

• 论 著 •

## 肺炎克雷伯菌多重耐药性与基因 PBP2、PBP3 的相关性研究\*

闫晓煜, 肖创清<sup>△</sup>

(中国人民解放军 163 医院检验科, 长沙 410003)

**摘要:**目的 探讨 PBP2、PBP3 基因在肺炎克雷伯菌对不同药物耐药中的作用与机制。方法 收集该院 2014 年 4 月至 2015 年 4 月各科室临床标本中分离的非重复肺炎克雷伯菌 203 株, 采用全自动微生物分析系统对菌株进行鉴定及药敏检测, 提取细菌基因组 DNA, 用 PCR 扩增 PBP2、PBP3 产物并进行电泳, RT-PCR 检测 PBP2、PBP3 的表达。结果 203 株肺炎克雷伯菌中  $\beta$ -内酰胺类药物耐药 105 株(51.7%), 敏感 88 株, 对亚胺培南、美罗培南耐药率分别为 5.4%、3.9%; PCR 扩增产物的电泳条带中 PBP2 与 PBP3 基因阴性 18 株, 阳性 185 株, 但不平行, 分别有各自的阴、阳性菌株; PBP2、PBP3 与 KP 多重耐药性无显著相关( $P=0.295, 0.628$ )。PBP2 与碳青霉烯类药物无显著相关( $P=0.637$ ); PBP3 与碳青霉烯类药物存在显著相关, 但相关系数不高( $P=0.041, r=0.148$ ); 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的 PBP2、PBP3 逆转录后扩增产物电泳条带与 16SrRNA 扩增产物电泳条带的灰度比值进行统计学检验, 其差异均无统计学意义(PBP2:  $P=0.331$ , PBP3:  $P=0.383$ )。结论 基因 PBP2、PBP3 与肺炎克雷伯菌多重耐药性之间可能无显著相关。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 多重耐药性; PBP2; PBP3

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.14.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)14-1873-04

Research on correlation between multi-drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* and gene PBP2, PBP3\*YAN Xiaoyu, XIAO Chuangqing<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the 163 Hospital of PLA, Changsha, Hu'nan 410003, China)

**Abstract: Objective** To study the effect and mechanism of gene PBP2 and gene PBP3 in drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* (KP) to different antibacterial agents. **Methods** A total of 203 strains of KP which isolated from clinical samples in each department in our hospital during the period from April 2014 to April 2015. Strains were identified and antibiotic susceptibility were determined with automatic bacteria identification system, then extracted DNA genome from bacteria, proceeded with electro-phoresis after the product of PBP2 and PBP3 were amplified by PCR, examined genetic expression with RT-PCR, and study their connection to drug-fast of the KP combining results of antibiotic susceptibility. **Results** In 203 strains of KP, 105 strains resistant to  $\beta$ -lactam drug (51.7%), 88 strains were sensitive, resistant rate to imipenem and meropenem were 5.4%, 3.9% respectively. The PCR amplification products of the electrophoresis bands of PBP2, PBP3 gene, 18 strains were negative, 185 strains were positive, which was not parallel, there were respectively negative and positive strains among them. There was no significant correlation between PBP2, PBP3 and multiple drug resistance of KP ( $P=0.295, 0.628$ ). PBP2 was not related to the resistance of carbapenem ( $P=0.637$ ). PBP3 had correlation with carbapenem resistance, but the correlation coefficient was not high ( $P=0.041, r=0.148$ ). After reverse transcription of PBP2, PBP3, statistically analyze electrophoresis bands of amplification products of carbapenem-resistant KP and 16SrRNA amplification bands of gray gradient ratio, there was no statistical significance (PBP2:  $P=0.331$ , PBP3:  $P=0.383$ ). **Conclusion** Gene PBP2, PBP3 might not be the necessary reasons of KP being multiple drugs resistant.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; multi-drug resistance; PBP2; PBP3

肺炎克雷伯菌(KP)是引起临床感染常见的革兰阴性菌<sup>[1]</sup>, 其检出率仅次于大肠杆菌和铜绿假单胞菌, 同时它也是社区获得性感染的常见致病菌。近年来 KP 耐药率呈升高趋势, 特别是多重耐药的出现, 导致感染后的病死率明显升高, 给临床治疗带来极大困难。青霉素结合蛋白(PBPs)作为细菌肽聚糖合成过程中的主要酶类, 在细菌细胞壁的合成过程中起着至关重要的作用。国内外近年来围绕 PBPs 开展了大量的研究工作, 试图从分子结构与基因水平认识 PBPs, 探求细菌耐药的机制, 以获得更有效的治疗手段。本研究分析了 PBP2、PBP3 基因与 KP 对各类抗菌药物的耐药性的关系, 现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2014 年 4 月至 2015 年 4 月住院患

者临床标本中分离的非重复 KP 203 株, 取自痰液、尿液、血液、分泌物及咽拭子等标本, 且在各病区科室中的来源分布相对平均, 所有标本经严格分析前质量控制, 在采集、保存、运送及检测过程中均按照规范操作, 试验结果与临床诊断相符合, 基本排除杂菌污染的可能。

1.2 仪器与试剂 美国 BD 公司 Phoenix 全自动微生物鉴定系统及其配套的鉴定卡、美国应用生物系统公司生产的 PCR 扩增仪、美国 Alpha Innotech 公司生产的 FluorChem FC2 凝胶成像系统、天根生化科技(北京)有限公司生产的 MasterMix-PCR 扩增试剂等。

## 1.3 检测方法

1.3.1 菌株鉴定 KP 分离纯化后由 Phoenix 100 全自动微生物系统鉴定。

\* 基金项目: 湖南省教育厅基金项目(11C0811)。

作者简介: 闫晓煜, 男, 在读硕士研究生, 主要从事临床微生物与生化研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xcq163jyk@sina.com。

**1.3.2 体外药敏试验** 采用微量稀释法测定头孢他啶(CAC)、氨曲南(ATM)、头孢吡肟(FEP)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、头孢噻肟(CTX)、四环素(TE)、哌拉西林(OX)、阿米卡星(AK)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(CN)、左旋氧氟沙星(LEV)、氯霉素(CHL)、头孢唑林(KZ)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、氨苄青霉素/舒巴坦(SAM)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、阿莫西林/棒酸(AMC)对各菌株的最小抑菌浓度(MIC),并分别用纸片扩散(K-B)法检测以上各抗菌药物对各菌株的抑菌圈大小。

**1.3.3 PCR 扩增** 选取 7 株耐碳青霉烯类菌株及 6 株敏感菌株耐药菌株,将 RNA 反转录并扩增 cDNA 后,采用天根生化科技有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 KP DNA。用引物 PBP2 (5'-ATG AAA CAG CAC TTT CCT TTA AAA-3'), PBP3 (5'-CGG GGA TCC GGG GGT GCT TCT ACT G-3')扩增 PBP 基因,设置循环参数:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 50 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 15 min。扩增产物再行凝胶电泳,并于 FluorChem FC2 凝胶成像系统中扫描结果并保存。

**1.4 统计学处理** 采用 Image J(1.4.3.67 版本)图像处理软件分析扩增产物电泳结果并进行灰度分析,分别检测各电泳条带的灰度,计算各菌株 PBP2、PBP3 条带与 16S 条带的灰度比值,采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理及统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 KP 标本来源** 2014 年 4 月至 2015 年 4 月共分离非重复 KP 203 株,主要来源于痰液、血液、中段尿、腹腔引流液等标本,具体见表 1。

表 1 KP 标本来源构成比分析[n(%)]

标本类型	构成比
痰液	115(56.7)
血液	23(11.9)
中段尿	20(10.4)
腹腔引流液	19(9.8)
感染组织	5(2.6)
前列腺液	2(1.0)
穿刺液	5(2.6)
咽拭子	3(1.6)
分泌物	5(2.6)
胆汁	6(3.1)

**2.2 KP 药敏结果**

**2.2.1 KP 对 6 类抗菌药物的耐药率** 将临床常用的抗菌药物分为 6 类,KP 对其耐药率见表 2。

表 2 KP 对 6 类抗菌药物的耐药率

抗菌药物种类	耐药菌株数(n)	敏感菌株数(n)	耐药率(%)
$\beta$ -内酰胺类药物	105	88	51.7
氨基糖苷类药物	63	130	32.6
喹诺酮类药物	56	137	29.0
磺胺类药物	82	111	42.5
四环素类药物	94	99	48.7
氯霉素类药物	73	120	37.8

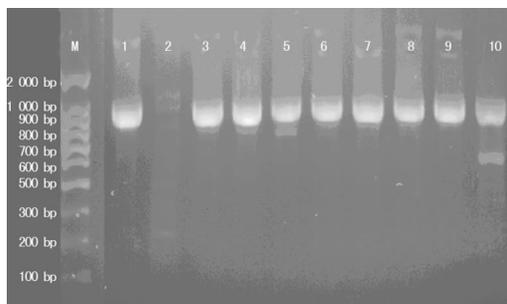
**2.2.2 KP 对各种抗菌药物的耐药率** 203 株 KP 中  $\beta$ -内酰胺类耐药 105 株,敏感 88 株,对 IPM、MEM 耐药率分别为

5.4%、3.9%,对 AK 较为敏感,其耐药率仅为 9.3%,OX 及 KZ 的耐药率分别高达 54.7%、53.7%,其余药物的耐药率在 19.7%~54.7%。见表 3。

表 3 KP 对各种抗菌药物的耐药率

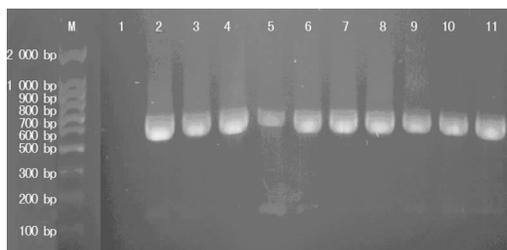
药物名称	耐药菌株数(n)	敏感菌株数(n)	耐药率(%)
CAC	69	117	33.9
ATM	73	117	35.9
FEP	79	103	38.9
IPM	11	143	5.4
MEM	8	146	3.9
CTX	103	86	50.7
TE	94	93	46.3
OX	111	77	54.7
AK	19	176	9.3
CIP	56	125	27.6
CN	62	131	30.5
LEV	40	146	19.7
CHL	74	107	36.5
KZ	109	84	53.7
SXT	82	111	40.4
SAM	96	79	47.3
TZP	54	128	26.6
AMC	62	110	30.5

**2.2.3 PCR 扩增及测序分析** PBP2 及 PBP3 部分 PCR 扩增结果见图 1、2,显示 2 号菌株 PBP2 为阴性,1 号菌株 PBP3 为阴性。扩增产物的测序结果于 Genbank 上行 Blast 分析,证实为 PBP2/PBP3 基因。PBP2、PBP3 的 PCR 结果显示,阴性菌株均为 18 株,但并不平行,分别有各自的阴、阳性菌株。



注:M 为 DNA 标记物,1~10 为菌株序号。

图 1 PBP2 部分 PCR 扩增结果



注:M 为 DNA 标记物,1~11 为菌株序号。

图 2 PBP3 部分 PCR 扩增结果

**2.2.4 PBP2、PBP3 与 KP 耐药性分析** PBP2、PBP3 与 KP 多重耐药性无显著相关( $P = 0.295, 0.628$ )。PBP2 与碳青霉烯类药物无显著相关( $P = 0.637$ );PBP3 与碳青霉烯类药物存

在显著相关,但相关系数不高( $P=0.041, r=0.148$ )。具体见表 4、5。

表 4 PBP2、PBP3 与多重耐药性的关系( $n$ )

分类	全敏	一类耐药	二类耐药	三类耐药	多重耐药	合计
PBP2 阴性	3	5	1	3	6	18
PBP2 阳性	54	24	19	19	69	185
PBP3 阴性	4	2	1	18	11	18
PBP3 阳性	54	27	19	20	65	185

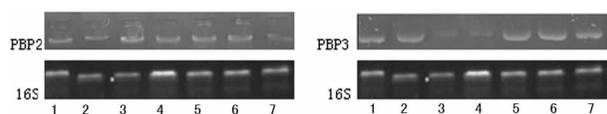
表 5 PBP2、PBP3 与碳青霉烯类耐药性关系( $n$ )

分类	耐药菌	敏感菌
PBP2 阴性	3	15
PBP2 阳性	49	136
PBP3 阴性	8	10
PBP3 阳性	44	141

表 6 2 组 PBP2、PBP3 的灰度比值

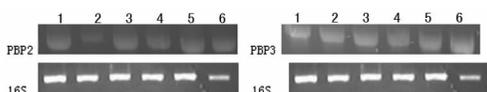
组别	1	2	3	4	5	6	7
耐药组 PBP2/16S	0.385	0.179	0.476	0.548	0.251	0.827	0.334
耐药组 PBP3/16S	0.652	0.641	0.772	0.738	0.168	0.372	0.949
敏感组 PBP2/16S	0.493	0.296	0.545	0.348	0.739	0.832	—
敏感组 PBP3/16S	0.788	0.355	0.887	0.693	0.934	0.745	—

注:1~7 为所选敏感及耐药菌株序号,一为无数据。



注:1~7 为菌株序号。

图 3 耐药组 PBP2、PBP3 的灰度分析



注:1~6 为菌株序号。

图 4 敏感组 PBP2、PBP3 的灰度分析

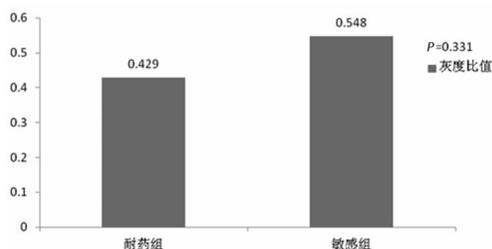


图 5 耐药组与敏感组 PBP2/16S 结果

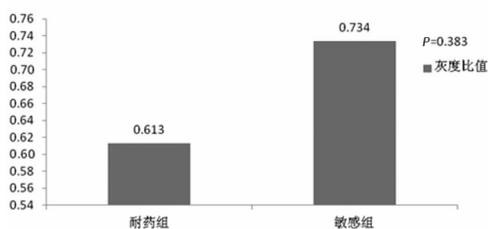


图 6 耐药组与敏感组 PBP3/16S 结果

2.2.5 PBP2、PBP3 的表达水平检测结果 PBP2、PBP3 扩增产物条带与 16S 扩增产物条带的灰度比值明显比敏感菌株小,但差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 6 及图 3~6。

### 3 讨论

KP 是医院内和社区获得性感染的重要肠杆菌科细菌,目前 KP 对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制包括碳青霉烯酶的产生, $\beta$ -内酰胺酶的过度表达合并外膜孔蛋白的丢失,碳青霉烯类高亲和位点数量下降、缺失或亲和力下调等<sup>[2-3]</sup>。

本研究中通过对 KP 对 18 种抗菌药物的药敏分析可知, KP 耐药率最低的药物为 MEM(3.9%)。所有耐碳青霉烯类菌株大部分来源于痰液标本,这些存在于呼吸道的 KP 可能属条件致病菌,难以与优势性敏感菌竞争,当敏感菌因抗菌药物的选择性压力而被杀灭后,耐药菌才得以迅速繁殖而成为优势菌,并导致各种感染的发生。这种条件致病菌耐药性虽高,但并不致病,或比其他来源的 KP 致病性低,其临床危害性不大。

所有分离出的 KP 中多重耐药占 75 株(36.9%),说明 KP 对多种抗菌药物耐药的现象非常严重,其耐药机制可有多种,最重要者为  $\beta$ -内酰胺酶、氨基糖苷钝化酶等灭活酶的产生,其次为靶位改变如 PBP<sub>s</sub> 改变等。本研究中,未发现 PBP2、PBP3 基因与多重耐药菌株存在相关性,其原因可能是 KP 外膜的存在,具有高效的通透屏障作用,能阻碍抗菌药物进入细胞内膜靶位,减少抗菌药物的吸收<sup>[4]</sup>;而  $\beta$ -内酰胺类药物对革兰阴性菌产生抗菌作用的先决条件为此类药物顺利通过外膜孔孔,再与内膜上的 PBP<sub>s</sub> 结合<sup>[5]</sup>。本研究收集的菌株中,来源于普外科、老年病学科、ICU 和胸外科的标本所占比例较大,患者多经反复感染和治疗。由于药物长期作用,细菌外膜蛋白变构,使菌体外膜通透性下降,阻碍抗菌药物进入内膜靶位<sup>[6]</sup>。虽然 PBP<sub>s</sub> 的数量、结构和亲和力的改变是细菌  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物耐药性的重要机制之一,但由于 KP 外膜的存在, $\beta$ -内酰胺类抗菌药物并不能与 PBP2、PBP3 结合,从而导致了本试验结果。

碳青霉烯类抗菌药物是目前临床应用最广泛、抗菌活性最强大的抗菌药物。但是随着该药的广泛使用,碳青霉烯类耐药的 KP 日趋增多<sup>[7]</sup>。本研究中,6.9% 的 KP 株对碳青霉烯类药物耐药,提示在本院就诊患者范围内,已有部分因耐碳青霉烯类 KP 引发了感染,对在临床上使用碳青霉烯类抗菌药物抗感染提供了一定参考作用;基因 PBP2 的缺失与否和 KP 对碳青霉烯类药物耐药性并不相关,而基因 PBP3 是否缺失与 KP 对碳青霉烯类药物耐药性相关( $r=0.148$ )。为进一步研究 PBP2、PBP3 与 KP 耐碳青霉烯类药物的关系,本研究通过 PBP2、PBP3 的表达水平进行检测,结果显示耐碳青霉烯类 KP 与非耐碳青霉烯类 KPPBP2、PBP3 的表达没有差异,可初步认为 PBP2、PBP3 基因与 KP 的碳青霉烯类耐药性均无关。KP 对碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的主要原因与细菌膜通透性改变及内酰胺酶水解有关,与 PBP<sub>s</sub> 的关系可能不大。

综上所述,PBP2、PBP3 基因可能不是影响 KP 多重耐药的必要因素。

### 参考文献

[1] 谷秀梅,刘文恩,简子娟,等.携带产新型碳青霉烯酶基因 blaIMP-38 肺炎克雷伯菌致病性分析[J].临床检验杂志,2013,31(9):698-705.

[2] 陈玉宇,李辉军,许春燕,等.肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶特性与耐药趋势研究[J].中国微生态学杂志,2015,27(2):174-177.

在 BCR-ABL 蛋白酪氨酸激酶活性中起重要作用<sup>[14]</sup>,因此,靶向 BCR-ABL 融合蛋白的寡聚化结构域并采用联合治疗成为治疗 CML 的另一条新途径。

有研究将含有 OD 结构域(BCR1-72)的外源性融合肽导入 CML 细胞,通过抑制 BCR-ABL 激酶的活性,从而抑制了 CML 细胞的增殖并诱导其凋亡<sup>[9,15]</sup>,证明了 BCR 的 OD 结构域对于活化 BCR-ABL 激酶具有重要的作用。小分子多肽药物在治疗肿瘤方面具有较高的有效性、特异性,以及低毒性等特点,靶向 BCR-ABL 的小分子多肽药物也将会成为具有临床应用价值的新型抗癌药物。鉴于 BCR30-63 在 BCR1-72 活化 BCR-ABL 过程中的关键性作用,本试验研究了前期已成功构建并表达的含有 BCR30-63 和 BCR1-27+64-72 的可溶性融合肽 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 对 K562 细胞增殖的影响。试验结果表明,CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 可以抑制 K562 细胞株,以及 CML 患者慢性期骨髓细胞的增殖。CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 的生物学活性较含有 BCR1-72 结构的阳性对照 CTP-OD-HA 融合肽低,其原因可能与 2 种融合肽的分量过小导致有效生物学浓度低有关。

综上所述,CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 融合肽均可抑制 K562 细胞株的增殖,且与 imatinib 联合用药后,可有效增加 imatinib 对它的敏感性。同时,2 种融合肽对 CML 慢性期患者骨髓细胞也可起到有效抑制增殖的作用,证明了 CTP-OD1-HA 和 CTP-OD2-HA 在治疗 CML 中的潜力,为今后通过靶向 BCR1-72 开发新型小分子多肽药物治疗 CML 奠定了基础。

参考文献

[1] Ault PS, Rose DJ, Nodzon LA, et al. Bosutinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: practical consideration for management of side effects[J]. J Advanc Practit Oncol, 2016, 7(2): 160-175.

[2] Sun X, Cai X, Yang J, et al. Cantharidin overcomes imatinib resistance by depleting BCR-ABL in chronic myeloid leukemia[J]. Molecules Cells, 2016, 39(12): 869-876.

[3] Styles T, Wu M, Wilson R, et al. Population-based testing and treatment characteristics for chronic myelogenous leukemia[J]. J Reg Manag, 2016, 41(3): 134-142.

[4] Pan CY, Xu N, He BL, et al. Clinical significance of cytogenetic monitoring in chronic myeloid leukemia[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2017, 38(2): 112-117.

[5] Lu X, Zhang Z, Ren X, et al. Synthesis and identification of GZD856 as an orally bioavailable Bcr-Abl T315I inhibitor overcoming acquired imatinib resistance[J]. J Enzym Inhib Med Chem, 2017, 32(1): 331-336.

[6] Ma YX, Wang L, Mi RH, et al. Significance of BCR-ABL

fusion gene detection in CD34(+) cells of chronic myelogenous leukemia patients[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2017, 38(2): 164-166.

[7] He YP, Wertheim A, Xu LW, et al. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl[J]. Blood, 2002, 99(8): 2957-2968.

[8] Beissert T, Puccetti E, Bianchini A, et al. Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface of BCR interferes with the transformation potential of BCR-ABL and increases sensitivity to STI571[J]. Blood, 2003, 102(8): 2985-2993.

[9] Huang SF, Liu DB, Zeng JM, et al. Cloning, expression, purification and functional characterization of the oligomerization domain of Bcr-Abl oncoprotein fused to the cytoplasmic transduction peptide [J]. Protein Expr Purif, 2009, 64(2): 167-178.

[10] Taylor M, Keating E. Orientation and oligomerization specificity of the Bcr coiled-coil oligomerization domain [J]. Biochemistry, 2005, 44(49): 16246-16256.

[11] Lan X, Zhao C, Chen X, et al. Nickel pyrithione induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib via both Bcr/Abl-dependent and Bcr-Abl-independent mechanisms [J]. J Hemat Oncol, 2016, 9(1): 129.

[12] Wang LX, Wang JD, Chen JJ, et al. Aurora a kinase inhibitor AKI603 induces cellular senescence in chronic myeloid leukemia cells harboring T315I mutation [J]. Scient Rep, 2016, 6: 35533.

[13] Jin Y, Zhou J, Xu F, et al. Targeting methyltransferase PRMT5 eliminates leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia [J]. J Clin Invest, 2016, 126(10): 3961-3980.

[14] Bruno BJ, Lim CS. Inhibition of bcr-abl in human leukemia cells with a coiled-coil protein delivered by a leukemia-specific cell-penetrating peptide [J]. Molec Pharm, 2015, 12(5): 1412-1421.

[15] Huang ZL, Gao M, Ji MS, et al. TAT-CC fusion protein depresses the oncogenicity of BCR-ABL in vitro and in vivo through interrupting its oligomerization [J]. Amino Acids, 2013, 44(2): 461-472.

(收稿日期:2017-02-01 修回日期:2017-04-01)

(上接第 1875 页)

[3] Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in metropolitan Detroit, Michigan [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(2): 593-599.

[4] 许亚丰, 耿先龙, 王春新, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 β-内酰胺酶、膜孔蛋白及 β-内酰胺类靶位编码基因研究 [J]. 中国抗菌药物杂志, 2014, 39(1): 58-64.

[5] 孙洁, 凌斌, 李冰沁, 等. 细菌耐药机制的研究进展 [J]. 中

原医刊, 2007, 34(2): 54-56.

[6] 李天娇, 王旭明, 符生苗, 等. 海南发现 4 株产 NDM-1 多重耐药的肺炎克雷伯菌 [J]. 中国热带医学, 2013, 13(12): 1468-1474.

[7] 贾艳, 孙长江, 韩文瑜, 等. 肺炎克雷伯菌研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(5): 75-78.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-03-26)