

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20218239

· 论 著 ·

RND 外排泵对多重耐药鲍曼不动杆菌 AYE 菌株生物被膜形成的影响

王清会^{1,2,3}, 蔺 飞⁴, 刘献清⁵, 凌保东^{1,2}

(1. 成都医学院结构特异性小分子药物研究 四川省高校重点实验室, 四川 成都 610500; 2. 成都医学院药学院, 四川 成都 610500; 3. 成都市金牛区人民医院 西药剂科, 四川 成都 610500; 4. 成都医学院临床医学院 第一附属医院药学部, 四川 成都 610500; 5. 广元市中医院临床药学办, 四川 广元 628099)

[摘 要] 目的 探讨多重耐药鲍曼不动杆菌 AYE 菌株 RND 外排泵基因影响生物被膜形成的作用机制。方法 采用无标记基因敲除方法分别敲除 AYE 菌株的 RND 外排泵基因(*adeB*、*adeFGH*、*adeIJK*), 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)验证菌株外排泵基因敲除情况, 通过结晶紫染色法检测菌株基因敲除前后生物被膜形成情况, 比较 4 种外排泵抑制剂(PA β N、奥美拉唑、维拉帕米、CCCP)对 AYE 菌株生物被膜形成的影响。结果 qRT-PCR 结果显示, AYE 菌株 RND 外排泵基因(*adeB*、*adeFGH*、*adeIJK* 基因)成功敲除, 获得 AYE Δ *adeB*、AYE Δ *adeFGH*、AYE Δ *adeIJK* 菌株, 生物被膜形成量分别为 1.59 \pm 0.06、2.15 \pm 0.19、1.91 \pm 0.02, 其中 *adeB* 和 *adeIJK* 基因敲除后菌株生物被膜形成量低于敲除前(AYE: 2.31 \pm 0.01), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。在 PA β N、奥美拉唑、维拉帕米、CCCP 作用下, 鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 的生物被膜形成量分别为 2.14 \pm 0.03、2.24 \pm 0.02、1.93 \pm 0.05、2.09 \pm 0.04, 均低于对照组(AYE: 2.31 \pm 0.01), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 其中 PA β N 形成量最少。结论 外排泵基因 *adeB*、*adeFGH*、*adeIJK* 对多重耐药鲍曼不动杆菌 AYE 生物被膜的形成有重要作用, 外排泵抑制剂 PA β N、奥美拉唑、维拉帕米、CCCP 对鲍曼不动杆菌 AYE 菌株生物被膜的形成有抑制作用。

[关 键 词] 鲍曼不动杆菌; 生物被膜; RND 外排泵; 外排泵抑制剂

[中图分类号] R181.3⁺2 R446.5

Effect of RND efflux pump on biofilm formation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* AYE strain

WANG Qing-hui^{1,2,3}, LIN Fei⁴, LIU Xian-qing⁵, LING Bao-dong^{1,2} (1. Research Institute of Structure-specific Small Molecule Drugs, Chengdu Medical College, Key Laboratory of Universities of Sichuan Province, Chengdu 610500, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 3. Department of Pharmacy, Chengdu Jinniu District People's Hospital, Chengdu 610500, China; 4. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College Clinical School, Chengdu 610500, China; 5. Clinical Pharmacy Office, Guangyuan City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangyuan 628099, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of resistance-nodulation-cell division (RND) efflux pump genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR-AB) AYE strain in influencing biofilm formation. **Methods** RND efflux pump genes (*adeB*, *adeFGH*, *adeIJK*) of *Acinetobacter baumannii* AYE strain were knocked out by marker-free gene knockout method, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was

[收稿日期] 2020-11-16

[基金项目] 国家自然科学基金(81373454)

[作者简介] 王清会(1991-), 女(汉族), 四川省成都市人, 硕士研究生, 主要从事鲍曼不动杆菌耐药机制研究。

[通信作者] 凌保东 E-mail: lingbaodong@cmc.edu.cn

used to verify the gene knockout of strain efflux pump genes, biofilm formation before and after gene knockout was detected by crystal violet staining, effect of 4 efflux pump inhibitors (PA β N, omeprazole, verapamil and CCCP) on biofilm formation of AYE strain was compared. **Results** qRT-PCR showed that RND efflux pump genes (*adeB*, *adeFGH*, *adeIJK* genes) of AYE strain were successfully knocked out, AYE Δ *adeB*, AYE Δ *adeFGH*, and AYE Δ *adeIJK* strains were obtained, the amount of biofilm formation was 1.59 ± 0.06 , 2.15 ± 0.19 and 1.91 ± 0.02 respectively, the amount of biofilm formation after *adeB* and *adeIJK* gene knockout was lower than that before knockout (AYE; 2.31 ± 0.01), difference were all statistically significant (all $P < 0.05$). Under the effect of PA β N, omeprazole, verapamil and CCCP, the amount of biofilm formation of standard strain AYE of *Acinetobacter baumannii* were 2.14 ± 0.03 , 2.24 ± 0.02 , 1.93 ± 0.05 and 2.09 ± 0.04 respectively, which were all lower than those in the control group (AYE; 2.31 ± 0.01), difference was statistically significant (all $P < 0.05$), PA β N formation was the least. **Conclusion** Efflux pump genes *adeB*, *adeFGH* and *adeIJK* play important role in the formation of biofilm of MDR-AB AYE, efflux pump inhibitors PA β N, omeprazole, verapamil and CCCP have an inhibitory effect on biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* AYE strain.

[**Key words**] *Acinetobacter baumannii*; biofilm; RND efflux pump; efflux pump inhibitor

鲍曼不动杆菌是一种机会性致人类感染病原体,在危重患者中易引起呼吸机、血液和留置装置感染等问题^[1],该病原体生物被膜的形成有助于医疗器械相关感染及感染持续^[2],同时生物被膜的形成使其耐药性与致病性大幅度增强^[3],导致持续性感染与反复感染的出现^[4-6],使治疗感染面临巨大的挑战。研究^[7-8]表明,生物被膜的形成与外排泵系统、群体感应系统、胞外多糖等相关。本文重点探讨多重耐药鲍曼不动杆菌 AYE 杆菌 RND 外排泵基因影响生物被膜形成的作用机制。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE,以及 RND 外排泵基因敲除 AYE 菌株(分别为 AYE Δ *adeB*、AYE Δ *adeFGH*、AYE Δ *adeIJK*),均为本实验室留存,并对其进行验证。

1.2 试验仪器及试剂信息

1.2.1 试验仪器 恒温培养箱(上海一恒科技有限公司)、生物安全柜(Thermo Fisher Scientific)、恒温摇床(Thermo Fisher Scientific)、酶标仪(SpectraMa190)、荧光定量 PCR 仪(biorad)、正置显微镜(Thermo Fisher Scientific)、96 孔细胞培养板(科兹莫生物科技有限公司)等。

1.2.2 试剂信息 胰酪大豆胨液体培养基和 CAMHB 肉汤培养基(购自青岛海博生物技术有限公司),维拉帕米(购自大连美仑生物公司),奥美拉

唑(购自源叶生物),二甲基亚砜(购自成都市科龙化工试剂厂),PA β N 和 CCCP(购自上海皓元生物医药科技有限公司),PBS 和 RNA 提取试剂盒(购自生工生物)、逆转录试剂盒和荧光染料 SYBR Premix Ex Taq II(购自诺维赞)。

1.3 试验方法

1.3.1 基因敲除 使用无标记基因敲除方法^[9]分别敲除鲍曼不动杆菌 AYE 菌株 RND 外排泵基因 *adeB*、*adeFGH*、*adeIJK* 基因,具体方法参考文献[10]。构建应敲除基因的上下游同源序列,以 NotI 和 BamHI 双酶切后插入自杀性载体 pMo130-Telr,进行热击转化,将携带同源片段的自杀式载体转入电转感受态菌株 47055,与标准菌株 AYE 混合浓集于 NC 膜上,然后进行筛选鉴定,直至筛选出对应敲除基因突变株,进行测序及实时定量确认。

1.3.2 验证基因敲除情况 用实时定量聚合酶链反应^[11](qRT-PCR)验证 AYE 菌株 RND 外排泵基因敲除情况。引物序列见表 1。提取 AYE 菌株及基因敲除菌株 RNA,并逆转录成 cDNA,一式三份测定外排泵基因 *adeB*、*adeG*、*adeJ* 的表达水平。实时定量(qRT)-PCR 在 10 μ L 总反应体积中进行(2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μ L,引物正向、反向各 0.2 μ L, cDNA 0.5 μ L, ddH₂O 4.1 μ L),qRT-PCR 的循环过程如下:95 $^{\circ}$ C 30 s,然后 95 $^{\circ}$ C 5 s 循环 40 次,60 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 20 s。管家基因 16S rRNA 作为内参,靶基因表达水平的倍数变化由 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算^[12]。

表 1 qRT-PCR 检测外排泵基因表达引物及产物长度

Table 1 Primers and length of products for qRT-PCR detection of efflux pump gene expression

引物名称	引物序列	产物长度 (bp)
16S rRNA 正向	CAGCTCGTGTGTCGAGATGT	150
	反向	
adeB 正向	AAAGGTATTGGCTACGAGTGG	132
	反向	
adeG 正向	GCGTTGCTGTGACAGATGTT	104
	反向	
adeJ 正向	GGTCATTAATATCTTTGGC	222
	反向	

1.3.3 外排泵抑制剂对菌株 AYE 生物被膜形成的影响 4 种外排泵抑制剂包括 PAβN、奥美拉唑、维拉帕米、CCCP, 其中 PAβN、奥美拉唑、维拉帕米的 MIC 值均 > 512 μg/mL, CCCP MIC 值为 16 μg/mL。最终选择不影响细菌生长的最大浓度, PAβN、奥美拉唑、维拉帕米为 1/4 最低抑菌浓度 (MIC) (128 μg/mL), CCCP 为 1/2 MIC (8 μg/mL)。

1.3.4 生物被膜形成试验 使用结晶紫染色法^[13]测定鲍曼不动杆菌生物被膜形成情况: 以标准菌株 AYE 作为对照菌株, 每个菌株设置 6 个复孔, 用 0.9% 生理盐水调整其光学密度为 OD₆₀₀ = 0.1, 接种到 96 孔细胞培养板中, 培养板在 37℃ 静置培养 24 h。用 PBS 清洗 3 遍去除浮游细菌, 静置 30 min 使 96 孔板晾干; 每孔加入 200 μL 0.1% 结晶紫, 染色 15 min。将结晶紫轻轻吸出, 每孔用无菌 PBS 轻轻洗 3 次, 静置 30 min 使 96 孔板晾干; 在每孔中加入 200 μL 95% 的乙醇溶液, 静置 15 min, 使结晶紫完全溶解, 测定 OD₅₇₀。

1.4 统计分析 应用 SPSS 20.0 和 Graphpad Prism 8.0.2 软件对数据进行统计分析和作图, 定量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验进行统计分析, *P* ≤ 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因敲除情况 qRT-PCR 检测 AYE 菌株 RND 外排泵基因 *adeB*、*adeFGH*、*adeIJK* 基因均成

功敲除, 获得 AYEΔ*adeB*、AYEΔ*adeFGH*、AYEΔ*adeIJK* 菌株。以 16S rRNA 基因作为内参基因, 鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 的 RND 外排泵基因敲除前后的表达情况, AYE 菌株 RND 外排泵基因敲除菌株 AYEΔ*adeB*、AYEΔ*adeFGH*、AYEΔ*adeIJK* 对应基因已经成功敲除。见图 1。

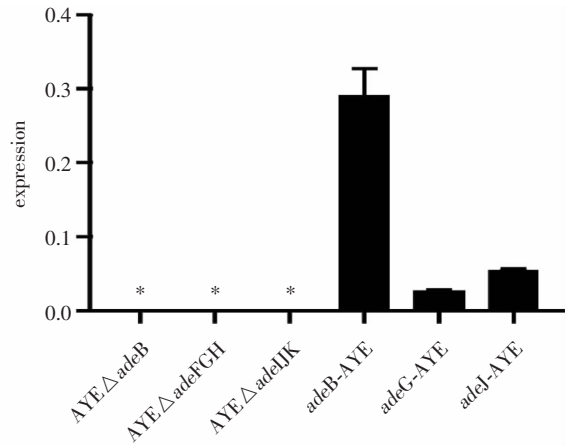
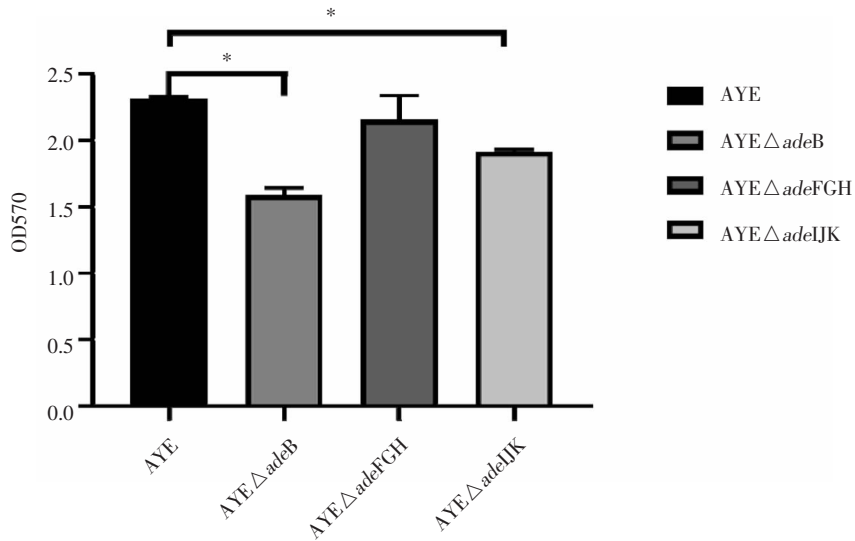


图 1 鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 外排泵基因敲除后相关基因表达情况

Figure 1 Expression of related genes after knockout of efflux pump genes of *Acinetobacter baumannii* standard strain AYE

2.2 外排泵基因敲除菌株 AYE 生物被膜形成情况 外排泵基因敲除后 AYEΔ*adeB*、AYEΔ*adeFGH*、AYEΔ*adeIJK* 菌株生物被膜形成量分别为 1.59 ± 0.06 、 2.15 ± 0.19 、 1.91 ± 0.02 , 其中外排泵基因 *adeFGH* 敲除后生物被膜形成量与敲除前 (AYE: 2.31 ± 0.01) 相比, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05), *adeB* 和 *adeIJK* 基因敲除后生物被膜形成量低于敲除前 (AYE: 2.31 ± 0.01), 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05)。见图 2。

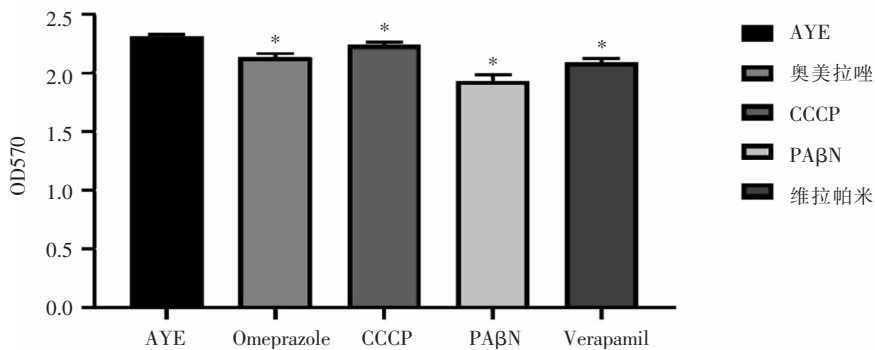
2.3 外排泵抑制剂对鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 生物被膜形成的影响 在 4 种外排泵抑制剂作用下, 鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 的生物被膜形成量 (PAβN、奥美拉唑、维拉帕米、CCCP 分别为 2.14 ± 0.03 、 2.24 ± 0.02 、 1.93 ± 0.05 、 2.09 ± 0.04) 均低于对照组 (AYE: 2.31 ± 0.01), 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05), 其中 PAβN 形成量最少。见图 3。



* :表示 $P < 0.05$ 。

图 2 鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 外排泵基因敲除菌株生物被膜形成情况

Figure 2 Biofilm formation of efflux pump gene knockout strains of *Acinetobacter baumannii* standard strain AYE



* :表示 $P < 0.05$ 。

图 3 4 种外排泵抑制剂对鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 生物被膜形成的影响

Figure 3 Effect of 4 efflux pump inhibitors on biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* standard strain AYE

3 讨论

生物被膜是附着在生物或者非生物表面的复杂微生物群落,其产生主要涉及四个阶段^[14],第一阶段:初始黏附,细菌细胞凭借其动力系统附着在物体表面;第二阶段:形成微菌落;第三阶段:生物被膜的生长和成熟;第四阶段:细菌细胞的释放。生物被膜的附着由菌毛系统介导,随着微菌落的形成,开始产生群体感应(quorum-sensing, QS)信号因子^[15],同时胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)、淀粉样纤维、脂质和核酸等共同构成了生物被膜的细胞外基质,这些因素共同影响着生物被膜的形成与成熟。外层的胞外多糖,为生物被膜的产生和持续提供了物理屏障, QS 是一种细胞间的通信机制,可以根据细胞密度同步生物被膜相关基因的表达^[16]。同时由于

外排泵能够减少生物被膜内部代谢废物的积累与细菌密度的增加。研究^[17-18]表明,外排泵在一定程度上影响着生物被膜的形成。

鲍曼不动杆菌耐药性形成过程中 RND 外排泵发挥着重要作用^[19-20]。比较鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 的外排泵基因 *adeB*、*adeFGH*、*adeIJK* 敲除前后生物被膜形成情况,结果表明, AYE Δ *adeB*、 AYE Δ *adeIJK* 生物被膜形成量明显降低,而 AYE Δ *adeFGH* 生物被膜形成降低量与对照组相比差异无统计学意义。

在 4 种外排泵抑制剂作用下,鲍曼不动杆菌标准菌株 AYE 的生物被膜形成量均有不同程度降低,其中 PA β N 的降低效果最明显。PA β N 是一种广谱的外排泵抑制剂^[21],与 *adeB* 外排蛋白相结合, PA β N 利用远端结合袋中 Phe 残基形成的疏水微环境,使结合单体保持结合构象,防止外排泵挤出任何

其他底物,从而导致泵的多重抑制。CCCP 为质子动力解偶联剂^[22],奥美拉唑为 H⁺-K⁺-ATP 酶(又称质子泵)抑制剂,主要通过破坏跨膜电化学梯度,从而阻断外排泵能量来源,影响药物的外排;维拉帕米与膜糖蛋白结合发挥作用,但其逆转活性不强。4 种外排泵抑制剂通过不同的作用机制对外排泵进行抑制后对生物被膜形成的影响程度也不尽相同,其中 PA β N 作为广谱外排泵抑制剂对生物被膜的抑制作用最明显,其次为维拉帕米、奥美拉唑和 CCCP 4 种外排泵抑制剂均能使生物被膜形成减少。

综上所述,外排泵基因 *adeB*、*adeFGH*、*adeIJK* 对多重耐药鲍曼不动杆菌 AYE 生物被膜的形成有重要作用,外排泵抑制剂 PA β N、奥美拉唑、维拉帕米、CCCP 对鲍曼不动杆菌 AYE 生物被膜的形成有不同程度的抑制作用。由于本文仅对外排泵相关基因进行敲除与检测,未对生物被膜的其他影响因素,如 QS 系统、EPS 等进行深入的研究,有一定的局限性,但外排泵基因敲除后生物被膜的减少表明外排泵基因在生物被膜形成中的重要作用,且外排泵抑制剂对生物被膜形成的抑制作用为临床鲍曼不动杆菌生物被膜相关治疗提供了一种新的思路。

[参考文献]

- [1] Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(2): 91-102.
- [2] Del Pozo JL. Biofilm-related disease[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2018, 16(1): 51-65.
- [3] 蔺飞, 杜冰洁, 高灿, 等. 鲍曼不动杆菌生物被膜对抗菌药物耐药性的影响[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(1): 1-5.
- [4] Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS, et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis[J]. PLoS Biol, 2018, 16(10): e2006872.
- [5] Cepas V, López Y, Muñoz E, et al. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria[J]. Microb Drug Resist, 2019, 25(1): 72-79.
- [6] Greene C, Vadlamudi G, Newton D, et al. The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Am J Infect Control, 2016, 44(5): e65-e71.
- [7] Kardan-Yamchi J, Kazemian H, Haeili M, et al. Expression analysis of 10 efflux pump genes in multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 17: 201-208.
- [8] El-Shaer S, Shaaban M, Barwa R, et al. Control of quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* using phenylalanine arginyl β -naphthylamide[J]. J Med Microbiol, 2016, 65(10): 1194-1204.
- [9] Amin IM, Richmond GE, Sen P, et al. A method for genera-

ting marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 158.

- [10] 刘献清, 蔺飞, 彭勤, 等. 鲍曼不动杆菌耐药结缔组织细胞分化家族外排泵基因对耐药性的影响[J]. 成都医学院学报, 2019, 14(5): 551-556.
- [11] Zhang TT, Wang M, Xie YX, et al. Active efflux pump *adeB* is involved in multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* induced by antibacterial agents[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(4): 1538-1546.
- [12] Lin F, Xu Y, Chang YW, et al. Molecular characterization of reduced susceptibility to biocides in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1836.
- [13] Xu ZB, Liang YR, Lin SQ, et al. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification[J]. Curr Microbiol, 2016, 73(4): 474-482.
- [14] Tolker-Nielsen T. Biofilm development[J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(2): MB-0001-2014.
- [15] 涂春田, 汪洋, 易力, 等. 信号分子调控细菌生物被膜形成的分子机制[J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 558-566.
- [16] Solano C, Echeverez M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing[J]. Curr Opin Microbiol, 2014, 18: 96-104.
- [17] Tang MR, Wei X, Wan X, et al. The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microb Pathog, 2020, 147: 104244.
- [18] Bay DC, Stremick CA, Slipski CJ, 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.
- [19] Yang YS, Chen HY, Hsu WJ, et al. Overexpression of AdeABC efflux pump associated with tigecycline resistance in clinical *Acinetobacter nosocomialis* isolates[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(4): 512.e1-512.e6.
- [20] Wiczorek P, Sacha P, Hauschild T, et al. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*—the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(3): 257-267.
- [21] Leus IV, Weeks JW, Bonifay V, et al. Substrate specificities and efflux efficiencies of RND efflux pumps of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Bacteriol, 2018, 200(13): e00049-18.
- [22] Jamshidi S, Sutton JM, Rahman KM. Computational study reveals the molecular mechanism of the interaction between the efflux inhibitor PA β N and the AdeB transporter from *Acinetobacter baumannii*[J]. ACS Omega, 2017, 2(6): 3002-3016.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:王清会, 蔺飞, 刘献清, 等. RND 外排泵对多重耐药鲍曼不动杆菌 AYE 菌株生物被膜形成的影响[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(10): 876-880. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20218239.

Cite this article as: WANG Qing-hui, LIN Fei, LIU Xian-qing, et al. Effect of RND efflux pump on biofilm formation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* AYE strain[J]. Chin J Infect Control, 2021, 20(10): 876-880. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20218239.