

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.12.001

· 论 著 ·

秀丽隐杆线虫—泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型用于外排泵抑制剂逆转环丙沙星耐药的研究

段欣冉^{1,2}, 姜志辉², 杨相海³, 李 健^{1,2}

(1 广东药科大学, 广东 广州 510000; 2 广州军区广州总医院, 广东 广州 510000; 3 长沙医学院, 湖南 长沙 410000)

[摘要] **目的** 建立秀丽隐杆线虫—泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型,用于外排泵抑制剂(EPIs)逆转泛耐药鲍曼不动杆菌(XDR-AB)对于环丙沙星耐药的研究。**方法** 建立秀丽隐杆线虫—泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型,选用6种EPIs(CCCP、PAβN、NMP、奥美拉唑、利血平和维拉帕米)与氟喹诺酮类药物环丙沙星联合使用,记录秀丽隐杆线虫生存率以评价体内药效,同时进行毒性试验及体外药敏试验。**结果** 不同浓度XDR-AB对秀丽隐杆线虫的致死情况不同,选择 5×10^6 CFU/mL作为XDR-AB感染秀丽隐杆线虫浓度。秀丽隐杆线虫生存实验显示,XDR-AB感染线虫3h后线虫组与加入多粘菌素B的对照组生存曲线比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.154, P > 0.05$),感染线虫6、9h,与对照组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$),但感染6h与9h组的生存曲线比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.669, P > 0.05$),最终选择6h作为感染时长,36h为合适的抗菌药物治疗时长。环丙沙星联合EPIs应用于感染模型实验中,低浓度的PAβN、NMP、奥美拉唑、利血平可将线虫存活率分别提高30%~40%、15%~20%、20%~30%、20%,高浓度的维拉帕米可将感染线虫的存活率提高30%左右。体外药敏试验和毒性试验结果显示,环丙沙星分别与CCCp、奥美拉唑和维拉帕米联合可降低MIC至原来的1/4,分别联合PAβN、NMP和利血平可降低MIC至原来的1/2,其中CCCp体外联合抑菌效果最佳,但毒性较大不适于体内药效研究。**结论** 首次成功构建了秀丽隐杆线虫—泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型,得到6种EPIs逆转环丙沙星耐药性的初步研究。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;秀丽隐杆线虫;外排泵抑制剂;环丙沙星

[中图分类号] R378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)12-1101-08

Reversal of ciprofloxacin resistance by efflux pump inhibitors using *Caenorhabditis elegans*-extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection model

DUAN Xin-ran^{1,2}, JIANG Zhi-hui², YANG Xiang-hai³, LI Jian^{1,2} (1 Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000, China; 2 General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510000, China; 3 Changsha Medical University, Changsha 410000, China)

[Abstract] **Objective** To establish an extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (XDR-AB) infection model using *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), and evaluate the effect of efflux pump inhibitors (EPIs) on reversal of ciprofloxacin resistance in XDR-AB. **Methods** XDR-AB infection model of *C. elegans* was established, six EPIs (CCCp, PAβN, NMP, omeprazole, reserpine, and verapamil) combined with ciprofloxacin were used to treat the infected model, the survival rate of *C. elegans* was recorded to evaluate the in vivo activities of drugs, toxicity test and in vitro drug susceptibility test were also performed. **Results** Lethal effect of different concentrations of

[收稿日期] 2017-08-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81403084);广州市科技计划项目(No. 201509010012)

[作者简介] 段欣冉(1993-),女(汉族),河南省郑州市人,硕士研究生,主要从事抗感染药物的高通量筛选研究。

[通信作者] 李健 E-mail: 2292851480@qq.com

XDR-AB on *C. elegans* was varied, 5×10^6 CFU/mL of XDR-AB was selected to infect *C. elegans*. *C. elegans* survival test showed that survival curves of *C. elegans* infected with XDR-AB for 3 hours and curves of control group (polymixin B was added) were not significantly different ($\chi^2 = 3.154, P > 0.05$); compared with control group, survival curves of *C. elegans* infected with XDR-AB for 6 hours or 9 hours were significantly different (both $P < 0.001$), but 6 hours and 9 hours were not significantly different ($\chi^2 = 0.669, P > 0.05$), 6 hours was chosen as the duration of infection, 36 hours was appropriate for the duration of antimicrobial therapy. Ciprofloxacin with EPIs for infection model revealed that low concentration of PA β N, NMP, omeprazole, and reserpine could improve the survival rate of *C. elegans* by 30% - 40%, 15% - 20%, 20% - 30%, and 20% respectively, high concentration of verapamil could improve the survival rate of infected *C. elegans* by about 30%. In vitro susceptibility test and toxicity test results showed that ciprofloxacin combined respectively with CCCP, omeprazole, and verapamil could reduce minimum inhibitory concentration (MIC) to the original 1/4, combined respectively with PA β N, NMP, and reserpine could reduce MIC to the original 1/2, CCCP had the best bacterial inhibitory effect in vitro, but the toxicity was large, and was not suitable for the study of pharmacodynamics in vivo. **Conclusion** The infection model of *C. elegans*-XDR-AB is initially and successfully established, which is used to evaluate the efficiency of six EPIs for reversing ciprofloxacin resistance.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; *Caenorhabditis elegans*; efflux pump inhibitor; ciprofloxacin

[Chin J Infect Control, 2017, 16(12): 1101 - 1108]

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是一类非发酵型革兰阴性杆菌,广泛存在于自然界和医院环境中,是引起医院感染最常见的条件致病菌之一^[1]。鲍曼不动杆菌可引起包括呼吸道感染、泌尿系统感染、菌血症、伤口感染、脑膜炎和呼吸机相关肺炎等多种感染性疾病。随着抗菌药物在临床中的广泛使用,该菌对常用抗菌药物产生了极大的耐药性,甚至出现了多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)和广泛耐药鲍曼不动杆菌(extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, XDR-AB),给临床治疗带来极大的挑战^[2]。

鲍曼不动杆菌耐药性是通过多种耐药机制介导的,其中细菌主动外排泵的过度表达可使抗菌药物不能在细胞内蓄积达到作用浓度,是产生耐药的一个重要原因。在不动杆菌属中,耐药-结节-分化(resistance-nodulation-division, RND)家族对细菌耐药的产生有重要作用,其中 AdeABC、AdeIJK、AdeFGH 外排系统主要存在于鲍曼不动杆菌,可外排多种抗菌药物,如喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素、红霉素等引起耐药^[3-4]。喹诺酮类药物如环丙沙星,曾作为治疗鲍曼不动杆菌感染的一线药物,但由于鲍曼不动杆菌对其产生了广泛的耐药,导致临床已基本摒弃用环丙沙星治疗耐药鲍曼不动杆菌感染。鲍曼不动杆菌对环丙沙星的耐药机制主要是外排泵的过度表达,环丙沙星合用外排泵抑制剂(efflux pump inhibitors, EPIs)使其重新对耐药菌株发挥作用,已成为治疗鲍曼不动杆菌感染的潜在有效途

径^[5-6]。目前,关于 EPIs 的研究多局限于体外实验。不同的 EPIs 在体内是否能逆转鲍曼不动杆菌的耐药性达到较好的抑菌效果,是否会产生较大的毒性影响其使用,是目前 EPIs 应用的主要问题。秀丽隐杆线虫全身透明易于观察,培养成本低,可操作性强,具有结构简单、遗传背景清晰、生命周期短等特点。研究^[7-8]发现,线虫有约 40% 的基因与人类疾病具有明确的同源基因,已成为现代发育生物学、遗传学、基因组学研究的重要模式生物,在病原菌中的研究也越来越广泛。通过建立秀丽隐杆线虫-泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型,将环丙沙星联合多种 EPIs 应用于模型中,筛选对 XDR-AB 有效的组合药物,为 XDR-AB 的治疗提供新方法和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 线虫和菌种 秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans* glp-4; sek-1)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)OP₅₀由中山大学药学院陈缙光教授惠赠,质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922,临床分离的 XDR-AB 由广州军区广州总医院检验科提供,采用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 微生物全自动鉴定药敏仪鉴定。

1.1.2 药物 CCCP(carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone)、PA β N(phenyl-arginine- β -naphthylamide)、多粘菌素 B(polymyxin B)、萘啶酸(nalidixic

acid)、维拉帕米(verapamil)、利血平(reserpine)、奥美拉唑(omeprazole)均购自美国 Sigma 化学试剂公司。NMP[1-(1-naphthylmethyl)-piperazine]、环丙沙星盐酸盐(ciprofloxacin hydrochloride monohydrate)购自阿拉丁试剂公司。荧光探针 Dil(1,1-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶二碳菁)购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.3 培养基 LB(Luria-Bertani)固体培养基: LB 粉 4.2 g, 琼脂粉 3 g, 加蒸馏水 200 mL, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min 后 4℃ 保存备用。E. coli OP₅₀: 将 E. coli OP₅₀ 接种至 LB 固体培养基上, 于 37℃ 二氧化碳温箱中孵育 24 h。NGM(nematode growth medium)培养基: 胰蛋白胨 1.5 g, 琼脂粉 10.8 g, NaCl 1.80 g, 加蒸馏水 585 mL 后 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min, 待温度降低至 60℃ 以下时, 加入滤过除菌 5 mg/mL 的胆固醇 660 μL, 1 mol/L 的 CaCl₂ 660 μL, 1 mol/L 的 MgSO₄ 660 μL, 并加入磷酸缓冲液(K₂HPO₄ 和 KH₂PO₄) 13 mL, 分装至直径 9 cm 的培养皿中, 待平板冷却凝固后, 取 E. coli OP₅₀ 单个菌落涂布于培养基上, 37℃ 孵育 24 h 后, 4℃ 保存备用。20% BHI 液体培养基(brain-heart infusion medium): 4.83 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.96 g KH₂PO₄, 1.60 g NaCl, 0.04 g MgSO₄, 2.96 g BHI, 10 μmol/L FeCl₃, 加蒸馏水至 400 mL, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min, 待温度降低至 60℃ 以下时, 加入萘啶酸使其终浓度为 5 μg/mL, 于 4℃ 保存备用。CAMHB 培养基: 6.6 g CAMHB, 加入 300 mL 蒸馏水 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min, 于 4℃ 保存备用。

1.1.4 缓冲液及试剂 M9 缓冲液: 3.02 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.6 g KH₂PO₄, 1 g NaCl, 0.024 g MgSO₄, 加入蒸馏水 200 mL, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min 后备用; 线虫裂解液: 0.4 g NaOH, 2 mL HClO 溶液, 4 mL 蒸馏水, 现用现配。

1.1.5 设备 Leica DMI 4000 型荧光显微镜(徕卡显微系统上海贸易有限公司), WSI-3000 倒置生物显微镜(广州微域光学仪器有限公司), SW-CJ-1F 型净化工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂), TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司), DHP-9012 型恒温培养箱, LRH-70 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 线虫的培养和同期化处理 选用 *glp-4*、*sek-1* 基因缺陷型线虫, 相较 N2 野生型线虫, 其在

25℃ 下不能产卵, 且具有免疫缺陷性^[9]。线虫按照文献标准程序进行培养^[7]。线虫感染实验前 4 d 准备同步化的线虫: 将线虫用 M9 缓冲液从 NGM 板上洗下收集至 15 mL 离心管, 500 r/min 离心 1 min, 取上清液至剩余 3.5 mL 的线虫液, 加 2.5 mL 的裂解液充分振摇 3 min, 加 M9 缓冲液至 15 mL, 1 500 r/min 离心 1 min, 洗涤 5 次, 分离得到虫卵, 15℃ 振荡 16 h 虫卵孵化至 L1 期的线虫, 将其置于 NGM 平板的 E. coli OP₅₀ 菌苔上, 25℃ 培养 48 h, 得到同步化的 L4 期线虫^[8]。

1.2.2 菌悬液的制备 将冻存在 -80℃ 的 XDR-AB 菌株复苏, 划线培养于 LB 固体培养基, 37℃ 培养 24 h 备用。

1.2.3 线虫-泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型的建立 从细菌平板上取 XDR-AB 单个菌落, 于 20% BHI 中使用光度比浊仪调整菌浓度至 0.5 麦氏单位(约为 1.5×10^8 CFU/mL), 将同步化后培养至 L4 期的线虫从平板上洗下, 离心(500 r/min, 1 min), 重复 2~3 次, 将线虫悬浮于终浓度为 5×10^6 CFU/mL 的 XDR-AB 中感染 6 h 后, 用 BHI 液体培养基清洗至少 3 次, 将线虫分配至 96 孔板中, 15~20 条/孔加至 180 μL, 治疗组加 20 μL 的待测药物(溶于 1% DMSO), 阳性对照组加入 2 μg/mL 的多粘菌素 B(PB) 20 μL(溶于 1% DMSO), 阴性对照组加入 1% DMSO 20 μL, 于 25℃、湿度为 85% 的条件下培养 30 h, 在显微镜下观察线虫存活率。

1.2.4 EPIs 的毒性试验 用 20% BHI 液体培养基将同步化培养至 L4 期的线虫洗至 15 mL 离心管中, 500 r/min, 1 min 清洗 3 次, 15~20 条/孔分装至 96 孔板中至 180 μL, 分别加系列浓度的 EPIs: CCCP、PAβN(分别为 5、10、15、20、25、30、35、40 μg/mL), NMP、奥美拉唑、维拉帕米、利血平(分别为 10、20、30、40、50、60、70、80 μg/mL) 20 μL, 于 25℃ 湿度为 85% 的条件下非共培养 30 h, 在显微镜下观察线虫存活率, 判断各 EPIs 对正常线虫的毒性作用。

1.2.5 抗菌药物环丙沙星及各 EPIs 的体外药敏试验 微量肉汤稀释法测定盐酸环丙沙星最小抑菌浓度(MIC)。以大肠埃希菌 ATCC 25922, 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 作为质控菌株同批进行测试。配制 5 120 μg/mL 的盐酸环丙沙星储备液, 取 13 支无菌试管, 用 CAMHB 培养基配制系列浓度的盐酸环丙沙星 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg/mL, 各取 100 μL 于 96 孔板中; 使

用光度比浊仪,取新鲜培养的细菌菌落,调整菌悬液浓度为 0.5 麦氏单位,取 100 μL 加入各孔使菌终浓度为 5×10^6 CFU/mL,各孔抗菌药物浓度为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 16~20 h,结果评定依据美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 标准,单位为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。测定各 EPIs 的 MIC 值以及盐酸环丙沙星加入 EPIs 后的 MIC 值,依据毒性试验结果分别加入各 EPIs,并比较加入 EPIs 前后菌株对抗菌药物 MIC 值的变化。

1.2.6 抗菌药物盐酸环丙沙星联合不同的 EPIs 对感染线虫的药效 将同步化的线虫按照所建立感染模型通过非共培养得到感染线虫,联合用药治疗感染线虫,药物浓度确定在安全范围内,设置高中低 3 组药物浓度,30 h 后观察线虫的存活率,判断不同 EPIs 在不同药物浓度下联合盐酸环丙沙星对感染线虫的体内治疗作用。感染实验独立进行 3 次,同时进行阳性对照试验和阴性对照试验。

1.2.7 细菌感染路径示踪 为追踪鲍曼不动杆菌的感染路径,本试验将细菌标记上一种细胞膜红色荧光探针 Dil。将细菌悬浮在 2 mL 的 M9 溶液中,添加 1 μL Dil 储备液,用锡纸避光,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h,清洗细菌至少 3 次后调整细菌浓度为 5×10^6 CFU/mL 的悬浮液去感染线虫 6 h。最终感染后的线虫用 M9 溶液清洗直至上清液完全无色为止,用荧光显微镜观察细菌的荧光强度。

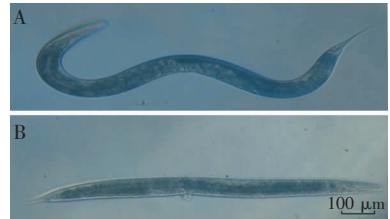
1.3 统计分析 使用 GraphPad Prism 5 软件对全部数据进行分析,采用 Kaplan-Meier 方法进行生存分析,Log-rank (Mantel-Cox) Test 方法对组间数据进行差异显著性分析,组间两因素方差分析用 Two-way ANOVA 检验分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线虫-泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型成功建立

2.1.1 不同的液体培养基中不同 XDR-AB 浓度对线虫感染模型的影响 采用不同浓度的 XDR-AB (5×10^8 、 5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 CFU/mL, E. coli OP₃₀ 对照组)在不同的液体培养基 (10% BHI、20% BHD) 中感染秀丽隐杆线虫,记录线虫的生存状态,确定合适的感染条件。在液体培养基中,存活线虫呈现正弦状态,或咽部肌肉不停泵动,在光线和机械

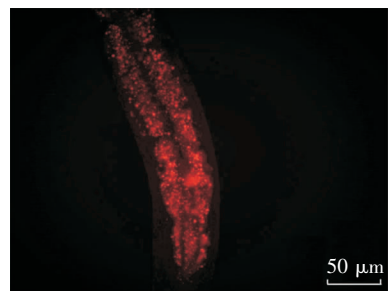
刺激时可以自由活动,而 XDR-AB 感染死亡的线虫呈直线型僵直状态,有些身体过于肿胀而使得阴户突出,有些已被细菌侵蚀严重的线虫明显丧失身体结构 (见图 1),死线虫和活线虫具有明显的外观差异,方便实验定量计算。



A: 正常存活状态秀丽隐杆线虫; B: 秀丽隐杆线虫与鲍曼不动杆菌共孵育 30 h 后感染致死的秀丽隐杆线虫

图 1 荧光显微镜下观察存活状态和死亡状态的秀丽隐杆线虫
Figure 1 Fluorescence microscopic observation of survival and death status of *C. elegans*

为确定在液体培养基中秀丽隐杆线虫的致死是由于鲍曼不动杆菌在线虫体内的积聚,将线虫在含鲍曼不动杆菌的 20% BHI-M9 液体培养基中培养 6 h,显微镜下观察,线虫的整个肠道明显膨胀。为进一步证实线虫肠道的膨胀是由于鲍曼不动杆菌的定植,本实验用 Dil 细胞膜红色荧光探针标记鲍曼不动杆菌,追踪鲍曼不动杆菌可能的感染路径。将线虫置于含荧光标记细菌的 20% BHI-M9 液体培养基中培养 6 h,在荧光显微镜下观察,可观察到喂食了鲍曼不动杆菌的线虫整个肠道明显膨大,并充满了强烈的荧光细菌。见图 2。



注: XDR-AB 与 Dil 细胞膜红色荧光探针共培养 3 h 后感染秀丽隐杆线虫 6 h,40 倍荧光显微镜下观察秀丽隐杆线虫肠道充满强烈荧光细菌

图 2 荧光显微镜下观察 Dil 细胞膜红色荧光探针标记 XDR-AB 感染秀丽隐杆线虫

Figure 2 Fluorescence microscopic observation of XDR-AB-infected *C. elegans* labeled by Dil red fluorescent probe

选择 10% BHI 的液体培养基时,即使最高浓度的 XDR-AB 也无法成功感染线虫,线虫僵直一段时间后可重新蠕动;选择 20% BHI 液体培养基时,可观察到随着细菌浓度的降低,线虫存活时间有所延长(见图 3)。线虫在不同浓度 XDR-AB 感染下的半数致死时长(time for half to die, LT50)明显不同, 5×10^8 CFU/mL XDR-AB 感染时 LT50 为 12 h, 5×10^7 CFU/mL XDR-AB 感染时 LT50 为 18 h, 5×10^6 CFU/mL XDR-AB 感染时 LT50 为 30 h,在 5×10^5 CFU/mL XDR-AB 感染时 LT50 为 42 h。根据不同浓度 XDR-AB 的致病力以及不同浓度 XDR-AB 对试验进度的影响,最终选取 5×10^6 CFU/mL XDR-AB 作为感染浓度。

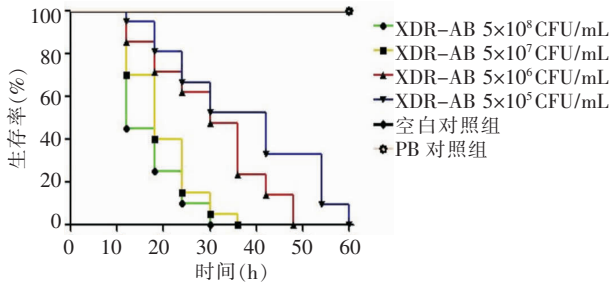


图 3 不同浓度 XDR-AB 对感染秀丽隐杆线虫生存曲线

Figure 3 Survival curves of *C. elegans* infected with different concentrations of XDR-AB

2.1.2 不同感染时长及药物干预时长对线虫感染模型的影响 感染时长和加入抗菌药物的治疗时长是影响线虫生存率的关键因素,为确定最佳感染时长和治疗时长,设计线虫的感染时长分别为 3、6 和 9 h,清洗后在阳性对照孔加入 PB,观察最佳的治疗时长(见图 4)。Log-rank Test 显示,当感染 3 h 时,秀丽隐杆线虫几乎可以正常生存,没有达到较好的感染效果($\chi^2 = 3.154, P > 0.05$);当秀丽隐杆线虫分别被感染 6、9 h 时,对线虫生存率的影响差异无统计学意义($\chi^2 = 0.669, P > 0.05$),结合 XDR-AB 不同感染时长对线虫的致死能力和对实验进度的影响,最终选择 6 h 作为感染时长,同时选择 36 h 作为抗菌药物的药物干预时长,此时加入 PB 的阳性孔秀丽隐杆线虫生存良好,而阴性孔秀丽隐杆线虫基本已全部感染致死。

2.2 6 种 EPIs 对秀丽隐杆线虫的毒性作用 CCCP、NMP、PA β N、奥美拉唑、维拉帕米、利血平 6 种 EPIs 对秀丽隐杆线虫的毒性作用不同,其中当 CCCP 的浓度 $> 5 \mu\text{g/mL}$ 、PA β N 的浓度 $> 25 \mu\text{g/mL}$ 和利血平的浓度 $> 30 \mu\text{g/mL}$ 时,对秀丽

隐杆线虫开始出现明显的毒性作用,秀丽隐杆线虫生存率开始下降。见图 5。奥美拉唑、维拉帕米和 NMP 对秀丽隐杆线虫几乎都没有毒性作用,当浓度 $> 60 \mu\text{g/mL}$ 时秀丽隐杆线虫存活活跃状态下下降,浓度达 $80 \mu\text{g/mL}$ 对秀丽隐杆线虫生存率也没有影响。

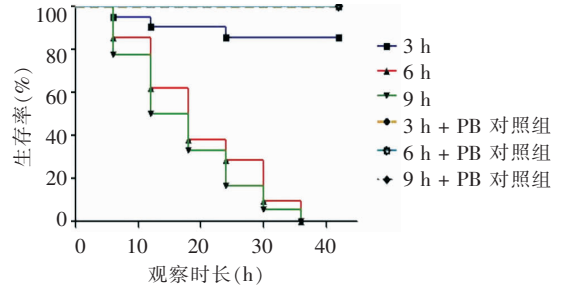
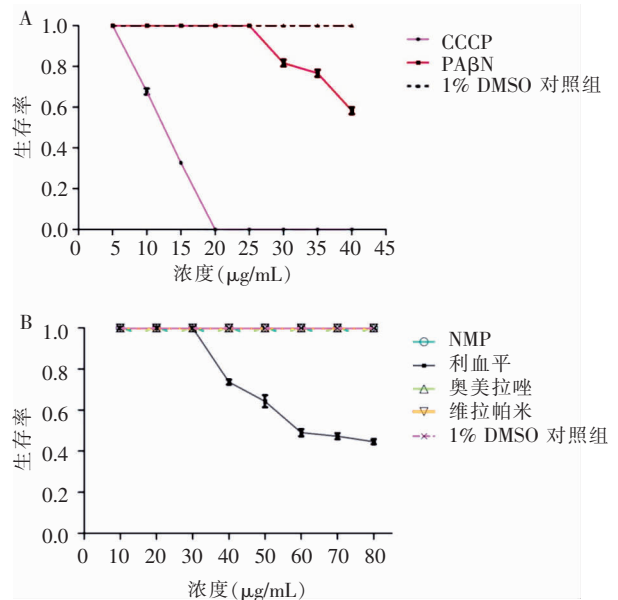


图 4 XDR-AB 不同感染时长与治疗时长生存曲线

Figure 4 Survival curves of *C. elegans* with different duration of XDR-AB infection and duration of treatment



A: CCCP、PA β N 对秀丽隐杆线虫的毒性试验; B: NMP、利血平、奥美拉唑和维拉帕米对秀丽隐杆线虫的毒性试验

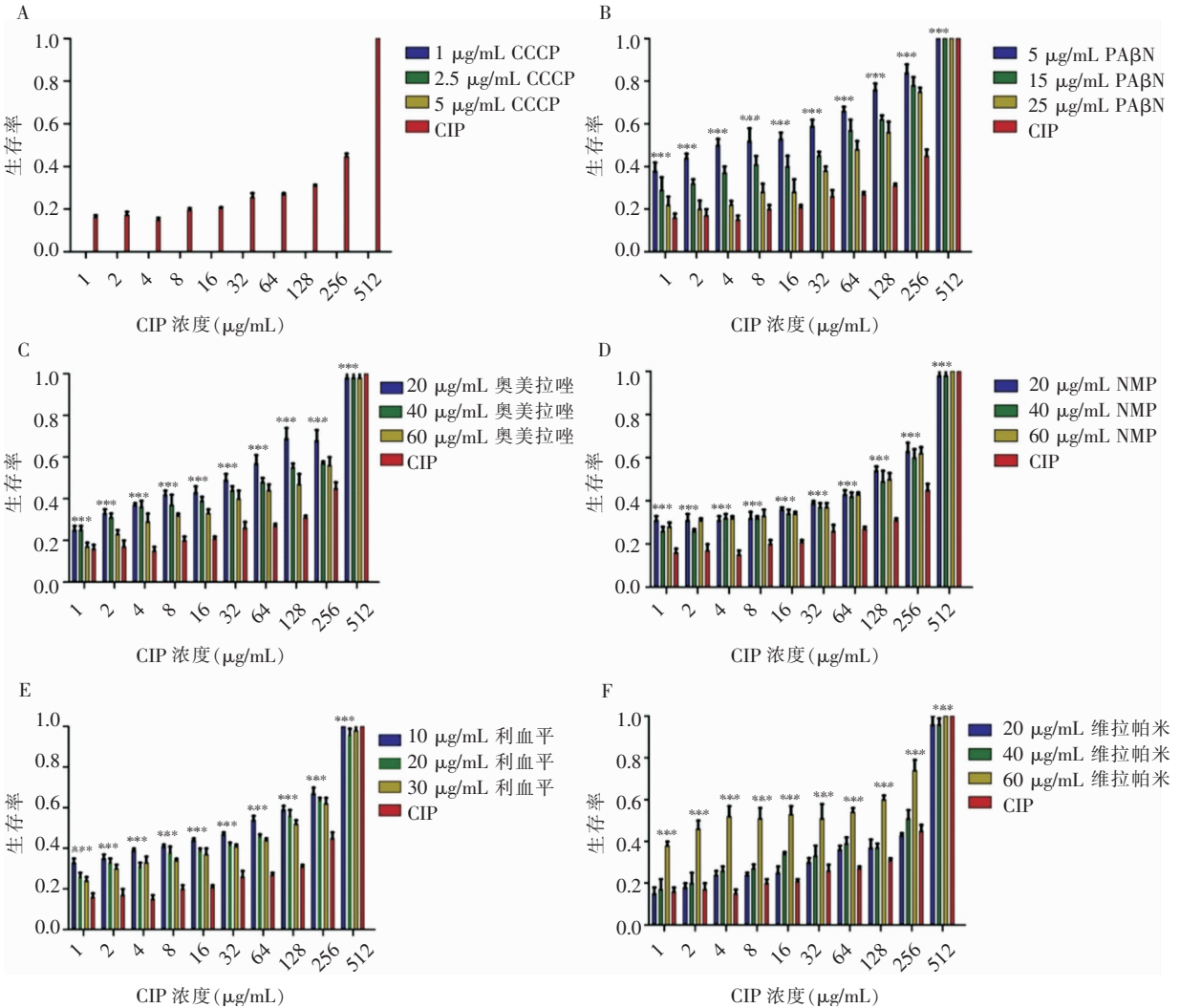
图 5 不同 EPIs 对秀丽隐杆线虫的毒性试验

Figure 5 Toxicity test of different EPIs on *C. elegans*

2.3 联合 EPI 前后抗菌药物盐酸环丙沙星的 MIC 值变化 单独使用盐酸环丙沙星时, MIC 值达 $256 \mu\text{g/mL}$; 单独使用 CCCP、PA β N 时, MIC 值为 $15, 30 \mu\text{g/mL}$, 单独使用 NMP、奥美拉唑、维拉帕米和利血平时对 XDR-AB 没有明显的抑菌作用。加入 CCCP、奥美拉唑、维拉帕米后, 盐酸环丙沙星的 MIC 值均下降至原来的 $1/4$ ($64 \mu\text{g/mL}$); 加入 PA β N、NMP、利血平后, 盐酸环丙沙星的 MIC 值均下降至原来的 $1/2$ ($128 \mu\text{g/mL}$)。

2.4 盐酸环丙沙星联合 EPIs 前后感染线虫的体内药效评价 加入治疗药物 30 h 后,不同浓度 EPIs 联合相应浓度的盐酸环丙沙星:除 CCCP 外,联合治疗效果均好于环丙沙星单用的效果。见图 6。其中 5、2.5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CCCP 联合盐酸环丙沙星,效果均不理想,秀丽隐杆线虫存活率几乎为零。PA β N 与盐酸环丙沙星联合后能提高盐酸环丙沙星在感染秀丽隐杆线虫体内的治疗作用,其中不同浓度的 PA β N 对联合效果差异具有统计学意义($P < 0.001$),PA β N 较低浓度时与盐酸环丙沙星有较好的联合作用($P < 0.001$),比单独使用盐酸环丙沙星时感染秀丽隐杆线虫的存活率可提高 30%~40%。不同浓度间的奥美拉唑联合盐酸环丙沙星对感染秀丽隐杆线虫的治疗效果差异具有统计学意义($P < 0.0001$),其中低浓度的奥美拉唑联合治疗

效果更好($P < 0.001$),比单独使用盐酸环丙沙星时感染秀丽隐杆线虫的存活率可提高 20%~30%。不同浓度的 NMP、利血平与盐酸环丙沙星联合治疗感染秀丽隐杆线虫时,联合效果差异无统计学意义($P > 0.05$),为减少药物浓度与 EPIs 联合使用带来潜在的毒性,选择低浓度 NMP(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与盐酸环丙沙星联合使用,感染秀丽隐杆线虫经治疗后存活率比单一用药提高 15%~20%($P < 0.001$);低浓度的利血平(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与盐酸环丙沙星联合使用后,感染秀丽隐杆线虫经治疗后存活率比单一用药提高 20%($P < 0.001$)。不同浓度的维拉帕米与盐酸环丙沙星联合使用时,高浓度维拉帕米的治疗作用较好($P < 0.001$),高浓度的维拉帕米(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与盐酸环丙沙星联合使用后,感染秀丽隐杆线虫的生存率能提高 30%左右。



注:A—F 分别为 CCCP、PA β N、奥美拉唑、NMP、利血平和维拉帕米;CIP:盐酸环丙沙星;***:各 EPI 与对照组比较, $P < 0.001$

图 6 6 种不同浓度 EPIs 与盐酸环丙沙星联合用药治疗 XDR-AB 感染秀丽隐杆线虫的药效分析

Figure 6 Pharmacodynamic effect of combination of 6 different concentrations of EPIs and ciprofloxacin hydrochloride on treatment of XDR-AB infection in *C. elegans*

3 讨论

本研究成功建立了低成本、高效率的秀丽隐杆线虫-泛耐药鲍曼不动杆菌感染模型,用于评价抗菌药物药效的可靠性和稳定性。相比传统固体琼脂平板上的试验,极大简化了线虫在不同培养板上反复接种、清洗和转移等试验程序,探究盐酸环丙沙星与 EPIs 合用时在在线虫模型上的治疗窗,为研究时选取安全有效的药物及药物浓度提供依据,也为之后筛选与研究其他抗菌药物提供依据。

线虫感染程度是模型成功建立的重要条件之一,本试验根据不同浓度下 XDR-AB 对线虫的感染致死时间及效果,最终确定 5×10^6 CFU/mL 作为感染浓度,结合鲍曼不动杆菌对线虫的致死能力和试验进度的影响,最终选择 6 h 作为感染时长,选择 36 h 作为抗菌药物的药物干预时长,初步建立 XDR-AB 感染秀丽隐杆线虫的感染模型。在鲍曼不动杆菌感染路径的追踪实验中,可观察到 XDR-AB 在肠道积聚定植,并可在肠道内扩散,使线虫整个生命过程持续感染,造成线虫感染致死。

对 6 种 EPI 进行毒性试验,体外药物敏感性试验测得所有药物的 MIC 值,得到环丙沙星及各 EPIs 对 XDR-AB 单独使用和联合使用时的体外抑菌效果,与体内抗菌效果形成对比,进一步研究治疗效果。CCCp 是一种抑制细菌细胞膜质子转运的强解偶联剂^[6, 10],CCCp 在体外的抑菌效果最佳,但进行体内秀丽隐杆线虫感染试验后,CCCp 与盐酸环丙沙星联合使用时秀丽隐杆线虫几乎无存活,考虑可能是因为联合使用加重了 CCCp 的药物毒性,加速秀丽隐杆线虫死亡。PA β N 通过结合外排泵相应位点,阻止其他底物与该位点的结合,减少药物的外排^[11-12]。35 μ g/mL 的 PA β N 可将盐酸环丙沙星的 MIC 值降低至 0.5 μ g/mL,安全范围内可将盐酸环丙沙星的 MIC 值降低至原来的 1/2,秀丽隐杆线虫体内模型筛选后,得到较低浓度 PA β N (5 μ g/mL) 联合盐酸环丙沙星治疗后可将秀丽隐杆线虫存活率提高 30%~40%,对盐酸环丙沙星的耐药性有较好的翻转效果。奥美拉唑是质子泵抑制剂 (proton pump inhibitors, PPIs) 的一种,临床上用于消化性溃疡的治疗,安全范围内可将盐酸环丙沙星的 MIC 值降低至原值的 1/4,但体内治疗在低浓度 (20 μ g/mL) 时效果更好,可将秀丽隐杆线虫生存率提高 20%~30%^[13-14]。NMP 体内感染秀丽隐杆线

虫的药效试验结果显示,不同浓度的 NMP 治疗效果差异无统计学意义,低浓度的 NMP (20 μ g/mL) 可将线虫的存活率提高 15%~20%^[15]。利血平和维拉帕米是 ATP 水解驱动型 EPI,在临床上有各自的适应证,利血平是一种吲哚型生物碱,临床上用于高血压的治疗,作为泵抑制剂,其本身也是某些外排泵的底物,可与抗菌药物竞争结合细菌外排泵蛋白^[16]。利血平在安全范围内的体外抑菌试验中,可将盐酸环丙沙星的 MIC 降低至原来的 1/2,用于体内感染秀丽隐杆线虫的治疗时,低浓度 (10 μ g/mL) 时可将秀丽隐杆线虫的存活率提高 20%,低浓度的 EPIs 发挥更好的翻转盐酸环丙沙星耐药性作用。维拉帕米属 IV 类抗心律失常药,安全范围内的维拉帕米可将盐酸环丙沙星的 MIC 降低至原来的 1/4,与其他 EPIs 不同的是,不同浓度的维拉帕米用于体内药效试验结果,高浓度的维拉帕米 (60 μ g/mL) 可将秀丽隐杆线虫存活率提高 30% 左右,高浓度的维拉帕米与盐酸环丙沙星有更好的联合治疗作用,但用于人体,仍需考虑尤其是对心脏、肝肾的毒性作用^[10]。体外药敏试验较好的药物在体内或许因为较大的毒性作用而不能用于临床,且 EPIs 在联合用药时发挥最好疗效翻转盐酸环丙沙星耐药性的浓度也有所不同,因此,不同的 EPIs 体内外试验结果存在差异。

综上所述,利用临床分离的 XDR-AB,成功建立秀丽隐杆线虫-鲍曼不动杆菌感染模型,用于体内治疗药物的活性筛选,可呈现出良好的量效关系,同时结合药物的毒性作用并与体外实验对比分析,探索发现新的、有效的抗菌药物,或通过翻转已有抗菌药物的耐药性,为解决细菌日益严重的耐药问题提供一个良好的思路和途径。

[参考文献]

- [1] Jayamani E, Rajamuthiah R, Larkins-Ford J, et al. Insect-derived cecropins display activity against *Acinetobacter baumannii* in a whole-animal high-throughput *Caenorhabditis elegans* model[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(3): 1728-1737.
- [2] Bardbari AM, Arabestani MR, Karamie M, et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates[J]. *Microb Pathog*, 2017, 108: 122-128.
- [3] Gholami M, Hashemi A, Hakemi-Vala M, et al. Efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide effect on the

- minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from hospitalized patients in Shahid Motahari Burn Hospital, Tehran, Iran[J]. Jundishapur J Microbiol, 2015, 8(10): e19048.
- [4] Maleki MH, Jalilian FA, Khayat H, et al. Detection of highly ciprofloxacin resistance *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with burn wound infections in presence and absence of efflux pump inhibitor[J]. Maedica (Buchar), 2014, 9(2): 162 - 167.
- [5] Ardebili A, Lari AR, Talebi M. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. Ann Lab Med, 2014, 34(6): 433 - 438.
- [6] Ardebili A, Talebi M, Azimi L, et al. Effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone on the minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(1): e8691.
- [7] Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 2015, 200(2): 387 - 407.
- [8] Conery AL, Larkins-Ford J, Ausubel FM, et al. High-throughput screening for novel anti-infectives using a *C. elegans* pathogenesis model[J]. Curr Protoc Chem Biol, 2014, 6(1): 25 - 37.
- [9] Moy TI, Ball AR, Anklesaria Z, et al. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(27): 10414 - 10419.
- [10] Ni W, Li Y, Guan J, et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug resistant Gram-negative bacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(5): 3215 - 3218.
- [11] Cortez-Cordova J, Kumar A. Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(5): 420 - 424.
- [12] Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e60666.
- [13] Yang Y, Chua KL. Assessment of the effect of efflux pump inhibitors on in vitro antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(3): 283 - 284.
- [14] Vidallac C, Guillon J, Arpin C, et al. Synthesis of omeprazole analogues and evaluation of these as potential inhibitors of the multidrug efflux pump NorA of *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(3): 831 - 838.
- [15] Aygül A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance[J]. Mikrobiyol Bul, 2015, 49(2): 278 - 291.
- [16] 周云, 凌保东. 4 种外排泵抑制剂对鲍曼不动杆菌耐药性的抑制影响[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(6): 461 - 466, 472.

(本文编辑:左双燕)