

志贺菌临床分离株AcrAB-TolC外排泵 mRNA转录水平与氟喹诺酮耐药的相关性

刘奉云 张豪杰 杨贤 吴晓妹 祁伟

【摘要】目的 探讨志贺菌临床分离菌株AcrAB-TolC外排泵的3个组成基因(*acrA*、*acrB*、*tolC*) mRNA转录水平与其氟喹诺酮耐药水平。**方法** 收集2009至2015年于天津医科大学总医院、天津医科大学第二医院和天津市儿童医院3家三甲医院就诊腹泻患者的非重复粪便样本,分离培养获得192株志贺菌临床分离菌株,采用K-B纸片法对所有菌株进行体外药敏试验;根据药敏试验结果,将志贺菌株分为氟喹诺酮耐药组和氟喹诺酮全敏感组;应用实时荧光定量PCR(RT-PCR)技术,检测上述两组志贺菌临床分离株AcrAB-TolC外排泵基因在mRNA转录水平的相对表达量,使用SPSS 17.0软件对结果进行统计学分析。**结果** 氟喹诺酮耐药组志贺菌株共计9株(对3种及3种以上氟喹诺酮耐药的菌株),依次编码为F2、N8、F44、157、187、368、1113、3171和3327,氟喹诺酮全敏感组志贺菌株共计9株,依次编码为F13、1、22、174、186、377、1506、3283和3326;耐药组外排泵*acrA*基因的mRNA转录水平高于全敏感组菌株,差异具有统计学意义($t = 2.97$ 、 $P = 0.02$);耐药组外排泵*acrB*和*tolC*基因的mRNA转录水平均值虽然高于全敏感组相应基因mRNA转录水平,但差异均无统计学意义($t = 2.84$ 、 $P = 0.30$, $t = 1.17$ 、 $P = 0.29$)。**结论** 受试菌株外排泵*acrA*基因mRNA转录水平增高与氟喹诺酮耐药存在一定的关联。

【关键词】 志贺菌; 耐药性; 氟喹诺酮; 外排泵; AcrAB-TolC

Relationship between the mRNA transcription levels of AcrAB-TolC efflux pump in *Shigella* from clinical source and fluoroquinolone resistance Liu Feng Yun, Zhang Haojie, Yang Xian, Wu Xiaomei, Qi Wei. Institute of Infectious Diseases, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Corresponding author: Qi Wei, Email: qiweiwyx@yahoo.com

【Abstract】Objective To investigate the relationship between the transcriptional levels of messenger RNA (mRNA) from component genes (*acrA*, *acrB*, *tolC*) of the efflux pump AcrAB-TolC of clinical isolates of *Shigella flexneri* and the level of fluoroquinolone resistance. **Methods** Total of 192 clinical *Shigella* isolates were collected from non-repetitive faeces of diarrhea patients during 2009 to 2015 from 3 grand three hospitals in Tianjin, which were The General Hospital of Tianjin Medical University, The Second Hospital of Tianjin Medical University and The Children's Hospital in Tianjin. Antibiotic susceptibility of the *Shigella* clinical isolates were detected by K-B disk diffusion. The strains were divided into the fluoroquinolone resistant group and full fluoroquinolone sensitive group, according to susceptibility to fluoroquinolone. The mRNA transcription of AcrAB-TolC efflux pump of the two groups of strains determined by real-time quantitative PCR (RT-PCR). And the SPSS 17.0 software was used for statistical analysis. **Results** There were 9 isolates in fluoroquinolone resistance group, which were resistant to three and above kinds of fluoroquinolone. And the number in the fluoroquinolone resistance group were F2, N8, F44, 157, 187, 368, 1113, 3171 and 3327. While there were 9 isolates in fluoroquinolone full-sensitive group. And the number were F13, 1, 22, 174, 186, 377, 1506, 3283 and 3326. The mRNA transcription level of *acrA* in the resistant group was higher than that of the full-sensitive group, with significant difference ($t =$

2.97, $P = 0.02$). Although the mRNA transcription levels of *acrB* and *tolC* in the resistant group were higher than those of the full-sensitive group, but with no significant difference ($t = 2.84$, $P = 0.30$; $t = 1.17$, $P = 0.29$).

Conclusions There was a certain correlation between the high mRNA transcription level of *acrA* and the resistance of fluoroquinolones in *Shigella*.

【Key words】 *Shigella*; Resistance; Fluorescent quinolone; Efflux pump; AcrAB-TolC

细菌性痢疾(简称菌痢)是以志贺菌(*Shigella*)侵袭结肠黏膜上皮细胞为特征的肠道传染性疾病^[1-3]。氟喹诺酮类药物是目前治疗细菌性痢疾的首选药物。但随着其临床使用频率的增加,其耐药率也逐渐增高。其中,外排泵的过度表达是导致氟喹诺酮类抗菌药物耐药性增高的主要机制之一。本研究采用实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-PCR)技术,检测志贺菌临床株外排泵AcrAB-TolC的mRNA转录水平,并分析其与氟喹诺酮类抗菌药物耐药性之间的关系,现报道如下。

资料与方法

一、主要材料和试剂

1. 菌株:192株志贺菌菌株从2009至2015年天津3家三甲医院(天津医科大学总医院、天津医科大学第二医院和天津市儿童医院)肠道门诊接诊的腹泻患者粪便中分离获得。经过常规生化以及血清凝集试验鉴定证实,其中包括福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)83株,宋内志贺菌(*Shigella sonne*)98株,鲍氏志贺菌(*Shigella boydii*)9株,痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)2株。

2. 试剂:血琼脂平板购自天津市金章科技发展有限公司;SS琼脂平板和麦康凯平皿购自中国杭州天和微生物制剂有限公司;志贺菌鉴定血清购自中国宁波天润生物药业有限公司;抗菌药物药敏纸片包括:氨苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、亚胺培南、庆大霉素、链霉素、四环素、阿米卡星、萘啶酸、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、左氧氟沙星、磺胺甲恶唑/甲氧苄啶(SMZco)、头孢哌酮、氯霉素和红霉素共计17种,购自北京天坛生物制品研究所;EASY spin Plus 细菌RNA快速提取试剂盒购自中国北京艾德莱生物科技有限公司的;Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (k1622)试剂盒购自Thermo科技有限公司。

3. 实验仪器:电热恒温培养箱(中国上海新

苗医疗器械制造有限公司)、恒温水浴振荡器(中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司)、高压蒸汽灭菌器(中国山东安得医疗科技有限公司)、超净工作台(冰峰)DYY-6D型电泳仪(北京六一仪器厂)、GEL-DOC-200型凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司)、Line-gene Real-time PCR Detection System(杭州博日科技有限公司)和721分光光度计(中国上海精密仪器有限公司)。

二、方法

1. 体外药敏试验:采用改良K-B纸片扩散法,判断标准参照美国2013年临床实验室标准化研究所(CISI),质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922。

2. 受试菌的筛选:临床收集的192株志贺菌,以耐环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星和左氧氟沙星等3种或3种以上的菌株设为耐药组,对上述抗菌药物全敏感的菌株设为全敏感组。

3. 总RNA的提取及cDNA的合成 志贺菌总RNA的提取以及cDNA的合成依照试剂说明书操作,并依照相关文献^[4-7]进行RNA完整性、纯度和浓度的检测。

4. AcrAB-TolC外排泵mRNA表达水平的检测 采用BioEasy Master Mix (SYBR Green)试剂盒,进行RT-PCR技术检测AcrAB-TolC外排泵mRNA相对表达水平;以16S rRNA作为实验内参基因进行定量分析;3个目的基因的预变性以及最后延伸参数是94℃、5 min, 72℃、10 min。此外, *acrA*基因的循环参数为:94℃、1 min, 60℃、45 s, 72℃、2 min; *acrB*基因的循环参数为:94℃、1 min, 57℃、45 s, 72℃、45 s; *tolC*基因的循环参数为:94℃、5 min, 52℃、45 s, 72℃、2 min; 16S rRNA基因的循环参数为:94℃、1 min, 56℃、45 s, 72℃、1 min;计算方法为比较阈值法(即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法),每株菌的目的基因依次检测3次,以平均值作为其表达量;实验所需引物见表1,引物设计参考文献^[8-10]。

三、统计学处理

采用SPSS 17.0软件对结果数据进行统计分

析。耐药组、敏感组菌株基因 $acrA$ 、 $acrB$ 、 $tolC$ 的相对表达量为计量资料且成正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的比较采用成组设计资料的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、耐药组和全敏感组菌株的筛选

从临床分离的192株志贺菌中,筛选出9株喹诺酮耐药志贺菌株,设为耐药组,菌株编号为:F2、N8、F44、157、187、368、1113、3171和3327;随机挑选9株喹诺酮全敏感株,作为全敏感组,详见表2。

二、AcrAB-TolC外排泵mRNA相对转录水平

实验菌株以标准株ATCC25922为参照菌株,表达水平为1.00,其余各菌株与标准株(ATCC25922)相比较。其中,耐药组9株志贺菌3个目的基因的相对表达量详见表3。

三、耐药组和敏感组AcrAB-TolC外排泵mRNA相对转录水平

将耐药组和全敏感组实验菌株3个目的基因mRNA的转录水平进行统计学分析结果: $acrA$ 基因,耐药组表达水平高于全敏感组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);对于 $acrB$ 和 $tolC$ 基因,耐药组表达水平高于全敏感组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表4。

表1 实时荧光定量PCR反应引物一般特征

目的基因	引物	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
$acrA$	$acrA1$	TGCGGCTTGCTGGTTAAT	1 131
	$acrA2$	GCGGTCGTTCTGATGCTC	
$acrB$	$acrB1$	GATTCCGACCATGCGGTAC	510
	$acrB2$	CGCAGAAATACCGCTACGC	
$tolC$	$tolC1$	ATGAAGAAATTGCTCCCC	1 482
	$tolC2$	TCAGTTACGGAAAGGGTT	
16srRNA	16S1	TGATCCTGGCTCAGATTGA	803
	16S2	TTTACGGCGTGGACTACC	

表2 耐药组和全敏感组菌株的筛选结果

组别	年份	环丙沙星		诺氟沙星		氧氟沙星		左氧氟沙星	
		抑菌环 (mm)	判定 结果	抑菌环 (mm)	判定 结果	抑菌环 (mm)	判定 结果	抑菌环 (mm)	判定 结果
耐药组									
F2	2010	14	R	11	R	11	R	17	S
N8	2009	13	R	14.3	I	6	R	11.6	R
F44	2010	15	R	9	R	12	R	16	I
157	2013	11	R	9	R	12	R	13	R
187	2009	12	R	9	R	10	R	12	R
368	2013	13	R	10	R	11	R	10.3	R
1113	2010	13	R	11	R	13	R	18	S
3171	2010	14	R	10	R	8	R	14	I
3327	2013	14	R	14	I	10	R	12	R
全敏感组									
F13	2010	23	S	22	S	20	S	24	S
1	2010	31	S	26.7	S	27	S	28	S
22	2013	23	S	24	S	20	S	19	S
174	2009	30	S	29	S	28	S	30	S
186	2009	26	S	28	S	26	S	31	S
377	2013	> 35	S	> 35	S	> 35	S	> 35	S
1506	2013	> 35	S	30	S	> 35	S	32	S
3283	2013	> 35	S	> 35	S	> 35	S	34	S
3326	2013	20	I	19	S	17.5	S	19.5	S

注: R 为耐药, I 为中介, S 为敏感

表 3 氟喹诺酮耐药组实验菌株 3 个目的基因的相对表达量

菌株号	acrA	acrB	tolC
F2	5.00	18.49	1.52
N8	9.05	0.84	1.27
F44	1.11	13.70	0.02
157	23.92	6.53	1.77
187	10.50	0.98	28.62
368	10.30	1.03	27.68
1113	7.51	1.75	5.99
3171	6.70	3.34	0.98
3327	5.80	0.90	3.70
平均值	8.88	5.28	7.95

表 4 AcrAB-TolC 外排泵 mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	acrA	acrB	tolC
耐药组	8.88 ± 6.35	5.28 ± 6.51	7.95 ± 11.59
全敏感组	2.07 ± 2.62	2.87 ± 3.12	3.33 ± 2.57
t值	2.97	2.84	1.17
P值	0.02	0.30	0.29

讨 论

20世纪80年代, 氟喹诺酮类药物已开始广泛应用于临床, 成为治疗细菌性痢疾的首选药物。但近年来研究显示, 细菌对喹诺酮第一代至第四代抗菌药物的耐药率逐年上升^[11-13]。其中, 外排泵数量的过度增加是导致氟喹诺酮类抗菌药物耐药率升高的主要机制之一, 志贺菌外排泵AcrAB-TolC由外膜通道蛋白TolC、内膜融合蛋白AcrB和周质间隙蛋白AcrA组成。周质间隙蛋白凭借其自身横跨于内外膜的位置优势, 实现其对抗菌药物的外排功能; 在内膜、膜融合蛋白与药物外排转运蛋白相连并对其外排功能起到促进作用^[14-16]; 在外膜、外膜通道蛋白TolC与外膜通道相连, 促使药物转入细菌外环境中^[17-18]。三者共同构成了横跨细菌内外膜的转运复合体, 实现将细菌胞内有害物质直接转运至外环境中。

本研究选取部分氟喹诺酮耐药和敏感菌株, 应用RT-PCR技术, 依次对acrA、acrB和tolC基因的转录水平进行相对定量以及统计学分析发现, 志贺菌氟喹诺酮耐药组菌株acrA基因的转录水平高于氟喹诺酮全敏感组菌株, 差异具有统计学意义, 提示外排泵中acrA基因的高表达可能与喹诺酮耐药有一定的相关性; acrB和tolC基因mRNA的转录水平耐药组

虽高于全敏感组, 但差异均无统计学意义, 推测可能与实验菌株数较少有关, 此研究结果与近年来国内外学者的结果一致^[19-21]。国内外相关研究发现, 在AcrAB-TolC外排泵系统中, 单基因(acrA)转录水平的增高即可导致志贺菌耐药^[22]。AcrAB-TolC外排泵的化学组成存在3:6:3的比率, 即3个AcrB蛋白:6个AcrA蛋白:3个TolC蛋白, AcrA蛋白横跨周浆间隙^[23], 能够连接位于内膜的AcrB蛋白和位于外膜的TolC通道蛋白, 此外, 还具有激活AcrB的功能^[24-25], 推测AcrAB-TolC外排泵系统的正常生理功能更需要acrA基因数量上的高表达^[26]。本研究中菌株1113和3171耐药表型为氟喹诺酮类耐药, 但其外排泵的组成基因acrA、acrB以及tolC的表达水平均低于相应的均值, 推测该菌株氟喹诺酮类抗菌药物的耐药可能由其他机制协同介导, 有待于进一步研究。

综上, 氟喹诺酮类抗菌药物的耐药性与acrA基因的高转录水平有一定相关性, 而且acrA单基因转录水平增高即可导致氟喹诺酮类抗菌药物的耐药。

参 考 文 献

[1] Li R, Li H, Qi Z. Bacillary and Amebic Dysentery[M]. Radiology of Infectious Diseases,2015:11-36.

[2] Li ZJ, Zhang XJ, Hou XX, et al. Nonlinear and threshold of the association between meteorological factors and bacillary dysentery in Beijing, China[J]. Epidemiol Infect,2015,143(16):1-10.

[3] Brown DR. Catecholamine-directed epithelial cell interactions with bacteria in the intestinal mucosa[M]// Microbial endocrinology: Interkingdom signaling in infectious disease and health. Springer International Publishing,2016:79-99.

[4] Björkman J, Švec D, Lott E, et al. Differential amplicons (ΔAmp)--a new molecular method to assess RNA integrity[J]. Biomol Detect Qua,2016,6(C):4-12.

[5] Eichmeier A, Kiss T, Cechova J. Evaluation of three approaches for the measurement of RNA integrity, concentration and purity in tissues of apricot flower buds[J]. Int J Sci Res,2014,3(3):157-160.

[6] Denisov V. Determination of the integrity of RNA: EP, US9150909[P]. 2015.

[7] Sidova M, Tomankova S, Abaffy P, et al. Effects of post-mortem, and physical degradation on RNA integrity and quality[J]. Biomol Detect Qua,2015, 5(C):3-9.

[8] 徐婷, 金顺鑫, 王潇, 等. 细菌外排泵系统acrAB-tolC的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(9):92-95.

[9] 程玉谦, 祁伟. 肠杆菌科细菌外排泵AcrAB-TolC调控机制的研究进展[J]. 山东医药,2015(21):95-97.

[10] Du D, Wang Z, James NR, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump[J]. Nature,2014,509(7501):512-515.

[11] Long C. First description of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and β-lactamase encoding genes in non-typhoidal Salmonella, isolated from humans, one companion animal and food in Romania[J]. Gut Pathogens,2015,7(16):1-11.

- [12] 付启云, 郑绍同. 常见医院感染病原菌对喹诺酮类药物的耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2013, 12(6):457-460.
- [13] Kao CY, Wu HM, Lin WH, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia in a university hospital in Taiwan, 2001-2015[J]. Sci Rep, 2016, 6(10):32281-32288.
- [14] 杨贤. 志贺菌外排泵AcrAB-TolC及其调控基因突变与氟喹诺酮耐药性关系的研究[D]. 天津医科大学, 2015.
- [15] 王威, 邵龙, 郑娜, 等. 外排转运蛋白介导的抗真菌药物耐药研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(12):2377-2380.
- [16] 陈元旺. 细菌AcrAB-TolC外排泵在幽门螺杆菌耐药中的作用及机制[D]. 南昌大学医学院, 2014.
- [17] 姚明晓. AcrAB-TolC主动外排泵与宋内志贺菌多重耐药关系的研究[D]. 泰山医学院, 2014.
- [18] 程玉谦, 祁伟. 肠杆菌科细菌外排泵AcrAB-TolC调控机制的研究进展[J]. 山东医药, 2015(21):95-97.
- [19] Piddock LJ, White DG, Gensberg K, et al. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Antimicrob Agents Chem, 2000, 44(11):3118-3121.
- [20] Giraud E, Cloeckaert AD, Chaslus DE. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar typhimurium[J]. Antimicrob Agents Chem, 2000, 44(5):1223-1228.
- [21] 杨海燕, 段广才, 郝园林. 主动外排系统acrAB在志贺菌中分布和表达[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(6):685-687.
- [22] 蒋燕群, 李俐, 钱燕斐. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌外排泵转录水平与耐药的关系[J]. 检验医学, 2011, 26(1):51-55.
- [23] Kim J S, Jeong H, Song S, et al. Structure of the tripartite multidrug efflux pump AcrAB-TolC suggests an alternative assembly mode[J]. Molecules & Cells, 2015, 38(2):180-186.
- [24] Weeks JW, Bavro VN, Misra R. Genetic assessment of the role of AcrB β -hairpins in the assembly of the TolC-AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*[J]. Mol Microbiol, 2014, 91(5):965-975.
- [25] Hayashi K, Ryosuke N, Sakurai K, et al. AcrB-AcrA fusion proteins that act as multidrug efflux transporters[J]. J Bacteriol, 2015, 198(2):JB.00587-15.
- [26] Janganan TK, Bavro VN, Li Z, et al. Evidence for the assembly of a bacterial tripartite multidrug pump with a stoichiometry of 3:6:3[J]. J Biol Chem, 2011, 286(30):26900-26912.

(收稿日期: 2014-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

刘奉云, 张豪杰, 杨贤, 等. 志贺菌临床分离株AcrAB-TolC外排泵mRNA转录水平与氟喹诺酮耐药的相关性[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, 11(6):556-560.