

环丙沙星诱导对临床耐药菌株主动外排基因转录的影响

刘建华, 付赛赛, 王亚云, 胡功政, 潘玉善, 苑丽*

(河南农业大学 牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要: 笔者拟研究环丙沙星诱导对大肠埃希菌临床耐药菌株 Y35、J45 主动外排基因 *acrA*、*acrB*、*acrD*、*acrE*、*acrF*、*mdtA* 及外排调控基因 *marA*、*robA* 和 *soxS* mRNA 水平的影响。采用微量肉汤稀释法, 测定环丙沙星对 Y35、J45 不同诱导阶段 MIC; 采用荧光定量 PCR 检测方法, 对 Y35、J45 及二者诱导至 10、20、30 代菌株的主动外排及外排调控基因 mRNA 相对转录量进行测定。结果显示: 经过 30 代诱导, 环丙沙星对诱导株 MIC 均增至原来的 2 倍, 达到 $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Y35 耐药株诱导至 10 和 30 代时, 除了 *mdtA* 基因外, 其他 8 个基因转录量介于 1.20~96.07, 与未诱导株相比差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *acrD* 基因转录量增加最为明显; 至 20 代时, *acrA*、*acrB*、*marA* 与 10 代诱导株相比, 转录量下降, 但高于原代菌株转录量; *acrE*、*robA* 和 *soxS* 基因转录量数值介于 1.40~3.81, 与未诱导株相比差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。J45 耐药株至 10 代时, *acrB*、*acrF* 基因转录量增加, 转录量分别为原代菌株 2.76 和 1.73 倍, 其他测定基因转录量下降; 至 20 代时, *acrA*、*acrB*、*acrE*、*mdtA* 基因转录量增加显著, 分别为原代菌株的 15.35、58.89、31.56、36.50 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$); 至 30 代时, 所有检测基因的转录量均大于原代菌株, *acrF* 基因转录量增加最为明显, 是原代菌株的 102.54 倍。本研究表明, 长期使用环丙沙星诱导, 能够使临床耐药株对其 MIC 值增加, 耐药性增强; 环丙沙星诱导能促使临床耐药菌株主动外排基因 mRNA 转录量增加, 更强的耐药性可能是由主动外排泵介导产生。

关键词: 大肠埃希菌; 最小抑菌浓度; 环丙沙星; 主动外排泵; 荧光定量 PCR

中图分类号: S859.7

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)09-1753-08

Transcription Changes of Active Efflux System in Clinical Multidrug-resistant *E. coli* Strains Induced by Ciprofloxacin Selective Pressure

LIU Jian-hua, FU Sai-sai, WANG Ya-yun, HU Gong-zheng, PAN Yu-shan, YUAN Li*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: This study was conducted to explore the effect of ciprofloxacin on the transcription of several active efflux system related genes, *acrA*, *acrB*, *acrD*, *acrE*, *acrF*, *mdtA*, *marA*, *robA* and *soxS*, in clinical *E. coli* strains Y35 and J45. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of ciprofloxacin to *E. coli* strains Y35 and J45 induced by ciprofloxacin were determined using the standard broth microdilution method. A real-time fluorescent quantitative PCR assay was established to observe the difference of active efflux pumps genes transcription level between parental strains and the 10th, 20th, 30th generation of ciprofloxacin induced strains. Results were as follows: The results showed that, the 30th generation of ciprofloxacin induced strains exhibited increased MICs of ciprofloxacin (2-fold), which was $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. For Y35, 8 of 9 genes tran-

收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 国家自然科学基金(U1304328); 河南省科技厅资助项目(132300410113)

作者简介: 刘建华(1977-), 女, 河南浚县人, 副教授, 博士, 主要从事动物源耐药菌耐药机制研究, E-mail: ljhdmy@126.com

* 通信作者: 苑丽, 副教授, E-mail: yuanli-hn@163.com

scription level of the 10th and 30th of ciprofloxacin induced strains were increased compared with the parental strain, except gene *mdtA*, and the values of relative transcription level were between 1.20 and 96.07 (the differences were statistically significant, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). The transcription level of *acrD* gene increased most markedly. The expression level of *acrA*, *acrB* and *marA* in the 20th generation of ciprofloxacin induced strains were decreased compared with the 10th generation strain, however, these genes showed increased transcription level compared with the parental strain. The relative transcription level of *acrE*, *robA* and *soxS* were between 1.40 and 3.81 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). For J45, only *acrB* and *acrF* gene transcription level were increased in the 10th generation of ciprofloxacin induced strain, the relative value of transcription level were 2.76 and 1.73, however, the transcription level of other genes were decreased. *acrA*, *acrB*, *acrE* and *mdtA* gene transcription level were increased in the 20th generation of ciprofloxacin induced strain, the value of relative transcription level were 15.35, 58.89, 31.56 36.50, respectively ($P < 0.01$). All the genes transcription were increased to a high level in the 30th generation of ciprofloxacin induced strain, the transcription level of *acrF* gene increased most markedly, it was 102.54 times of the parental strain. The results of this study suggest that continuous induction of the clinical resistance *E. coli* strains by subinhibitory concentration of ciprofloxacin might result in stronger resistance to ciprofloxacin, and increased level of transcription of active efflux pump genes. The increased transcription level of efflux pump genes might contribute to the stronger resistance of the induced strains to ciprofloxacin.

Key words: *E. coli*; MIC; ciprofloxacin; active efflux pump; fluorescent quantitative PCR

随着氟喹诺酮类药物 (fluoroquinolones, FQs) 在兽医临床应用的增多, 大肠埃希菌对 FQs 抗菌药的耐药率也呈逐渐上升的趋势^[1]。目前研究认为, 细菌耐 FQs 的主要机制是 DNA 拓扑异构酶的改变、细菌膜通透性的改变和药物外排泵的外排等^[2]。药物外排泵是一类位于细胞膜上的具有特殊结构的膜转运蛋白, 其作用机制是当细胞内的药物浓度蓄积达到一定数量时, 药物外排泵系统相关基因的 mRNA 的增加, 结果使细胞膜上外排泵的数量增加, 导致细胞内的药物被大量泵出, 进而引起细菌耐药, 外排泵种类较多, 作用底物广泛^[3-8]。在革兰阴性菌中, 过量表达的 RND 家族外排泵是细菌抗生素耐药性形成的重要原因之一^[9]。另有研究表明, 亚抑菌浓度的药物对多种细菌的主动外排泵表达具有诱导作用^[10-13], 使敏感菌转变为耐药菌株。笔者也使用亚抑菌浓度环丙沙星诱导大肠杆菌标准菌株, 发现其能诱导外排泵基因的表达^[14]。大肠埃希菌临床分离耐药菌株与大肠埃希菌标准质控菌株不同, 其本身对多种药物耐药。在临床治疗过程中, 由于药物吸收、分布和代谢过程中, 浓度发生变化, 肯定会有部分时间药物浓度低于最低抑菌浓度, 因此, 研究亚抑菌浓度抗菌药物对临床耐药细

菌的影响具有更重要的临床意义。本研究以临床分离 2 株耐药大肠埃希菌为研究对象, 使用 1/2 MIC 环丙沙星对耐药菌株进行诱导培养, 给这些耐药菌株造成抗生素生存压力, 分析亚抑菌浓度环丙沙星诱导后, RND 家族主动外排基因 *acrA*、*acrB*、*acrD*、*acrE*、*acrF*、*mdtA* 及其上游调控基因 *marA*、*robA* 和 *soxS* 基因 mRNA 表达量的变化, 以其为临床合理使用抗菌药物剂量, 防治细菌耐药提供新思路。

1 材料与方法

1.1 菌株

2 株菌株为本实验室分离保存大肠埃希菌耐药菌株, 环丙沙星对其 MIC 均为 $128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 菌株编号为 Y35、J45, 质控菌为大肠埃希菌 ATCC 25922, 购自中国科学院微生物研究所。

1.2 试剂与药品

SYBR Green real-time PCR premixture 为 TaKaRa 大连宝生物制品有限公司产品; AMV 反转录酶系统、RNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒均购自天根生化(北京)有限公司。

1.3 仪器

Roche 荧光定量 PCR 仪; Applied Biosystems 2720 Thermal Cycle 型 PCR 仪; 核酸定量检测仪为 Bio-Rad 公司产品; 电泳凝胶成像分析系统为 Alpha Innotect Corporation 出产。

1.4 环丙沙星对标准菌株及耐药菌株的诱导培养

无菌吸取 Y35、J45 耐药菌株菌液, 复活培养。将 Y35、J45 生长培养液中加入 1/2 MIC 的环丙沙星作为初始诱导浓度, 连续传代, 每隔 5 代测定环丙沙星对诱导菌株的 MIC, 若有改变, 调整环丙沙星的浓度值, 使其保持 1/2 MIC, 培养至 30 代。MIC 的测定使用标准菌株 ATCC25922 进行质控。选择原代菌株及诱导至第 10、20、30 代的菌株进行荧光定量 PCR 测定。

1.5 荧光定量 PCR 测定环丙沙星诱导耐药菌株主动外排基因 mRNA 转录水平

1.5.1 引物设计 根据 GenBank 中大肠埃希菌耐药基因 *acrA*、*acrB*、*acrD*、*acrE*、*acrF*、*mdtA*、*marA*、*robA*、*soxS* 和管家基因 *gapA* 基因序列, 参照文献 [14] 合成荧光定量扩增引物, 具体如表 1 所示。

1.5.2 RNA 的提取、电泳及纯度测定 利用 RNAsimple Tottle RNA Kit 提取大肠埃希菌总 RNA。具体步骤参见试剂盒说明书。提取的 RNA 用 DEPC 处理的灭菌三蒸水溶解, 吸取 3 μL 进行电泳, 同时核酸定量检测仪测定 RNA 吸收值, 根据 OD_{260 nm} 值计算 RNA 浓度, 以 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 的比值判断其纯度。

1.5.3 各外排基因和管家基因的 RT-PCR 扩增

按照 Tianscript RT kit cDNA 第一链合成试剂盒要求, 在冰上配制 RT 反应液, 反应体系如下: 10 \times RT-mixture 1 μL , dNTP 混合液 (2.5 mmol \cdot L⁻¹ each) 1 μL , Oligo-dT 1 μL , Quant Reverse Transcriptase 0.5 μL , RNA 模板 1 μL , RNase-free ddH₂O 5.5 μL , 总体系 10 μL 。具体操作方法参照反转录试剂盒说明书进行。以反转录的 cDNA 为模板, 使用各个基因引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL , 2 \times Taq mixture 12.5 μL , 上下游引物各 1 μL , ddH₂O 9.5 μL , 总体系 25 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、(各个基因的退火温度不同, 反应时间均为 15 s)、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。反应结束后, 取 5 μL PCR 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳。

表 1 主动外排基因荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The PCR primers for fluorescence quantitative PCR of active efflux pump gene detection

基因 Genes	引物序列 (5'-3') The primer sequences	长度/bp Product size
<i>acrA</i>	GAAGGTAGCGACATCGAAGCA	90
	CAGATCACCTTTCGCACTG	
<i>acrB</i>	GAAGCGATCATCCTCGTGTTCC	106
	CAAAGGTCCCAGCAATACC	
<i>acrD</i>	TGTGTCTGGCTGCGTTGTAT	158
	GCCGATAAACCAATGACCGT	
<i>acrE</i>	AAAGGCGAACTGGCGAAAAG	100
	CTCCTGCTGGCTGATGTATT	
<i>acrF</i>	TGATGGTGGCGGGCTTTGTC	110
	TCACCGACGCCATTTCAGACG	
<i>mdtA</i>	AGGTATTTCTGCGGGCGATC	88
	GGCTTCCACCACTTCCACTT	
<i>marA</i>	TGAAGGAAAGTAACGAGCCG	113
	CGGTATTTATGCGGCGGAAC	
<i>robA</i>	GAGAAAATCGTGCCAGAACT	102
	AAGATACGCCGCTGATTGGT	
<i>soxS</i>	ATCAAAAATCGGACGCTCGG	70
	GATTACATTGCCAACGCCG	
<i>gapA</i>	GAAATGGGACGAAGTTGGTG	104
	AACCACTTTCTTCGCACCAG	

1.5.4 PCR 产物的纯化与回收 参照 TIANgel Midi Purification Kit 试剂盒使用说明书, 回收纯化 PCR 产物, 具体步骤参见胶回收试剂盒说明书。

1.5.5 标准曲线绘制 将各检测基因胶回收 PCR 产物稀释成 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 共 7 个梯度, 作为模板进行扩增, 反应体系为 20 μL : 2 \times SYBR RT PCR 预混液 10 μL , 上下游引物分别为 0.4 μL , 不同浓度稀释的模板 2 μL , 超纯水补足体积。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、62 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环, 反应结束后分析熔解曲线, 每个浓度重复 3 次, 绘制各个目的基因和内参基因标准曲线。

1.5.6 环丙沙星诱导不同代数耐药菌株主动外排基因的 mRNA 水平检测 利用上面建立的荧光

定量 RT-PCR 方法,对环丙沙星诱导不同代数的 Y35、J45 诱导株的外排相关结构基因和调控基因以及管家基因 *gapA* 的 mRNA 水平进行测定。PCR 仪上读取各个样品的 C_t 值,并由熔解曲线判定 PCR 反应的特异性。

1.6 统计分析

根据 C_t 值和标准曲线计算定量结果,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各个主动外排基因在不同诱导代数的相对转录水平, $\Delta C_{t_{目的基因}} = C_{t_{目的基因}} - C_{t_{持家基因}}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{不同诱导代数}} - \Delta C_{t_{未诱导菌株}}$,各基因的 mRNA 相对转录量以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

表 2 环丙沙星对 Y35、J45 菌株及其诱导株的 MIC

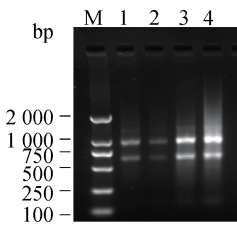
Table 2 Ciprofloxacin resistant strains isolated from clinical and induced strains

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

菌株 Strain	各代次 MIC MIC of each generation strain						
	0代	5代	10代	15代	20代	25代	30代
Y35	128	128	256	256	256	256	256
J45	128	128	128	256	256	256	256

2.2 RNA 提取

对提取的细菌总 RNA 进行测定, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0,电泳结果显示 RNA 分子完整。图 1 为 Y35 菌株诱导不同阶段提取 RNA 后的电泳图,泳道 1、2、3、4 分别代表未诱导、诱导至 5 代、诱导至 25 和 30 代时的 RNA 电泳结果。



1. Y35₀ 菌株; 2. Y35₅ 菌株; 3. Y35₂₅ 菌株; 4. Y35₃₀ 菌株; M. Marker 2000 DNA 相对分子质量标准

1. Strain Y35₀; 2. Strain Y35₅; 3. Strain Y35₂₅; 4. Strain Y35₃₀; M. Marker 2000

图 1 代表性菌株 RNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the partial RNA of *E. coli*

2.3 各个主动外排基因的标准曲线

所有基因融解曲线只有一个峰,没有引物二聚体,说明引物设计合理,结果准确,符合要求。从扩增曲线来看,相同稀释度的标准品几乎重合,重复性能够达到试验要求,相关系数、扩增效率和回归方程见表 3。

2 结果

2.1 诱导菌株 MIC 测定

环丙沙星对 Y35、J45 菌株及诱导株 MIC 见表 2。结果显示, Y35 第 10 代环丙沙星诱导株的 MIC 发生了改变,而 J45 第 15 代环丙沙星诱导株发生改变,环丙沙星对二者 MIC 均变为 0 代菌株的 2 倍。经过 30 代的诱导,环丙沙星对二者 30 代诱导株的 MIC 均为 $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别与 10 代和 15 代数数值相同。

2.4 环丙沙星诱导不同阶段耐药菌株 mRNA 转录水平分析

采用建立的荧光定量方法,测定了 Y35、J45 菌株不同诱导阶段的各个基因 mRNA 转录量,持家基因 *gapA* 为内参基因。未诱导菌株的转录量作为“1”,不同诱导阶段菌株均与未诱导菌株进行比较,得到每个诱导菌株各基因的相对转录量,结果见表 4 和图 2、3。结果显示,对 Y35 耐药株来说,诱导至第 10 代时,除了 *mdtA* 基因转录量降低外,其他 8 种基因转录量与原代菌株相比,均有一定程度的提高,*acrD* 基因转录量提高至诱导前的 50.21 倍,增加最为明显,其他 7 个基因的转录量介于 1.26~5.10,转录量差异均达到显著水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);至 20 代时,*acrA*、*acrB*、*marA* 3 个基因与未诱导前相比,转录量增加,但与对应 10 代的菌株相比转录量下降;*acrE*、*robA* 和 *soxS* 3 个基因转录量与诱导前和诱导至 10 代时相比转录量均增加,数值介于 1.40~3.81,差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 *acrD*、*acrF* 和 *mdtA* 转录量均小于 1,且 *acrD* 与 10 代菌株的转录量相比,显著下降 ($P < 0.05$);至 30 代时,除了 *mdtA* 基因转录量小于 1 以外,其他基因表达量介于 1.20~96.07, *acrD* 基因转录量增加最为明显,为原代菌株的 96.07 倍。

而对于 J45 耐药株,至 10 代时,只有 *acrB*、*acrF*

表 3 主动外排基因相关系数、扩增效率及回归方程

Table 3 The correlation, efficiency and linear regression equations of active efflux pump genes

基因 Genes	相关系数 R^2	扩增效率 Efficiency	回归方程 Linear regression equations
<i>acrA</i>	1.00	2.02	$Ct = -3.2664 \log \text{ 样本拷贝数} + 31.20$
<i>acrB</i>	1.00	1.90	$Ct = -3.5995 \log \text{ 样本拷贝数} + 22.44$
<i>acrD</i>	1.00	2.16	$Ct = -2.9904 \log \text{ 样本拷贝数} + 30.92$
<i>acrE</i>	1.00	1.96	$Ct = -3.415 \log \text{ 样本拷贝数} + 30.84$
<i>acrF</i>	0.99	2.11	$Ct = -3.083 \log \text{ 样本拷贝数} + 32.61$
<i>mdtA</i>	1.00	2.03	$Ct = -3.2602 \log \text{ 样本拷贝数} + 31.52$
<i>marA</i>	1.00	2.09	$Ct = -3.1320 \log \text{ 样本拷贝数} + 30.18$
<i>robA</i>	1.00	2.09	$Ct = -3.1316 \log \text{ 样本拷贝数} + 29.46$
<i>soxS</i>	0.99	2.07	$Ct = -3.1632 \log \text{ 样本拷贝数} + 31.46$
<i>gapA</i>	1.00	2.01	$Ct = -3.2964 \log \text{ 样本拷贝数} + 28.95$

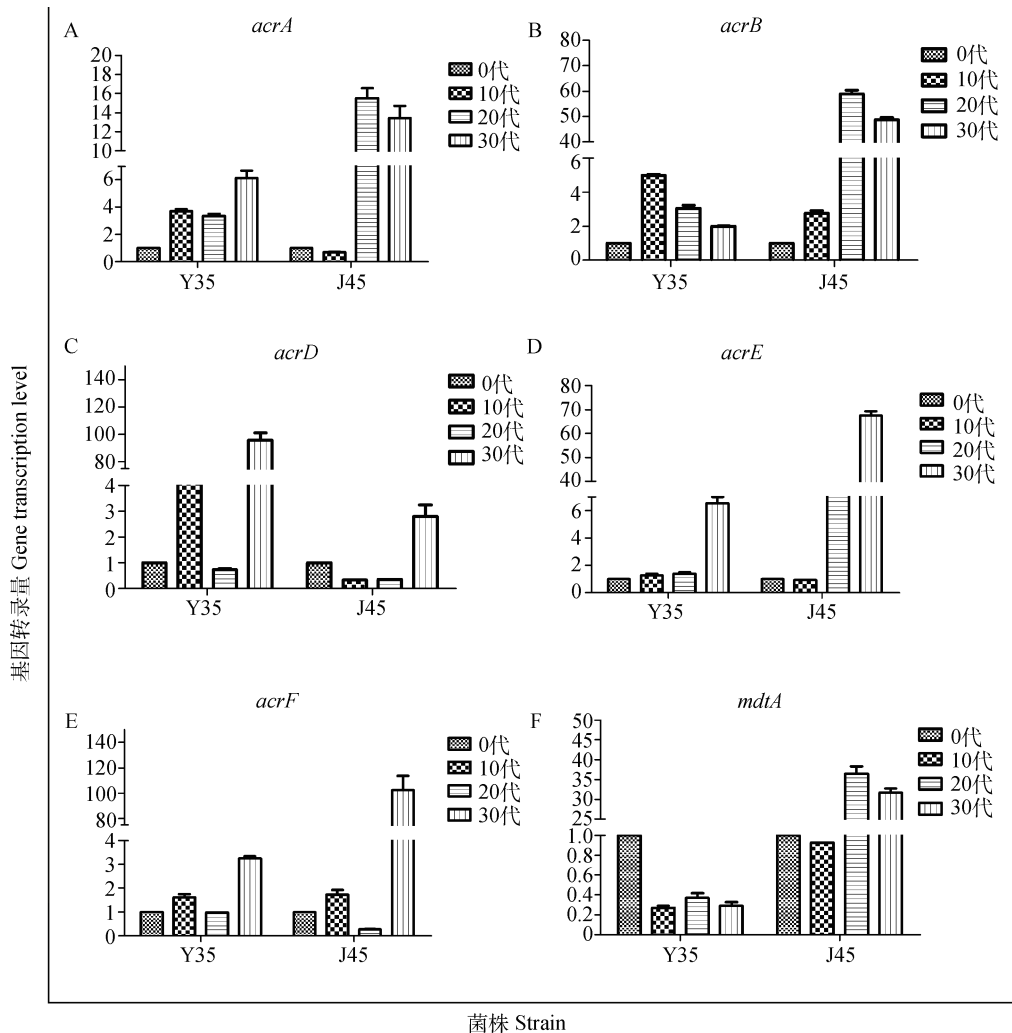
A. *acrA* 基因; B. *acrB* 基因; C. *acrD* 基因; D. *acrE* 基因; E. *acrF* 基因; F. *mdtA* 基因A. *acrA* gene; B. *acrB* gene; C. *acrD* gene; D. *acrE* gene; E. *acrF* gene; F. *mdtA* gene图 2 环丙沙星不同诱导阶段 *acrA*、*acrB*、*acrD*、*acrE*、*acrF* 和 *mdtA* 外排基因转录量Fig. 2 The mRNA relative transcription of *acrA*, *acrB*, *acrD*, *acrE*, *acrF* and *mdtA* in ciprofloxacin induced *E. coli*

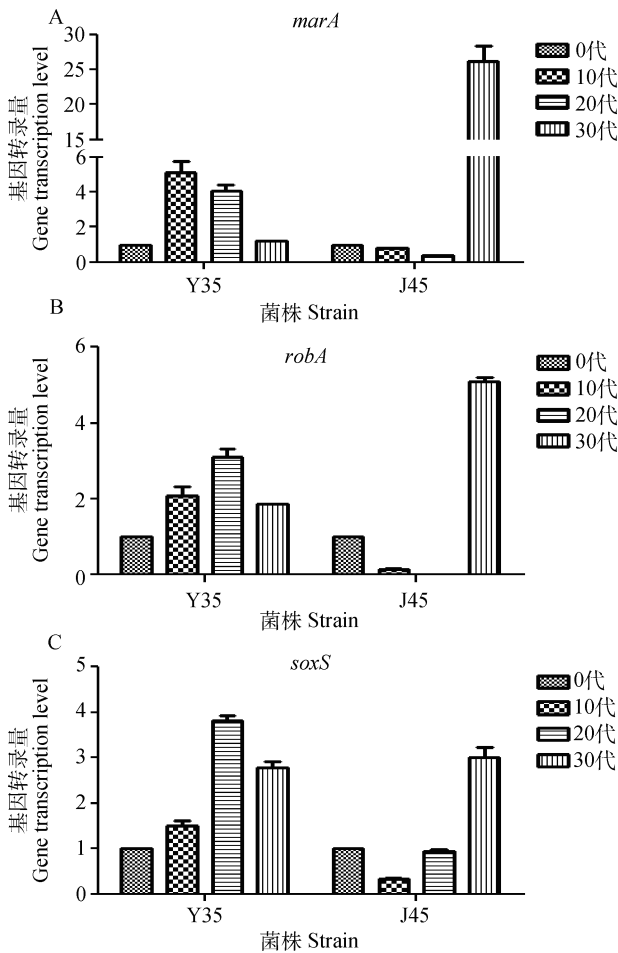
表 4 Y35、J45 菌株及其诱导株主动外排及其调控基因 mRNA 相对量

Table 4 The mRNA relative transcription of active efflux pump and regulate gene in Y35, J45 and their ciprofloxacin induced *E. coli* strains

菌株 Strains	Y35			J45		
	10	20	30	10	20	30
<i>acrA</i>	3.71±0.14**	3.37±0.13**	6.12±0.56**	0.69±0.04*	15.35±1.04**	13.45±1.24**
<i>acrB</i>	5.01±0.07**	3.03±0.21**	2.01±0.01**	2.76±0.15**	58.89±1.45**	48.67±0.78**
<i>acrD</i>	50.21±1.78**	0.73±0.03*	96.07±5.02**	0.32±0.01**	0.34±0.00**	2.80±0.45**
<i>acrE</i>	1.26±0.14*	1.40±0.08*	6.54±0.45**	0.90±0.00	31.56±1.64**	67.65±1.64**
<i>acrF</i>	1.61±0.13*	0.96±0.00	3.23±0.11**	1.73±0.19**	0.27±0.01**	102.54±11.43**
<i>mdtA</i>	0.27±0.02**	0.37±0.05*	0.29±0.04**	0.93±0.00	36.50±1.90**	31.67±1.10**
<i>marA</i>	5.10±0.66**	4.06±0.37**	1.20±0.01*	0.77±0.05*	0.38±0.01*	26.26±2.12**
<i>robA</i>	2.08±0.26**	3.10±0.23**	1.87±0.00**	0.15±0.00**	0.03±0.00**	5.10±0.12**
<i>soxS</i>	1.51±0.11*	3.81±0.11**	2.78±0.14**	0.33±0.03**	0.94±0.04	3.00±0.23**

*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$. 原代菌株转录量为 1

*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$. The transcription level of primary strain was 1



A. *marA* 基因; B. *robA* 基因; C. *soxS* 基因
A. *marA* gene; B. *robA* gene; C. *soxS* gene

图 3 环丙沙星不同诱导阶段 *marA*、*robA* 和 *soxS* 外排基因转录量

Fig. 3 The mRNA relative transcription of *marA*, *robA* and *soxS* in ciprofloxacin-induced *E. coli*

基因转录量增加,转录量分别为 2.76 和 1.73 倍,其他 4 种外排基因和 3 种调控基因转录量不仅没有提高,反而有一定程度的下降,转录量的值介于 0.15~0.93;至 20 代时,*acrA*、*acrB*、*acrE*、*mdtA* 基因转录量增加极显著($P < 0.01$),分别为原代菌株的 15.35、58.89、31.56、36.50 倍;至 30 代时,所有测定基因的转录量均大于 1,*acrF* 基因转录量增加最为明显,为原代菌株的 102.54 倍。

3 讨论

普遍的观点认为,与抗菌药物长期接触,是病原菌产生耐药性的关键所在^[15]。抗菌药物给细菌的生存环境造成了选择性压力,这种环境压力因素可以通过多种机制导致病原菌对抗菌药物产生更强耐药性^[16]。药物外排泵是一类位于细胞膜上的具有特殊结构的膜转运蛋白,当细胞内的药物浓度聚集达到一定数值时,药物外排泵系统相关 mRNA 的表达增加,结果使细胞膜上外排泵的数量增加,使细胞内的药物被泵出^[17]。本研究依据细菌耐药性的原因及机制,人为造成环丙沙星的选择性压力环境,对 2 株临床耐药菌株进行体外选择性诱导培养,测定诱导过程中, MIC 及主动外排基因 mRNA 相对表达量的变化。结果发现,在这样的生长条件下,菌株的耐药性更强,环丙沙星对其 MIC 值也相应增加。Y35 耐药株培养至 10 代, J45 菌株培养至 15 代时,其 MIC 由 128 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 升至 256 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对诱导出的耐药菌株在无抗菌药物 MH 肉汤中连续

传代培养 5 d, MIC 无明显改变,说明临床耐药株经过长期不断地接受抗菌药物的压力,可诱导菌株获得稳定的高强度耐药性。陈妍等^[18]使用环丙沙星对 10 株大肠埃希菌进行诱导(包括 6 株敏感株, MIC $\leq 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1 株中介耐药株, MIC = $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、和 3 株耐药株, MIC $> 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 结果 10 株菌株被诱导成高度耐药菌株(MIC $\geq 128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 诱导后 MIC 比诱导前增加 8~8 205 倍。在本研究中,环丙沙星对 2 株菌株的 MIC 仅增加了 1 倍,考虑主要是环丙沙星对选择菌株的 MIC 初始值较大的原因。

在不同的诱导阶段,两个耐药菌株外排相关基因 mRNA 表达水平变化不尽相同。至 30 代时,除了 Y35 菌株的 *mdtA* 基因以外,其余所有基因与原代菌株相比,都有所升高,但并不呈直线上升趋势。在起始诱导阶段,耐药菌株为适应与环丙沙星共生的环境,有些基因表达量不升反降,诱导株适应了该浓度的环丙沙星以后,其外排基因表达量会出现大幅增加。但若此时环丙沙星对其 MIC 增加,调整共培养的环丙沙星浓度,诱导株外排相关基因会再次表达下降,生长不良等现象。*acrA* 和 *acrB* 作为大肠埃希菌中最为主要的外排基因,其高表达可以造成细菌对抗菌药物耐药。但其表达受到 *mar* 操纵子的调控,柳巨雄等^[19]报道,大肠埃希菌多重耐药株的 *acrA* 和 *marA* 的 mRNA 表达水平与其耐药水平存在相关性。在鼠伤寒沙门菌,缺失 *acrB* 基因后,多西环素、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、恩诺沙星、氟苯尼考、头孢曲松和头孢噻唑的 MIC 值降低 2~128 倍^[20]。本研究发现,耐药菌株在诱导 30 代时,6 种主动外排基因中,除了 Y35 菌株 *mdtA* 基因表达量减少外,其他基因表达量都有较大程度的提高。3 种外排调控基因表达量与原代菌株相比,表达量也有一定程度的增加。J45 菌株中,*marA* 的表达量增加倍数显著高于 *soxS*、*robA* 的增加倍数,这与文献报道吻合。具体表达量的变化可能和菌株个体差异有关,Y35 耐药株为鸭源菌株,J45 耐药株为鸡源菌株,两株菌株原始用药背景不同,这可能是两株耐药株的诱导株个体差异的原因。另外,诱导耐药株耐药的机制是多方面的,可能还存在拓扑异构酶的改变、外膜通透性改变等其他耐药机制^[21]。

4 结 论

经过亚抑菌浓度环丙沙星长时间诱导,能够使

临床耐药大肠埃希菌对环丙沙星耐药性增强,并能使多种主动外排相关基因 mRNA 表达量增加,这为阐明环丙沙星诱导耐药性的产生机制、合理使用抗菌药物剂量提供参考。

参考文献 (References):

- [1] YAMASAKI E, YAMADA C, JIN X H, et al. Expression of *marA* is remarkably increased from the early stage of development of fluoroquinolone-resistance in uropathogenic *Escherichia coli* [J]. *J Infect Chemother*, 2015, 21(2): 105-109.
- [2] MOON D C, SEOL S Y, GURUNG M, et al. Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(1): 76-79.
- [3] HERNANDO-AMADO S, BLANCO P, ALCALDE-RICO M, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials [J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 28: 13-27.
- [4] NIKAIIDO E, YAMAGUCHI A, NISHINO K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(35): 24245-24253.
- [5] SATO T, YOKOTA S, UCHIDA I, et al. Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations [J]. *Front Microbiol*, 2013, 4: 125.
- [6] LAWLER A J, RICCI V, BUSBY S J W, et al. Genetic inactivation of *acrAB* or inhibition of efflux induces expression of *ramA* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(7): 1551-1557.
- [7] RUIZ C, LEVY S B. Regulation of *acrAB* expression by cellular metabolites in *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(2): 390-399.
- [8] MANJASETTY B A, HALAVATY A S, LUAN C H, et al. Loop-to-helix transition in the structure of multidrug regulator AcrR at the entrance of the drug-binding cavity [J]. *J Struct Biol*, 2016, 194(1): 18-28.
- [9] BLAIR J M, PIDDOCK L J. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(5): 512-519.
- [10] KANG H W, WOO G J. Increase of multidrug efflux

- pump expression in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* mutants induced by ciprofloxacin selective pressure[J]. *Res Vet Sci*, 2014, 97(2): 182-186.
- [11] KIM J Y, KIM S H, JEON S M, et al. Resistance to fluoroquinolones by the combination of target site mutations and enhanced expression of genes for efflux pumps in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated in Korea[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(8): 760-765.
- [12] FERRARI R G, GALIANA A, CREMADES R, et al. Expression of the *marA*, *soxS*, *acrB* and *ramA* genes related to the AcrAB/TolC efflux pump in *Salmonella enterica* strains with and without quinolone resistance-determining regions *gyrA* gene mutations [J]. *Braz J Infect Dis*, 2013, 17(2): 125-130.
- [13] 刘建华, 苑 丽, 潘玉善, 等. 3种抗菌药物诱导改变 *marA*, *soxS* 和 *robA* 基因 mRNA 表达水平[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(10): 1432-1437.
- LIU J H, YUAN L, PAN Y S, et al. The changes of *marA*, *soxS* and *robA* gene expression levels in three kinds of antimicrobial agents induced resistant mutants *in vitro*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(10): 1432-1437. (in Chinese)
- [14] 刘建华. 鸭源大肠杆菌主动外排基因及其调控基因的表达水平与多重耐药机制[D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
- LIU J H. The expression level of active efflux system related genes and mechanism of multidrug resistance in *E. coli* isolated from ducks [D]. Zhengzhou, Henan Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [15] 蔡 倩, 刘 蕾, 艾效曼. 我院 2007-2011 年抗菌药物使用量与细菌耐药性相关性分析[J]. 中国药房, 2012, 23(42): 3970-3974.
- CAI Q, LIU L, AI X M. Correlation analysis of consumption amount of antibacterial drug and drug resistance in our hospital from 2007 to 2011[J]. *China Pharmacy*, 2012, 23(42): 3970-3974. (in Chinese)
- [16] SHIGEMURA K, TANAKA K, YAMAMICHI F, et al. Does mutation in *gyrA* and/or *parC* or efflux pump expression play the main role in fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* urinary tract infections?: A statistical analysis study[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(6): 516-520.
- [17] BAY D C, STREMICK C A, SLIPSKI C J, et al. Secondary multidrug efflux pump mutants alter *Escherichia coli* biofilm growth in the presence of cationic antimicrobial compounds[J]. *Res Microbiol*, 2017, 168(3): 208-221.
- [18] 陈 妍, 罗 予, 毛理纳. 氟喹诺酮类药物体外诱导大肠埃希菌耐药性变化[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(6): 596-599.
- CHEN Y, LUO Y, MAO L N. Changes in the drug resistance of *E. coli* induced by fluoroquinolones *in vitro*[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2009, 22(6): 596-599. (in Chinese)
- [19] 柳巨雄, 吉淑娟, 杨 斌, 等. 不同耐药水平大肠杆菌 *acrA* 和 *marA* 基因转录水平的比较[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(3): 326-328, 332.
- LIU J X, JI S J, YANG B, et al. Comparison of *acrA* mRNA and *marA* mRNA levels in *Escherichia coli* with multidrug resistance [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26(3): 326-328, 332. (in Chinese)
- [20] 黄 慧, 刘保光, 孙亚伟, 等. 鼠伤寒沙门菌 *cpxR* 和 *acrB* 双基因缺失菌株的构建及其对抗菌药物敏感性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(3): 595-602.
- HUANG H, LIU B G, SUN Y W, et al. Construction of *cpxR* and *acrB* double gene deletion strain of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and analysis of its susceptibility to antibacterial agents[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(3): 595-602. (in Chinese)
- [21] REDGRAVE L S, SUTTON S B, WEBBER M A, et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success[J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(8): 438-445.

(编辑 白永平)