

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.09.005

• 论 著 •

阿奇霉素上调生物被膜阳性铜绿假单胞菌 I 类整合酶基因的表达

曾邦伟¹, 陈建森¹, 潘玉红¹, 吴湘燕²

(1 福建医科大学附属协和医院, 福建 福州 350001; 2 福建医科大学, 福建 福州 350108)

[摘要] **目的** 探讨阿奇霉素对生物被膜(BF)阳性铜绿假单胞菌(PA) I 类整合酶基因 (*intI1*) mRNA 表达量的影响。**方法** 对某院临床分离的 10 株 PA 进行 *intI1* 基因检测, 选择其中 1 株 BF + *intI1* 基因阳性的 PA 进行培养, 并设空白对照组和阿奇霉素处理组(按阿奇霉素浓度不同分为 3 个浓度组, 分别为 16、32、64 mg/L 组), 重复试验 5 次, 采用荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测其 *intI1* mRNA 的表达情况。**结果** 16 mg/L 阿奇霉素组、32 mg/L 阿奇霉素组、64 mg/L 阿奇霉素组和对照组 *intI1* mRNA 相对表达量分别为 (1.15 ± 0.04) 、 (12.47 ± 3.10) 、 (19.71 ± 0.78) 和 (1.00 ± 0.00) , 各组间比较, 差异有统计学意义 ($F = 163.82, P < 0.001$); 组间两两比较, 除低浓度阿奇霉素组(16 mg/L)与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, 其他各组间比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 阿奇霉素组 *intI1* mRNA 表达量随培养液中阿奇霉素浓度升高而升高。**结论** 在阿奇霉素压力下 BF 阳性的 PA, *intI1* 表达有所上调, 可提高耐药基因的捕获概率, 促进耐药基因重组。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 生物被膜; I 类整合酶; 阿奇霉素; 抗药性; 微生物; 抗菌药物

[中图分类号] R378.99⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)09-0597-04

Azithromycin up-regulated class I integron-integrase gene expression in biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*

ZENG Bang-wei¹, CHEN Jian-sen¹, PAN Yu-hong¹, WU Xiang-yan² (1 Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China; 2 Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of azithromycin on class I integron-integrase gene (*intI1*) mRNA expression in biofilm-forming (BF) *Pseudomonas aeruginosa* (PA). **Methods** *intI1* of 10 PA strains isolated from a hospital were detected, 1 strain with positive BF + *intI1* was selected for culture, blank control group and three azithromycin trial groups (divided according to 3 concentrations; 16 mg/L, 32 mg/L, and 64 mg/L) were set, experiments were repeated 5 times, expression of *intI1* mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Relative expression of *intI1* mRNA in azithromycin groups of 16 mg/L, 32 mg/L, 64 mg/L, and control group were (1.15 ± 0.04) , (12.47 ± 3.10) , (19.71 ± 0.78) , and (1.00 ± 0.00) , respectively, there were significant difference among four groups ($F = 163.82, P < 0.001$); *intI1* mRNA expression between 16mg/L azithromycin group and control group was not significantly different ($P > 0.05$), but among other groups were significantly different ($P < 0.05$), *intI1* mRNA expression in azithromycin groups increased with the enhancing concentration of azithromycin in culture solution. **Conclusion** Expression of *intI1* gene mRNA in BF PA can be up-regulated by the present of azithromycin, which may improve the probability of drug-resistant genes, and promote drug-resistant gene recombination.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm; class I integron-integrase gene; azithromycin; drug resistance, microbial; antimicrobial agent

[Chin Infect Control, 2015, 14(9): 597-600]

[收稿日期] 2015-06-15

[基金项目] 福建省卫生厅青年基金(2012-2-41); 中华医院感染控制研究基金(ZHYG2014-0010)

[作者简介] 曾邦伟(1977-), 男(汉族), 福建省福州市人, 主要从事医院感染流行病学、生物被膜、医院感染信息化研究。

[通信作者] 曾邦伟 E-mail: fallwin163@163.com

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是医院感染的重要病原菌之一,极易产生耐药。特别是多重耐药 PA 往往导致患者严重感染,威胁其生命安全^[1]。PA 耐药除与其本身获得产酶耐药基因有关外,还与生物被膜(biofilm, BF)的形成密切相关^[2]。BF 指细菌不可逆地黏附在物体表面或其本身细胞之间相互黏附,并被其自身所分泌的细胞外基质包裹而形成的特殊结构。BF 中细菌的生物学性状与相应的浮游菌不同,其环境适应能力更强,耐药性明显增加。由于 BF 中的细菌密切接触,细菌间的耐药基因传播更加容易^[3]。BF 细菌间的耐药基因传递需借助于相应的载体。I 类整合子是耐药基因的重要载体,位于细菌染色体、质粒或转座子上,是细菌固有的一种遗传单位;I 类整合酶由 I 类整合酶基因(class 1 integron-integrase gene, *intI1*)编码, I 类整合子可在 I 类整合酶的作用下整合外源性基因,使之转变为功能性基因,从而使多重耐药基因在细菌间水平传播。研究在抗菌药物压力下 BF 中的细菌 *intI1* 的表达情况,对明确 BF 中耐药基因传播机制具有重要意义。本研究以 I 类整合酶为研究对象,应用荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)分析在不同抑菌浓度阿奇霉素压力下 BF 中 PA 的 *intI1* mRNA 表达差异,探讨 BF 中 I 类整合子在 PA 耐药基因水平传播中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 福建医科大学附属协和医院临床分离的 10 株 PA。

1.2 主要试剂及仪器 细菌基因组提取试剂盒(TIANGEN)、2×Taq PCR Master MIX、DNA 胶回收试剂盒和 TRNzol 总 RNA 提取试剂,均购自北京天根生物科技有限公司(TIANGEN);PrimeScript RT reagent Kit 逆转录试剂盒购自大连宝生物有限公司(TaKaRa);GoTaq qPCR Master Mix 荧光定量试剂盒购自 Promega 公司。StepOne Real-Time PCR System 为美国应用生物有限公司产品(Applied Biosystems),凝胶成像分析系统为法国 VL 公司产品,荧光显微镜为日本 NIKON 公司产品。

1.3 *intI1* 基因扩增与鉴定

1.3.1 DNA 模板制备 将 10 株 PA 分别接种于 LB 培养基,37℃ 250 r/min 震荡培养过夜。吸取 1 mL 菌液 3 000g 离心 10 min,弃上清,用无菌 PBS

洗涤 1 次,离心后弃上清。取沉淀按细菌基因组提取试剂盒说明书提取基因组,-20℃ 保存备用。

1.3.2 *intI1* PCR 扩增 采用 25 μL 反应体系:2×PCR Master MIX 12.5 μL, DNA 模板 2 μL, *intI1* 上游引物(5'-GCCTTGCTGTTCTTCTACG-GC-3') 和 下游 引 物 (5'-TCGTGCCGT-GATCGAAATC-3') 引物各 1 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。扩增循环参数为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用含溴化乙锭(EB)的 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.3.3 *intI1* 基因序列 提取 PCR 产物目的片段,按胶回收试剂盒说明书进行纯化回收,送上海 Invitrogen 公司测序,所得测序结果利用 NCBI 在线软件进行同源性比对。

1.4 BF PA 的培养与观察

1.4.1 BF PA 培养 取 *intI1* 阳性菌株 1 株,设对照组(LB 培养液)、阿奇霉素处理组(分别含有 16、32、64 mg/L 阿奇霉素的 LB 培养液)共 4 组,分别取 30 μL 过夜培养的菌液接种于含有 3 mL 上述培养液的 6 孔平底组织培养板中,37℃ 静止培养,并分别于第 2、4、6 天换液;7 d 后,用无菌 PBS 冲洗 6 孔板,然后用细胞刮刀刮取 BF 菌。将收集的被膜菌在漩涡振荡器上将菌体打散,PBS 洗涤,保存于 -20℃ 备用。

1.4.2 BF 的观察 将硅胶片放入 6 孔平底组织培养板,用上述方法进行 BF 培养,7 d 后取出硅胶片,在无菌生理盐水中漂洗 3 次,去除浮游菌;2.5% 戊二醛固定,pH 7.4 PBS 漂洗 3 次,分别用 50%、70%、80% 和 90% 乙醇浸泡 10 min,用 100% 乙醇浸泡脱水 3 次,每次 10 min,二氧化碳临界点干燥,真空条件下离子镀膜仪镀金,在扫描电镜下观察。

1.5 荧光定量 RT-PCR 检测 *intI1* mRNA 表达

1.5.1 PA 总 RNA 提取 使用 TRNzol 试剂盒提取 BF 菌总 RNA,采用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度,-70℃ 保存备用。

1.5.2 cDNA 合成 总体积为 10 μL 的反应体系中加入总 RNA 样品 500 ng,5×PrimeScript Buffer 2 μL,PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5 μL,Random 6mers 0.5 μL,补充 RNase Free ddH₂O 至 10 μL,混匀,置 37℃ 反应 15 min,85℃ 变性 5 s,4℃ 骤冷。合成的 cDNA 置于 -20℃ 保存待用。

1.5.3 荧光定量 RT-PCR 自行设计 *intI1* 上游引物(5'-GCCTTGCTGTTCTTCTACGGC-3')、

下游引物 (5'-TCGTGCCGTGATCGAAATC-3') 和 16sRNA 内参照上游引物 (5'-GGAGGAAGGTGGGGATGACG-3')、下游引物 (5'-ATGGTGTGACGGGCGGTGTG-3'), 预期扩增片段大小均为 241 bp。引物由 Invitrogen 公司合成, iPAGE 纯化。荧光定量 RT-PCR 反应体系为 20 μ L, 其中含 cDNA 模板 2 μ L (50 ng), 上、下游引物各 0.4 μ L (终浓度 10 μ mol/L), GoTaq qPCR Master Mix 10 μ L, CXR 100 \times 0.2 μ L, Nuclease-Free Water 补足至 20 μ L。反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 40 次, 于退火阶段收集荧光信号; 最后运行熔解曲线分析程序。每组样本重复检测 5 次。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计分析软件, 采用方差分析对各组 *intI1* mRNA 相对表达量差异进行统计分析, SNK 法进行组间均值比较, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *intI1* 扩增与鉴定 PCR 扩增结果显示, 4 株 PA 可见目的片段条带。将目的条带测序后进行 Blast 比对, 结果显示均为 *intI1*。选择 1 株 *intI1* 阳性 PA 进行下一步试验。

2.2 BF 观察 扫描电镜显示: 细菌聚集成团, 形成 BF。见图 1。

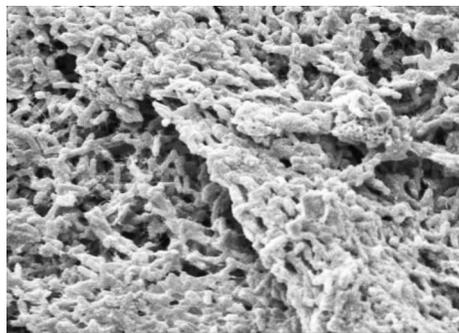


图 1 扫描电镜观察 PA BF (5 000 \times)

Figure 1 BF of PA observed by scanning electron microscope (5 000 \times)

2.3 RNA 质量分析 提取的 BF 菌总 RNA A260:A280 在 1.8~2.0 之间, 琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶成像分析可见 23S 和 16S 两条明显的条带, 提取总 RNA 质量较好, 无明显降解。

2.4 *intI1* 基因的表达 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线显示, 内参照 16s rRNA 和 *intI1* cDNA 均得到有效扩增。见图 2。熔解曲线无非特异性峰出现, 说明 16s rRNA 和 *intI1* 基因扩增具有特异性。见图 3。*intI1* mRNA 相对表达量经方差分析结果显示, 各组间比较, 总体差异有统计学意义 ($F = 163.82, P < 0.001$); 组间两两比较, 低浓度阿奇霉素组 (16 mg/L) 与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 其他各组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 阿奇霉素组 *intI1* mRNA 表达量较对照组高, 且随着培养液中阿奇霉素浓度增加而增加。见表 1。

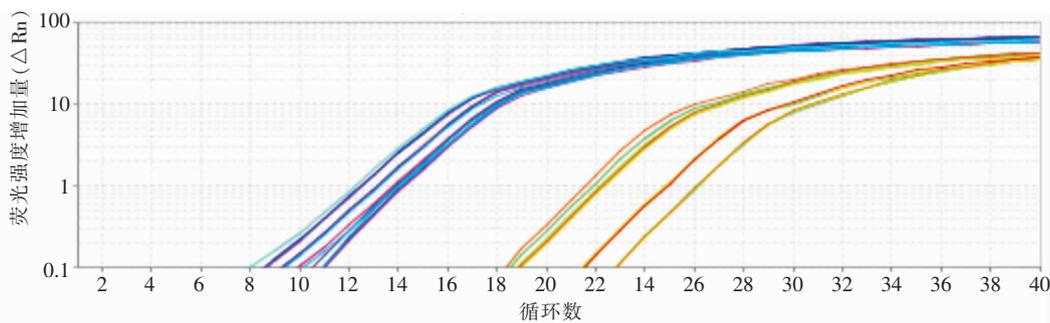


图 2 *intI1* mRNA 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线图

Figure 2 Fluorescence quantitative RT-PCR curve of *intI1* mRNA

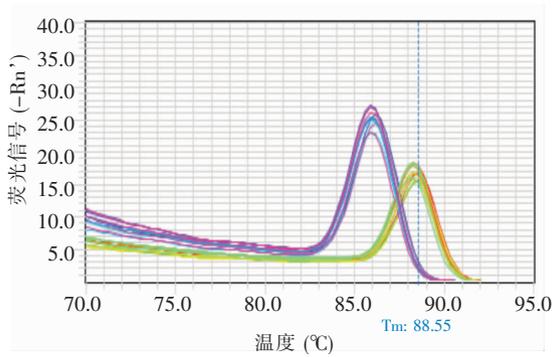


图 3 溶解曲线分析

Figure 3 Melting curve analysis

表 1 各组 *intI1* mRNA 相对表达结果

Table 1 Relative expression of *intI1* mRNA in each group

组别	重复次数	相对表达量
阿奇霉素组 (16 mg/L)	5	1.15 ± 0.04
阿奇霉素组 (32 mg/L)	5	12.47 ± 3.10
阿奇霉素组 (64 mg/L)	5	19.71 ± 0.78
对照组	5	1.00 ± 0.00

3 讨论

BF 是一个具有结构性、协调性和功能性的高度组织群体。BF 一旦形成,其内的细菌对抗菌药物耐药性显著升高。研究表明,被膜深层细菌对抗菌药物的抗性最高可达浮游细菌的 1 000 倍,提示 BF 中的细菌不同于浮游菌的耐药特性是建立在 BF 多细胞集聚结构基础上^[4],生物膜的形成可能增加细菌耐药性的水平传递^[5]。

本研究使用含有不同浓度阿奇霉素的培养液进行 PA BF 培养,结果显示,加入含有阿奇霉素培养液的 BF 菌 *intI1* mRNA 表达量较对照组高,且随着阿奇霉素浓度增加其转录水平也相应增加。国外相关研究显示,BF 中 PA 的基因表达不同于浮游菌^[6-7],PA BF 在抗菌药物压力下,可能通过群体感应系统的信号分子进行交流,上调 *intI1* 的 mRNA

表达,提高整合酶对耐药基因的捕获概率,并将其重组到耐药基因盒中,有利于细菌多重耐药性的形成。国内相关研究^[8-9]也显示,I 类整合子与 PA 多重耐药具有相关性。这种耐药基因的交换传播,可有助于菌体生存^[2]。本研究尚未涉及不同抗菌药物压力下不同耐药表型 PA BF 菌 *intI1* mRNA 转录水平是否存在差异,这有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Souli M, Galani L, Gianmarelou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe[J]. Euro Surveill, 2008,13(47). pii: 19045.

[2] Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients[J]. Curt Opin Pediatr, 2007,19(1):83-88.

[3] González JE, Keshavan ND. Messing with bacterial quorum Sensing[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(4): 859-875.

[4] 吴玉秀,葛新,靳颖,等. 尿路致病性大肠埃希菌生物膜形成与耐药性的关系[J]. 中国感染控制杂志, 2014, 10(6): 405-408.

[5] Kirisits MJ, Parsek MR. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? [J] Cell Microbiol, 2006,8(12):1841-1849.

[6] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005, 21: 319-346.

[7] Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter sp.* strain BD413 biofilms [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3):1721-1727.

[8] 黄震,陈文胜,余治健,等. I 类整合子与铜绿假单胞菌多重耐药相关性研究[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(3):165-168.

[9] 吴长生,伍严安,余菲菲,等. 铜绿假单胞菌整合子及其基因盒与耐药性的相关性研究[J]. 福建医科大学学报, 2011, 45(5): 355-359.

(本文编辑:周鹏程)