

• 药理与临床 •

去甲二氢愈创木酸逆转外排泵系统 MexCD-OprJ 介导铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药性及相关机制研究

詹宛莹, 袁 松, 樊晨星, 吴春霞, 李 昆*

锦州医科大学附属第一医院 检验科, 辽宁 锦州 121001

摘要:目的 评估去甲二氢愈创木酸对外排泵系统 MexCD-OprJ 介导铜绿假单胞菌头孢他啶耐药性的影响并探讨其相关机制。方法 将 0.5 麦氏浓度的菌液稀释接种于 96 孔板内, 棋盘稀释法加入去甲二氢愈创木酸和头孢他啶, 同时设置不加药的阳性对照组、去甲二氢愈创木酸对照组、头孢他啶对照组, 培养 24 h 后, 酶标仪测定吸光度, 记录各药物的最低抑菌浓度 (MIC), 并计算抑菌率和部分抑菌浓度指数 (FIC); 取 96 孔板内的菌液涂布法接种细菌, 培养 24 h 计数菌落数; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测外排泵膜蛋白 MexC、MexD、OprJ 及 *nfxB* 基因的表达情况。结果 与单用头孢他啶或去甲二氢愈创木酸相比较, 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用能更明显抑制外排泵系统 MexCD-OprJ 介导的头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌的生长 ($P < 0.05$), 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸的作用主要表现为协同或相加作用; 联合用药后, 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸的 MIC 值均明显降低, 其中, 部分头孢他啶的 MIC 值与头孢他啶敏感的铜绿假单胞菌质控菌株的 MIC 值无明显差异。与单用头孢他啶相比较, 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用后细菌外排泵膜蛋白 MexC、MexD 和 OprJ 的基因表达明显降低 ($P < 0.05$), 而 *nfxB* 的表达明显升高 ($P < 0.05$)。结论 去甲二氢愈创木酸能逆转外排泵系统 MexCD-OprJ 介导铜绿假单胞菌头孢他啶的耐药性, 其机制与其能够下调该耐药菌外排泵膜蛋白 MexC、MexD 及 OprJ 的表达、上调上述 3 个蛋白的负向调节基因 *nfxB* 的表达有关。

关键词: 去甲二氢愈创木酸; 头孢他啶; 耐药; 铜绿假单胞菌; 外排泵系统

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)07-1878-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.024

Nordihydroguaiaretic acid reverses efflux pump system MexCD-OprJ mediated ceftazidime resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and its related mechanisms

ZHAN Wan-ying, YUAN Song, FAN Chen-xing, WU Chun-xia, LI Kun

Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on ceftazidime resistance of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by efflux pump system MexCD-OprJ and explore its mechanism. **Methods** The bacterial solution with a concentration of 0.5 mcBurney was diluted and inoculated in a 96-well plate, and NDGA and ceftazidime were added by the checkerboard dilution method. At the same time, the untreated control group, NDGA control group and ceftazidime control group were set; After being cultured for 24 h, the absorbance was measured by an enzyme micro-plate reader, the minimum inhibitory concentration (MIC) of each drug was recorded and the bacteriostatic rate and fractional inhibitory concentration (FIC) index were calculated. Bacteria were inoculated with the bacterial liquid coating method in the 96-well plates, and the bacterial colony number was counted after 24 h of culture. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to detect the gene expressions of efflux pump membrane protein MexC, MexD, OprJ and *nfxB*. **Results** Compared with ceftazidime or NDGA alone, combination of ceftazidime and NDGA significantly inhibited the growth of efflux pump system MexCD-OprJ-mediated ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* ($P < 0.05$); The pharmacological effects of ceftazidime and NDGA showed synergistic or additive effects; After combined administration, the MIC values of ceftazidime and NDGA were significantly decreased, and the MIC value of some ceftazidime had no significant difference from that of ceftazidime-sensitive *P. aeruginosa*; Compared with ceftazidime

收稿日期: 2019-10-25

作者简介: 詹宛莹 (1993—), 女, 在读研究生, 主要研究方向为细菌耐药性。Tel: 18741657162 E-mail: 765132034@qq.com

*通信作者 李 昆 Tel: 13841621869 E-mail: lkszllym@163.com

alone, the gene expressions of efflux pump membrane proteins MexC, MexD and OprJ were significantly decreased after combined application of ceftazidime and NDGA ($P < 0.05$), while the expression of *nfxB* was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of NDGA on ceftazidime resistance of *P. aeruginosa* mediated by efflux pump system MexCD-OprJ is related to its ability to down-regulate the gene expression of efflux pump membrane proteins MexC, MexD and OprJ, and up-regulate the gene expression of the negative regulatory gene *nfxB* of the above three proteins.

Key words: nordihydroguaiaretic acid; ceftazidime; resistance; *Pseudomonas aeruginosa*; efflux pump system

铜绿假单胞菌在医院感染中占有十分重要的地位,随着广谱抗生素、激素以及免疫抑制剂的广泛使用,铜绿假单胞菌的耐药性不断增强,尤其是多药耐药菌甚至泛耐药菌呈现逐年上升的趋势,这给临床治疗铜绿假单胞菌感染带来了极大的挑战^[1-4]。目前,临床上多用复合青霉素类、头孢菌素类或喹诺酮类药物等治疗铜绿假单胞菌的感染。但临床抗感染的经验证明,单一抗生素对铜绿假单胞菌的治疗不理想,因其在接受治疗后很快就会出现耐药性,从而导致治疗失败^[5]。头孢他啶属于第 3 代头孢菌素类抗生素,由于其具有较强的抗菌活力、较广的抗菌谱,临床医生常选择其用于铜绿假单胞菌感染的预防和治疗^[6-7]。不过,连续的用药会使铜绿假单胞菌的外排泵膜蛋白 MexC、MexD 和 OprJ 表达上调,从而使进入到细胞内的药物被泵出,导致细菌耐药^[8-9]。去甲二氢愈创木酸是一种从常青灌木中提取的天然产物,常被作为食品添加剂使用。以往的研究表明,去甲二氢愈创木酸不仅具有抗菌活性,还针对细菌细胞膜具有调控外排泵膜蛋白表达的功能^[10-11]。因此,本研究选择去甲二氢愈创木酸为研究对象,评估其对外排泵系统 MexCD-OprJ 介导的铜绿假单胞菌头孢他啶耐药性的影响并进行相关机制研究,为临床合理用药提供参考。

1 材料

1.1 菌株来源

铜绿假单胞菌质控菌株(ATCC27853),购于卫生部临检中心;头孢他啶耐药且外排泵系统 MexCD-OprJ 高表达的 32 株铜绿假单胞菌来源于 2017 年 5 月—2019 年 5 月锦州医科大学附属第一医院住院患者的临床标本,经检验科微生物室 Microscan WalkAway-96Plus 细菌鉴定仪鉴定为铜绿假单胞菌且对头孢他啶耐药,经分子生物学实验室 ABI7500FAST qRT-PCR 仪检测与对头孢他啶敏感的质控菌株 ATCC27853 相比较高表达 MexC、MexD 和 OprJ 基因;该 32 株细菌分离自痰液 22 株、尿液 4 株、分泌物 4 株、血液 2 株,分别来源于呼

吸科、感染科、重症医学科等科室。

1.2 药品与试剂

头孢他啶(粉剂,规格 1 g,批号 1801201,汕头金石粉剂有限公司);去甲二氢愈创木酸(粉剂,规格 1 g,批号 BCBT6959,质量分数 $\geq 97\%$,沈阳科硕商贸有限公司);MH 液体培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司);哥伦比亚血琼脂培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司);逆转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.3 仪器

BSC-1300 II A2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);BPN-240CH 二氧化碳培养箱(江西科爱科技发展有限公司);西门子 Microscan WalkAway-96Plus 细菌药敏分析仪(沈阳朗佑经贸有限公司);SUNRISE 酶标仪(帝肯上海贸易有限公司);NanoDrop2000 超微量分光光度计(Thermo 公司);ABI7500FAST 实时 PCR 扩增仪(美国强生医疗)等。

2 方法

2.1 菌液制备

分别挑取铜绿假单胞菌质控菌(ATCC27853)及头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌的单克隆细菌于生理盐水中配成菌悬液,调整菌悬液浓度为 0.5 个麦氏浊度(相当于 1.5×10^8 CFU/mL),MH 液体培养基稀释 50 倍备用。

2.2 药物配制

将去甲二氢愈创木酸用 MH 液体培养基配制成终质量浓度为 4 000 mg/L,备用;头孢他啶粉末用生理盐水配制成终质量浓度为 7 936 mg/L,备用。

2.3 联合抑菌实验

棋盘稀释法加入药物:每个 96 孔板中每孔加入 150 μ L MH 液体培养基;从 1 排到 7 排 2 列起加入去甲二氢愈创木酸 150 μ L 倍比稀释至 11 列,从 2 列到 11 列 1 排起加入头孢他啶 5 μ L 倍比稀释至 7 排,第 8 排和第 12 列分别设置单独去甲二氢愈创木酸对照组和单独头孢他啶对照组。接种细菌:取已经配好的铜绿假单胞菌质控菌株(ATCC27853)的

菌液和头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌的菌液, 分别接种于 96 孔板内, 每孔 5 μL , 在第 1 列 1 到 4 排设置只加 MH 液体培养基的阴性对照, 在第 1 列 5 到 8 排设置用 MH 液体培养基培养的铜绿假单胞菌阳性对照。培养 24 h 后, 使用酶标仪在测定波长 450 nm、参比波长 620 nm 条件下测定各孔吸光度 (A) 值, 记录药物对不同细菌的最小抑菌浓度 (MIC), 并计算部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration, FIC)。同时, 在头孢他啶使用浓度低于其所对应的 MIC 值 (即耐药) 情况下, 选择与单用头孢他啶处理孔相比较联合使用头孢他啶与去甲二氢愈创木酸处理孔 A 值下降最明显的孔以及这个孔所对应的头孢他啶用药孔和去甲二氢愈创木酸用药孔, 分别计算此时头孢他啶、去甲二氢愈创木酸及二者联合应用后对头孢他啶耐药铜绿假单胞菌的抑菌率。

抑菌率 = $1 - (\text{药物管 } A \text{ 值} - \text{阴性对照管 } A \text{ 值}) / (\text{阳性对照管 } A \text{ 值} - \text{阴性对照管 } A \text{ 值})$

FIC 指数 = A 药联用时 MIC / A 药单用时 MIC + B 药联用时 MIC / B 药单用时 MIC

2.4 细菌生长情况

为了评估去甲二氢愈创木酸对外排泵系统 MexCD-OprJ 介导铜绿假单胞菌头孢他啶耐药性的影响, 取上述棋盘稀释法接种的头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌, 在头孢他啶使用浓度低于其所对应的 MIC 值 (即耐药) 情况下, 选择与单用头孢他啶处理孔相比较联合使用头孢他啶与去甲二氢愈创木酸 A 值下降最明显的孔以及这个孔所对应的头孢他啶用药孔和去甲二氢愈创木酸用药孔, 再加上阴性对照孔和阳性对照孔, 各取 5 μL 加入无菌管中稀释 200 倍, 涂布法 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 计数菌落数。

2.5 qRT-PCR 技术检测相关基因表达

细菌 RNA 的抽提: 分别取铜绿假单胞菌质控菌 (ATCC27853)、经微生物室 Microscan Walkaway 96-Plus 细菌鉴定仪鉴定为头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌以及“2.4”项经不同用药组培养所得铜绿假单胞菌 (3~4 个菌落) 放入不同的 EP 管中, 加入 1 mL Trizol, 按试剂说明书提取 RNA。RNA 定量及 cDNA 的合成: 紫外分光光度仪测定 260、280 nm 波长下 A , $A_{260}/A_{280} > 2.0$, 计算浓度。冰上配制体系加入 RNA, 使其保证 RNA 浓度一致, 按照试剂盒说明书设置反转录反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s; 4 $^{\circ}\text{C}$, 放入 PCR 仪中进行反转录。qRT-PCR: 冰上配制体系 20 μL , DNA 聚合酶 10 μL ,

荧光染料 0.4 μL , 正向引物 0.8 μL , 反向引物 0.8 μL (引物序列及长度见表 1), 灭菌水 6 μL , 体系中加入 DNA 模板 2 μL , 按照试剂盒说明书设置 PCR 反应程序 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 循环数为 40, 放入 qRT-PCR 仪中检测。

表 1 qRT-PCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

引物	序列 (5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	F: CGGAGTCAACGGATTGTCGTAT R: AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	307
MexC	F: CACCGGCAACACCATTTCG R: CAATAGGAAGGATCGGGGCG	98
MexD	F: ACGCTGTTTCACCAGGGTAG R: CGGCAAGGAGAGCTACAACA	118
OprJ	F: GAATGCCTGCTGTTTCTGCC R: TCAGCCGCGAGTATTCCTTC	146
nfxB	F: TGACGAGCGACTCATCAAGG R: GGTTCAGTACGGTCTCTCCG	173

2.6 统计学分析

使用 SPSS 21.0 进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 质控菌与耐药菌基因表达水平比较用两配对样本的非参数检验, 其他两样本比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌 MIC 值及与膜蛋白 MexC、MexD、OprJ 及 nfxB 基因的表达变化

2017 年 5 月—2019 年 5 月本院检验科微生物室经 Microscan Walkaway-96Plus 细菌鉴定仪共鉴定出头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌 32 株。与头孢他啶敏感的铜绿假单胞菌质控菌株相比较, 该 32 株头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌头孢他啶的 MIC 值均明显升高, 但去甲二氢愈创木酸的 MIC 值无明显变化 (表 2)。qRT-PCR 检测结果显示, 与头孢他啶敏感的铜绿假单胞菌质控菌株相比较, 该 32 株头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌外排型膜蛋白 MexC、

表 2 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸对铜绿假单胞菌的 MIC 值

Table 2 MIC value of ceftazidime and nordihydroguaiaretic acid to *P. aeruginosa*

药物	MIC/(mg·L ⁻¹)	
	质控菌株	耐药菌株
头孢他啶	2~8	32~128
去甲二氢愈创木酸	250~500	250~1 000

MexD 和 OprJ 的基因表达均明显升高 ($P < 0.05$), 而上述 3 个蛋白的负向调节基因 nfxB 的表达明显降低 ($P < 0.05$), 见图 1。

3.2 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后对头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌抑菌率影响的变化情况

头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后对上述 32 株头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌抑菌率影响的评估结果见图 2, 与单用头孢他啶或去甲二氢愈创木酸相比较, 相同浓度的头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用后对头孢他啶耐药的铜绿假单胞

菌抑菌率明显提高 ($P < 0.05$)。

3.3 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后对头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌生长影响的变化情况

头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后对本研究选取的 32 株头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌生长影响的评估结果见图 3, 与未用药的阳性对照组相比较, 头孢他啶组以及去甲二氢愈创木酸组生长的菌落数虽然有所减少, 但并不明显 ($P > 0.05$); 而头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合用药组, 无论是与未用药的阳性对照组相比较, 还是与单用头孢他啶或去甲二氢愈创木酸组相比较, 生长

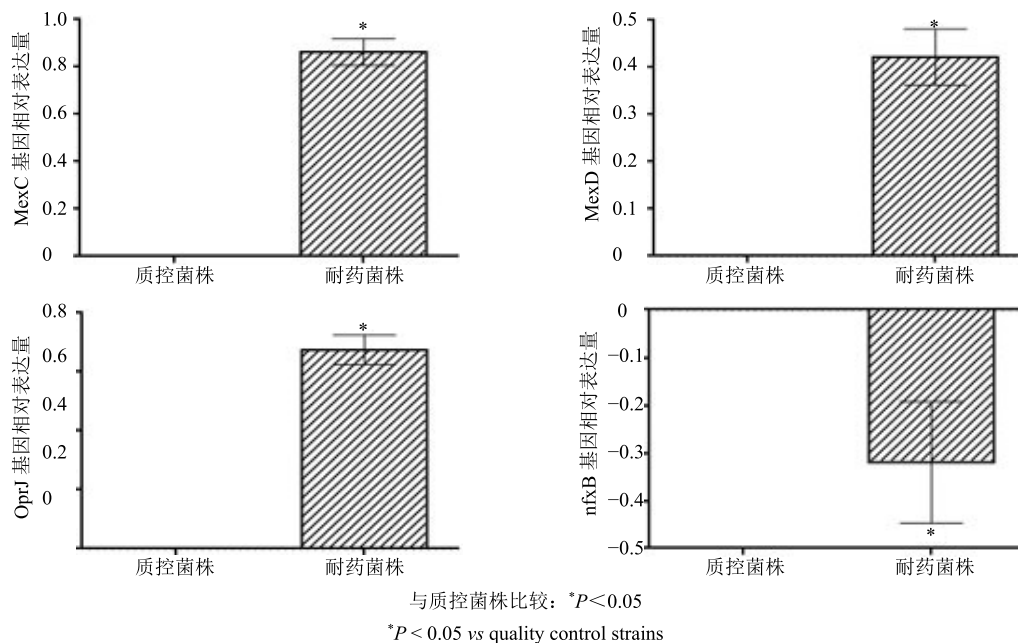
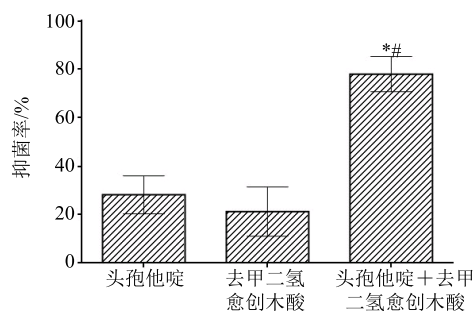


图 1 质控菌株与耐药菌株相关基因表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 32$)

Fig. 1 Comparison of gene expression levels between quality control strains and drug-resistant strains ($\bar{x} \pm s, n = 32$)



与头孢他啶组比较: * $P < 0.05$; 与去甲二氢愈创木酸组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs ceftazidime group; # $P < 0.05$ vs nordihydroguaiaretic acid group

图 2 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合使用对铜绿假单胞菌的抑菌率 ($\bar{x} \pm s, n = 32$)

Fig. 2 Inhibition rate of ceftazidime combined with nordihydroguaiaretic acid against *P. aeruginosa* ($\bar{x} \pm s, n = 32$)

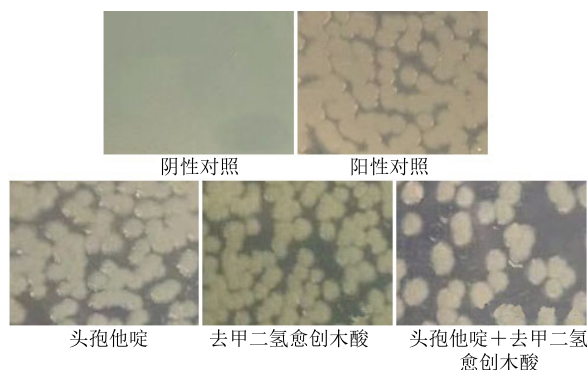
的菌落数明显减少 ($P < 0.05$)。

3.4 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌各药物 MIC 值的变化情况

头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后对 32 株头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌 MIC 值的变化影响的评估结果见表 3, 与单用头孢他啶或去甲二氢愈创木酸相比较, 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合使用后, 无论是头孢他啶还是去甲二氢愈创木酸, 其 MIC 值均明显降低, 而部分头孢他啶的 MIC 值甚至与表 2 中质控菌株的 MIC 值无明显差异。

3.5 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用后对头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌 FIC 指数的影响

头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后对



与阳性对照组比较: * $P < 0.05$; 与头孢他啶组比较: # $P < 0.05$; 与去甲二氢愈创木酸组比较: ^ $P < 0.05$, 图 4 同
* $P < 0.05$ vs positive control group; # $P < 0.05$ vs ceftazidine group; ^ $P < 0.05$ vs nordihydroguaiaretic acid group, same as figure 4

图 3 去甲二氢愈创木酸对头孢他啶抑制铜绿假单胞菌生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 32$)

Fig. 3 Effect of nordihydroguaiaretic acid on growth inhibition of ceftazidine to *P. aeruginosa* ($\bar{x} \pm s$, $n = 32$)

表 3 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合使用前后对头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌 MIC 值变化

Table 3 MIC value of ceftazidine and nordihydroguaiaretic acid against drug-resistant *P. aeruginosa* before and after their combination

药物	MIC/(mg·L ⁻¹)	
	联合用药前	联合用药后
头孢他啶	32~128	2~32
去甲二氢愈创木酸	250~1 000	31.25~250

32 株头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌 FIC 指数影响的评估结果表明, 当头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合使用主要表现为协同作用 (FIC ≤ 0.5) 占 78% (25 株), 相加作用 (FIC 为 0.5~1) 占 22% (7 株), 而并无无关作用 (FIC 为 1~2) 和拮抗作用 (FIC > 2) 出现。说明去甲二氢愈创木酸提高了头孢他啶对头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌的药物疗效。

3.6 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌膜蛋白 MexC、MexD、OprJ 及 nfxB 基因的表达变化情况

头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后对 32 株头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌膜蛋白 MexC、MexD、OprJ 及 nfxB 基因表达影响的评估结果见图 4, 单用头孢他啶组与阳性对照组 (头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌) 相比较, 二者细菌膜蛋白 MexC、MexD、OprJ 及 nfxB 基因的表达无明显差异 ($P > 0.05$); 但与阳性对照组及单用头孢他啶组相比较, 去甲二氢愈创木酸组细菌膜蛋白 MexC、MexD 和 OprJ 的表达明显降低 ($P < 0.05$), 而上述 3 个蛋白的负向调节基因 nfxB 的表达明显升高 ($P < 0.05$);

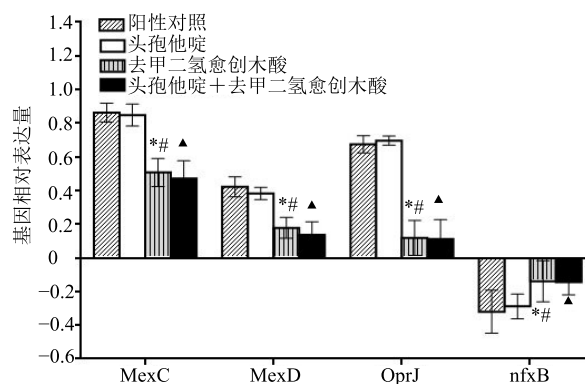
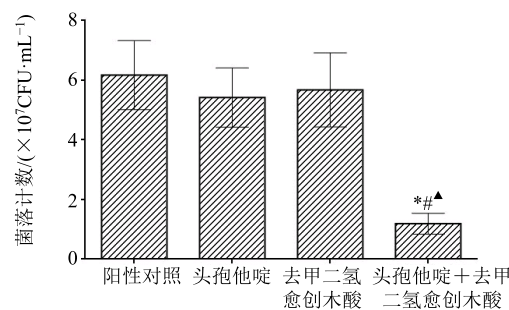


图 4 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合使用前后头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌膜蛋白 MexC、MexD、OprJ 及 nfxB 基因表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 32$)

Fig. 4 Changes in gene expression of ceftazidine resistant *P. aeruginosa* membrane proteins MexC, MexD, OprJ and nfxB before and after ceftazidine and nordihydroguaiaretic acid combination ($\bar{x} \pm s$, $n = 32$)

与单用头孢他啶相比较, 头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用后细菌膜蛋白 MexC、MexD 和 OprJ 的表达明显降低 ($P < 0.05$), 而 nfxB 的表达明显升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

铜绿假单胞菌广泛分布于自然界中, 人体的皮肤、呼吸道、肠道均有存在, 是引起急慢性感染最常见的条件致病菌^[12-13]。近年来, 由于广谱抗生素、激素以及免疫抑制剂的广泛使用, 铜绿假单胞菌对多种抗生素快速产生耐药性在临床抗感染治疗中已经成为不争的事实^[14]。铜绿假单胞菌的耐药机制^[15]较为复杂, 主要涉及抗菌活性酶产生、抗菌药物作用靶点改变、外膜通透性降低、生物膜形成、外排

泵等多种机制的介导。其中,外排泵在介导铜绿假单胞菌的耐药机制中发挥着主导作用^[16-17],其过度表达使进入到细菌内的药物不断被泵出,导致菌体内的药物浓度降低,不足以抑制和杀灭细菌,从而使细菌产生耐药性。以往的研究表明,外排泵抑制剂不仅能提高菌体内药物积聚浓度从而逆转细菌的耐药性,而且还能明显降低耐药突变菌株的发生率^[18-19]。因此,应用外排泵抑制剂治疗耐药铜绿假单胞菌的感染成为一种新策略。目前,在铜绿假单胞菌的外排泵系统中,MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexJK-OprM 和 MexXYOprM 已被证实与耐药有关^[20],其中,MexCD-OprJ 外排泵系统参与了铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药^[8]。MexCD-OprJ 外排泵系统由 3 部分组成:内膜蛋白 MexD、膜融合蛋白 MexC 以及外膜蛋白 OprJ,以上 3 种蛋白能形成一个横贯内外膜的通道,将头孢他啶直接从铜绿假单胞菌的细胞质泵至细胞外^[21-23];nfxB 是外排泵系统 MexCD-OprJ 的负向调控基因,在其表达减少或缺失的菌株中 MexCD-OprJ 高表达^[24]。头孢他啶是抗铜绿假单胞菌的经典药物,单一使用其很容易使 nfxB 表达减少或缺失,从而导致外排泵系统 MexCD-OprJ 的高表达,使铜绿假单胞菌对头孢他啶耐药。若有一种药物能调控 MexCD-OprJ 及 nfxB,将其与头孢他啶联合应用治疗铜绿假单胞菌感染,将能大大提高铜绿假单胞菌对头孢他啶的敏感性。去甲二氢愈创木酸是一种从常青灌木中提取的天然产物,最熟知的是其抗氧化作用。近年来研究显示,去甲二氢愈创木酸不仅具有抗菌活性,还能通过调控外排泵系统 AcrAB-TolC 中 AcrB 蛋白的表达提高大肠埃希菌耐药菌株对萘啶酮酸、氯霉素和红霉素的敏感性^[25]。但是,关于其是否能够通过调控外排泵系统 MexCD-OprJ 中相关基因和蛋白的表达来逆转铜绿假单胞菌对头孢他啶耐药性却鲜有报道。因此,选择去甲二氢愈创木酸作为研究对象,评估其对外排泵系统 MexCD-OprJ 介导的铜绿假单胞菌头孢他啶耐药性的影响并进行相关机制的研究。本实验结果显示,与单用头孢他啶或去甲二氢愈创木酸相比较,头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用能更明显抑制外排泵系统 MexCD-OprJ 介导的头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌的生长,二者的药理作用主要表现为协同或相加作用;联合用药后,头孢他啶与去甲二氢愈创木酸的 MIC 值均明显降低,其中,部分头孢他啶的 MIC

值与头孢他啶敏感的铜绿假单胞菌质控菌株的 MIC 值无明显差异。以上结果说明去甲二氢愈创木酸能逆转外排泵系统 MexCD-OprJ 介导铜绿假单胞菌头孢他啶的耐药性。为了探讨其相关机制,接下来评估了头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用前后头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌膜蛋白 MexC、MexD、OprJ 和 nfxB 基因的表达变化情况。结果显示,与对照组或单用头孢他啶组相比较,去甲二氢愈创木酸用药组细菌外排泵膜蛋白 MexC、MexD 和 OprJ 基因的表达明显降低,而 nfxB 的表达明显升高;与单用头孢他啶相比较,头孢他啶与去甲二氢愈创木酸联合应用后 MexC、MexD 和 OprJ 基因的表达明显降低,而 nfxB 的表达明显升高。以上结果说明去甲二氢愈创木酸逆转外排泵系统 MexCD-OprJ 介导的铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药性与其能够下调该耐药菌外排泵膜蛋白 MexC、MexD 及 OprJ 的表达、上调上述 3 个蛋白的负向调节基因 nfxB 的表达有关。以往也有研究表明,外排泵基因的表达能够影响生物膜的形成,二者呈正相关^[26]。本研究仅探讨去甲二氢愈创木酸能够下调外排泵系统 MexCD-OprJ 的表达从而逆转该外排泵系统介导的铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药性,关于去甲二氢愈创木酸是否能够在下调外排泵系统 MexCD-OprJ 中 MexC、MexD 及 OprJ 基因的表达后进一步影响生物膜的形成,从而有助于去甲二氢愈创木酸逆转 MexCD-OprJ 介导的铜绿假单胞菌对头孢他啶的耐药性还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Choudhury D, Talukdar A D, Maurya A P, et al. Contribution of efflux pumps in fluoroquinolone resistance in multi-drug resistant nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary referral hospital in north east India [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2015, 33(1): 84-86.
- [2] 陈 玲, 刘剑荣. 医院感染主要革兰阴性杆菌的临床分布及耐药性监测 [J]. *实验与检验医学*, 2018, 36(2): 263-264.
- [3] 高 娅, 舒 畅. 头孢洛扎/他唑巴坦与头孢他啶/阿维巴坦抗铜绿假单胞菌研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(19): 49-53.
- [4] de Oliveira Santos I C, Pereira de Andrade N F, da Conceicao Neto O C, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro-Brazil: Importance of

- mutational mechanisms over the years (1995—2015) [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 73: 411-415.
- [5] 蔡广平. 医院获得性铜绿假单胞菌肺炎细菌耐药性、危险因素及预后分析 [D]. 广州: 广州医科大学, 2014.
- [6] Sy S K B, Zhuang L, Beaudoin M E, *et al*. Potentiation of ceftazidime by avibactam against β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* infection model [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(4): 1109-1117.
- [7] 沈佳丽. 头孢他啶体外诱导铜绿假单胞菌敏感株产生耐药的实验研究 [J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(17): 61-63.
- [8] Fernandez L, Hancock R E W. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25(4): 661-681.
- [9] Alcalde-Rico M, Olivares-Pacheco J, Alvarez-Ortega C, *et al*. Role of the Multidrug resistance efflux pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing response [J]. *Front Microbiol*, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.02752.
- [10] Li X, Fan S, Pan X, *et al*. Nordihydroguaiaretic acid impairs prostate cancer cell migration and tumor metastasis by suppressing neuropilin 1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 86225-86238.
- [11] Cunningham-Oakes E, Soren O, Moussa C, *et al*. Nordihydroguaiaretic acid enhances the activities of aminoglycosides against methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Microbiol*, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.01195.
- [12] Fata M M, Shirin G, Rehm B H A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
- [13] Coggan K A, Wolfgang M C. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2012, 14(2): 47-70.
- [14] 林丽容. 铜绿假单胞菌分布及耐药情况分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(35): 118-120.
- [15] 许时菲, 季 萍. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(4): 119-120.
- [16] 魏 光, 叶 英, 沈继录. 铜绿假单胞菌主动外排系统研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(12): 886-892.
- [17] Terzi H A, Canan K. The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *World J Microb Biot*, 2014, 30(10): 2681-2687.
- [18] Andersen J L, He G X, Kakarla P, *et al*. Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12(2): 1487-1547.
- [19] Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, *et al*. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: The inhibitor response strategy [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(6): 1223-1229.
- [20] 吴伟清, 李国明. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(22): 3812-3815.
- [21] 魏 冕, 刘向群. 铜绿假单胞菌 RND 外排泵研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(8): 1512-1516.
- [22] Jeannot K, Elsen S, Kohler T, *et al*. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(7): 2455-2462.
- [23] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, *et al*. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(12): 3322-3327.
- [24] Monti M R, Morero N R, Virginia M, *et al*. nfxB as a novel target for analysis of mutation spectra in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e66236.
- [25] 王印虎. 以 AcrB 为靶标的小分子抑制剂的设计、合成及逆转耐药活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [26] 陈小燕, 潘 珏. 细菌耐多药外排泵的研究进展 [J]. 微生物与感染, 2016, 11(3): 183-187.