. *Gut* 2003; 52: 490-495
- 4 Gu Q, Xia HH, Wang WH, Wang JD, Wong WM,

- Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Cheung HK, Liu XG, Wong BC. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors on *Helicobacter pylori* susceptibility to metronidazole and clarithromycin. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 675-681
- 5 马惠霞, 王蔚虹, 胡伏莲, 李江. 阿司匹林和塞来昔布对幽门螺杆菌的体外影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2747-2752
- 6 刘文志. 幽门螺杆菌研究进展. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2001: 309
- 7 Mégraud F. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Br Med Bull* 1998; 54: 207-216
- 8 Realdi G, Dore MP, Piana A, Atzei A, Carta M, Cugia L, Manca A, Are BM, Massarelli G, Mura I, Maida A, Graham DY. Pretreatment antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection: results of three randomized controlled studies. *Helicobacter* 1999; 4: 106-112
- 9 Pilotto A, Leandro G, Franceschi M, Rasso M, Bozzola L, Furlan F, Di Mario F, Valerio G. The effect of antibiotic resistance on the outcome of three 1-week triple therapies against *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 667-673
- 10 Kunin CM, Hua TH, Guerrant RL, Bakaletz LO. Effect of salicylate, bismuth, osmolytes, and tetracycline resistance on expression of fimbriae by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1994; 62: 2178-2186
- 11 Farber BF, Wolff AG. The use of salicylic acid to prevent the adherence of *Escherichia coli* to silastic catheters. *J Urol* 1993; 149: 667-670
- 12 Kunin CM, Hua TH, Bakaletz LO. Effect of salicylate on expression of flagella by *Escherichia coli* and *Proteus*, *Providencia*, and *Pseudomonas* spp. *Infect Immun* 1995; 63: 1796-1799
- 13 Farber BF, Hsieh HC, Donnenfeld ED, Perry HD, Epstein A, Wolff A. A novel antibiofilm technology for contact lens solutions. *Ophthalmology* 1995; 102: 831-836
- 14 Muller E, Al-Attar J, Wolff AG, Farber BF. Mechanism of salicylate-mediated inhibition of biofilm in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1998; 177: 501-503
- 15 Teichberg S, Farber BF, Wolff AG, Roberts B. Salicylic acid decreases extracellular biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*: electron microscopic analysis. *J Infect Dis* 1993; 167: 1501-1503
- 16 Domenico P, Schwartz S, Cunha BA. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun* 1989; 57: 3778-3782
- 17 Salo RJ, Domenico P, Tomás JM, Straus DC, Merino S, Benedí VJ, Cunha BA. Salicylate-enhanced exposure of *Klebsiella pneumoniae* subcapsular components. *Infection* 1995; 23: 371-377
- 18 Rosner JL. Nonheritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by salicylates and other chemotactic repellents in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8771-8774
- 19 Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1318-1325
- 20 Sulavik MC, Dazer M, Miller PF. The *Salmonella typhimurium mar* locus: molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. *J*

■名词解释

间苯胺氯羧酸 (CCCP): 一种外排泵抑制剂, 能破坏细菌跨细胞膜的质子梯度, 导致转运蛋白失去能量供应, 使药物在细菌体内的蓄积浓度增加, 从而抑制药物外排. 在敏感菌中加入CCCP后药物积聚降低, 其原因主要是由于药物在细菌胞内的积聚为被动积聚, 最终分布由质膜两侧的pH梯度(Δ pH)所决定, 由于CCCP可以破坏这种pH梯度, 因此加入CCCP后敏感菌胞内药物浓度降低. CCCP在耐药菌中同样存在这种作用, 只是他抑制主动外排机制使胞内药物增加的作用远远大于降低作用.

■同行评价

本研究选题准确,思路清晰,实验方法合理,结论可靠,具有明显的学术及临床指导意义。

- Bacteriol* 1997; 179: 1857-1866
- 21 Domenico P, Hopkins T, Cunha BA. The effect of sodium salicylate on antibiotic susceptibility and synergy in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 343-351
- 22 Gustafson JE, Candelaria PV, Fisher SA, Goodridge JP, Lichocik TM, McWilliams TM, Price CT, O'Brien FG, Grubb WB. Growth in the presence of salicylate increases fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 990-992
- 23 Price CT, O'Brien FG, Shelton BP, Warmington JR, Grubb WB, Gustafson JE. Effects of salicylate and related compounds on fusidic acid MICs in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 57-64
- 24 Domenico P, Straus DC, Woods DE, Cunha BA. Salicylate potentiates amikacin therapy in rodent models of *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Infect Dis* 1993; 168: 766-769
- 25 Aumercier M, Murray DM, Rosner JL. Potentiation of susceptibility to aminoglycosides by salicylate in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 786-791
- 26 Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2621-2628
- 27 Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1995; 16: 45-55
- 28 Fralick JA. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996; 178: 5803-5805
- 29 Rosner JL, Chai TJ, Foulds J. Regulation of ompF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1991; 173: 5631-5638
- 30 Doig P, Exner MM, Hancock RE, Trust TJ. Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1995; 177: 5447-5452
- 31 Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995; 63: 1567-1572
- 32 Bina JE, Nano F, Hancock RE. Utilization of alkaline phosphatase fusions to identify secreted proteins, including potential efflux proteins and virulence factors from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 148: 63-68
- 33 Bina JE, Alm RA, Uria-Nickelsen M, Thomas SR, Trust TJ, Hancock RE. *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 248-254

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。(常务副总编辑:张海宁 2008-06-28)