

• 论 著 •

某院 4 株携带 I 类整合酶基因的铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制研究^{*}

何 蕾, 阴 晴[△], 周亚玲, 吴 瑶

(江苏大学附属医院检验科, 江苏镇江 212001)

摘 要:目的 分析该院 4 株不同耐药程度的 I 类整合酶基因(Int I)阳性铜绿假单胞菌(PA)的相关耐药机制, 从而进一步研究不同耐药机制之间的相互作用。方法 采用 qPCR 检测头孢他啶(CAZ)、亚胺培南(IMP)诱导下的 4 株 PA 的 Int I mRNA 的相对表达水平; 采用 PCR 检测 4 株 PA 的 β -内酰胺酶(bla_{TEM} 、 $\text{bla}_{\text{NDM-1}}$ 、 bla_{VIM} 、 bla_{IMP})、主动外排系统(MexAB-OprM)、外膜蛋白(OprD2)的表达水平, 并采用 qPCR 检测 4 株 PA 的 OprM、OprD2 的表达水平; 采用 1% 结晶紫染色检测 4 株 PA 的生物膜形成能力。结果 编号为 PA01、PA02、PA04 的菌株在 CAZ、IMP 诱导下, Int I mRNA 的相对表达水平均较对照组高($P < 0.05$), PA01、PA02 的 Int I mRNA 的相对表达水平高于 PA04, 组间两两比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 并且在一定浓度范围内, Int I mRNA 的相对表达水平随着抗菌药物的浓度增加而增加。但 PA03 菌株的 Int I mRNA 的相对表达水平较 PA01、PA02、PA04 低, 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。PA01、PA02 检测到 bla_{TEM} , 而 $\text{bla}_{\text{NDM-1}}$ 、 bla_{VIM} 和 bla_{IMP} 均未被检测到; PA01、PA02 的外排泵相对表达水平高于 PA03、PA04($P < 0.05$); PA01、PA02 的 OprD2 mRNA 的相对表达水平低于 PA03、PA04($P < 0.05$); PA01、PA02 的生物膜形成能力弱于 PA03、PA04, 且 PA03 菌株的生物膜形成能力最强。结论 PA01、PA02、PA04 的 Int I 在抗菌药物的选择性压力下表达增强, 并且 PA01、PA02 对碳青霉烯类耐药主要由 Int I 高表达、外排泵过表达及膜通透性降低介导, 与 β -内酰胺酶及生物膜形成关系不大。

关键词:铜绿假单胞菌; I 类整合酶基因; β -内酰胺酶; 主动外排泵; 外膜蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.013

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)23-2871-07

文献标识码:A

Study on the resistance mechanism of 4 strains of *Pseudomonas aeruginosa* with class I integras gene to carbapenem antibacterials in the hospital^{*}

HE Lei, YIN Qing[△], ZHOU Yaling, WU Yao

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract: **Objective** To Analyze the related resistance mechanism of 4 strains of different resistance levels of class I integrase gene(Int I) positive *Pseudomonas aeruginosa*(PA), so as to further study the interaction between different resistance mechanisms. **Methods** The relative expression levels of Int I mRNA in 4 PA strains induced by ceftazidime (CAZ) and imipenem (IMP) were detected by qPCR; β -lactamases(bla_{TEM} , $\text{bla}_{\text{NDM-1}}$, bla_{VIM} , bla_{IMP}), the expression levels of active efflux system(MexAB-OprM) and outer membrane protein(OprD2) were detected by qPCR, the expression levels of OprM and OprD2 in 4 PA strains were detected by qPCR; The biofilm formation ability of 4 PA strains was detected by 1% crystal violet staining. **Results** Under the induction of CAZ and IMP, the relative expression levels of Int I mRNA in PA01, PA02 and PA04 was higher than that in the control group($P < 0.05$), and that of PA01 and PA02 was higher than that in PA04. There was a significant difference between the two groups($P < 0.05$). In a certain concentration range, the relative expression level of Int I mRNA increased with the increase of antibiotic concentration. However, the relative expression level of Int I mRNA in PA03 was lower than that in PA01, PA02 and PA04, and there

^{*} 基金项目:江苏省镇江市 2017 年度科技项目(SH2017024);江苏省 2018 年度预防医学科研课题(Y2018108)。

作者简介:何蕾,女,在读硕士研究生,从事临床微生物学研究工作。 [△] 通信作者, E-mail: yinqingyinqing@ aliyun. com。

本文引用格式:何蕾,阴晴,周亚玲,等. 某院 4 株携带 I 类整合酶基因的铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(23): 2871-2876.

was no significant difference between the groups ($P > 0.05$). The bla_{TEM} gene was detected in PA01 and PA02, but bla_{NDM-1}, bla_{VIM} and bla_{IMP} were not detected in all strains. The relative expression level of efflux pump in PA01 and PA02 was higher than that in PA03 and PA04 ($P < 0.05$). The relative expression level of OprD2 in PA01 and PA02 was lower than that in PA03 and PA04 ($P < 0.05$). The biofilm forming ability of PA01 and PA02 was weaker than that of PA03 and PA04, and the biofilm forming ability of PA03 was the strongest. **Conclusion** The expression of Int I in PA01, PA02 and PA04 is increased under the selective pressure of antibiotics, and the resistance of PA01 and PA02 to carbapenems is mainly mediated by the high expression of Int I, the overexpression of efflux pump and the decrease of membrane permeability, which is not related with β -lactamase and the formation of biofilm.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; class I integron gene; β -lactamase; active efflux pump; outer membrane protein

铜绿假单胞菌(PA)是一种非发酵型革兰阴性杆菌,也是引起医院内获得性感染的主要条件致病菌之一,广泛分布于自然环境和医疗环境中。近年来,随着新型广谱 β -内酰胺类抗菌药物在临床中的广泛使用,PA 在抗菌药物的选择性压力下其耐药性发展迅速,多重耐药株及泛耐药株分离率逐年提高。目前 β -内酰胺类、氨基糖苷类及喹诺酮类药物仍是治疗 PA 感染主要药物,其中碳青霉烯类抗菌药物在治疗革兰阴性杆菌感染中疗效显著,但由于 PA 对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性上升迅速,其治疗效果并不令人满意,常导致临床出现无药可用的状况。PA 的耐药机制复杂,主要有可移动性基因元件、 β -内酰胺酶的水解作用、主动外排泵的高表达、外膜通透性降低及生物膜的形成等^[1-3]。其中可移动性基因元件中的整合子具有强大的耐药基因捕获能力,在耐药基因的传播中起到至关重要的作用。通常情况下,PA 耐药的形成是多种机制共同作用的结果。本研究选取本院 4 株不同耐药程度且携带 I 类整合酶基因(Int I)的 PA 菌株开展研究,分析 4 株 Int I 阳性菌株的耐药机制之间的相互作用,为临床合理用药及控制院内感染提供依据。

1 资料与方法

1.1 菌株 4 株 Int I 阳性的 PA 分离自江苏大学附属医院微生物室,编号为 PA01 和 PA02 是亚胺培南(IMP)耐药 PA(IRPA),PA03 和 PA04 是 IMP 敏感 PA(ISPA)。标准质控菌株 PA ATCC27853 和头孢埃希菌 ATCC25922 购于原卫生部临床检验中心。

1.2 主要仪器 VITEK-2 compact 全自动微生物鉴定和药敏分析仪购自法国生物梅里埃公司;Real-Time PCR 仪、普通 PCR 扩增仪和凝胶电泳成像分析系统均购自美国 Bio-Rad 公司;水平电泳套件购自上海天能生物公司;MULTISKAN GO 全波长酶标分析仪、低温高速离心机、NanoDrop1000 分析仪为美国 Thermo 公司产品;96 孔细胞培养板购自德国 Eppendorf 公司;GRANT-PCH-1 干式加热/冷却器购自上

海恒奇仪器仪表有限公司;恒温水浴锅购自嘉兴俊思电子有限公司。

1.3 主要试剂 血琼脂平购自郑州安图生物公司;胰蛋白胨,酵母干粉购自英国 OXOID 公司;小量质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物有限公司;2 × qPCR SYBR Green Mix、2 × PCR Master Mix、QRT SuperMix for qPCR 购自南京 Vazyme 公司;细菌总 RNA 快速抽提试剂盒购自上海生工生物公司;异丙醇、氯仿和无水乙醇等均为国产分析纯;DNA Marker 购自大连宝生物公司;PCR 引物由苏州泓讯生物技术公司合成;琼脂糖粉末购自西班牙 Bio-west 公司;1%结晶紫染液购自珠海贝索公司;头孢他啶(CAZ)粉末 1 g 购自扬子江药业;IMP 粉末 500 mg 购自杭州默沙东。

1.4 方法

1.4.1 细菌培养、菌种鉴定及药敏检测 所有菌株的分离和培养严格按照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》操作。采用 VITEK-2 compact 微生物鉴定及药敏系统配套的鉴定卡及药敏卡对细菌进行鉴定,并检测其对抗菌药物的敏感性。

1.4.2 细菌 DNA 模板的制备 采用煮沸裂解法制备细菌总 DNA,操作步骤为从血平板上挑取 3~5 个菌落接种于 300 μ L 灭菌蒸馏水中并振荡混匀,煮沸 10 min 以裂解细菌,经 12 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液即为 DNA 模板。

1.4.3 PA 菌最低抑菌浓度(MIC)检测 以 LB 培养基倍比稀释一系列浓度的 CAZ 和 IMP,96 孔细菌培养板每孔加入 100 μ L 不同浓度的 CAZ 和 IMP,同时设置不加抗菌药物的对照组。新鲜菌落以生理盐水调节浓度至 0.5 McF,再以 LB 培养基以 1:1 000 比例稀释后每孔加入 100 μ L,同时设置未加菌的空白对照组,只加入相同体积的 LB 培养液。每组重复 3 次。细菌培养板于 37 $^{\circ}$ C 中培养 24 h,采用酶标仪读取吸光度 600 nm 处的数值(A_{600}),当 $A_{600} \leq 0.1$ 时认定无细菌生长,记录无细菌生长孔对应的抗菌药物最低浓度。

1.4.4 CAZ 和 IMP 诱导细菌 Int I mRNA 的表达 配制含抗菌药物浓度为 10、5、1、0.1、0.01 μg/mL 的 LB 培养基,同时设置不添加抗菌药物对照组。4 株 PA 菌分别接种于上述含不同浓度抗菌药物的培养基,每组重复 3 管,试验重复 3 次。于 37 ℃振荡培养 8 h 后,收集菌体,采用上海生工公司 RNA 快速抽提试剂盒提取细菌总 RNA,以南京诺唯赞公司 RT SuperMix 反转录试剂盒合成 cDNA,用于后续 qPCR 检测。qPCR 检测引物参考刘蓉等^[4]研究报道合成,qPCR 检测体系包括 cDNA 模板 2 μL,上、下游引物各 0.4 μL,qPCR Mix 预混液 10 μL,最终以灭菌蒸馏水补足体系至 20 μL。qPCR 反应条件为,95 ℃预变性 1 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,反应共 40 个循环,于退火阶段收集荧光信号。计算平均 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt}法计算获得被测基因的相对表达水平。

1.4.5 β-内酰胺酶基因检测 参考闫玉兰^[5]研究合成检测引物。PCR 反应总体系为 25 μL,其中 2×PCR 预混液 12.5 μL,上、下游引物(10 pmol/L)各 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,加灭菌蒸馏水至 25 μL。PCR 反应程序为 94 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。通过 1.2%琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,并照相记录结果。

1.4.6 主动外排泵和外膜蛋白基因检测 参考文献[5-6]合成外排泵和外膜蛋白引物。PCR 反应总体系同 1.4.5,PCR 反应程序为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。通过 1.2%琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,并照相记录结果。参照 1.4.4 对 OprM、OprD2 进行 qPCR 检测。见表 1。

表 1 目的基因引物序列		
基因名称	引物序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)
16sRNA	F:AACGCGAAGAACCT TACC	149
	R:AAGGG TTGCGCTCGT TAC	
Int I	F:AACGCGAAGAACCTTACC	110
	R:AAGGG TTGCGCTCGT TAC	
TEM-1	F:GTGCGCGGAACCCCTATT	919
	R:TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC	
NDM-1	F:TCGCCCCATATTTTGTCTACAG	1 012
	R:CGATCCTTCCAACCTCGTCGC	
IMP	F:ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	741
	R:TTAGTTGCTTGGTTTTGATC	
VIM	F:GTCTATTTGACCGCGTC	774
	R:CTACTCAACGACTGAGCG	

续表 1 目的基因引物序列		
基因名称	引物序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)
MexA	F:ACCTACGAGGCCGACTACCAGA	252
	R:GTTGGTCACCAAGGGCGCCTTC	
MexB	F:CAAGGGCGTCGGTGACTTCC	251
	R:ACCTGGGAACCGTCGGGATT	
OprM	F:CCATGAGCCGCCAACTGTC	848
	R:CCTGGAACGCCGTCTGGAT	
OprD2	F:ATCTACCGCACAAACGATGAAGG	156
	R:GCCGAAGCCGATATAATCAAACG	

1.4.7 生物膜形成能力检测 采用结晶紫染色法体外检测 PA 生物膜形成能力。取出冻存的 PA 菌种接种于血平板上,35 ℃培养 18 h,挑取单个菌落于无菌生理盐水中,调节比浊度为 1 McF 的菌悬液,在 96 孔板,每孔加入 10 μL 菌液和 200 μL 的 LB 培养液,每株菌做 3 个平行对照,同时设置阴性对照,35 ℃置于湿盒中连续培养 48 h。48 h 后取出 96 孔板,吸弃板内培养液,用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次去除黏附菌(使用棉签将各孔外壁的结晶紫小心擦尽),每孔加入固定液(甲醇)200 μL 固定 20 min;固定完毕后,再用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次;晾干后各孔加入 200 μL 1%结晶紫染液,室温下染色 10 min。染色完毕后蒸馏水洗涤 2 次,晾干,最后各孔加入 95%乙醇 200 μL,充分溶解。酶标仪读取 570 nm 处的吸光度值(A₅₇₀)。试验菌株吸光度值大于阴性对照孔即为生物膜形成阳性。

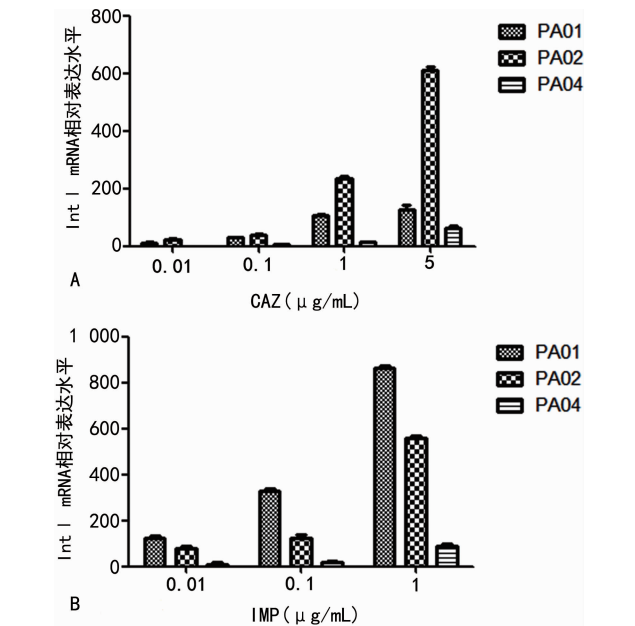
1.5 统计学处理 使用 SPSS25.0 统计学软件,采用 one-way ANOVA 及 LSD-*t* 检验分析一系列抗菌药物浓度下 PA 的 Int I 的相对表达水平,采用独立样本 *t* 检验分析 OprM、OprD2 及生物膜在不同组间的差异。以上统计方法均以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CAZ、IMP 的 MIC 检测结果 CAZ 对 PA01、PA02、PA03、PA04 的 MIC 分别是 64、64、2、4 μg/mL;IMP 对 PA01、PA02、PA03、PA04 的 MIC 分别是 16、16、0.5、0.5 μg/mL。

2.2 PA 在不同浓度 CAZ、IMP 诱导下 Int I mRNA 的相对表达水平 PA01、PA02 在 CAZ(10 μg/mL)、IMP(10 μg/mL,5 μg/mL)培养基中,细菌生长受到抑制;PA03、PA04 在 CAZ(10 μg/mL,5 μg/mL)、IMP(10 μg/mL,5 μg/mL)培养基中,细菌生长受到抑制,故弃之不用。图 1 显示:PA01、PA02、PA04 菌株的 Int I mRNA 的相对表达水平均较对照组高(*P*<0.05),并且 PA01、PA02 的 Int I mRNA 相对表达水平高于 PA04;组间两两比较,差异均有统计学意义

($P<0.05$),并且在一定浓度范围内,Int I 的 mRNA 相对表达水平随着培养液中抗菌药物的浓度增加而呈上升趋势。但是 PA03 菌株的 Int I 的 mRNA 相对表达水平比 PA01、PA02、PA04 低,且组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:A为CAZ诱导下PA Int I mRNA的相对表达水平;B为IMP诱导下PA Int I mRNA的相对表达水平。

图1 CAZ、IMP诱导下PA Int I mRNA的相对表达水平

2.3 PA的β-内酰胺类酶检测结果 PA01、PA02检测到 bla_{TEM},所有菌株未检测到 bla_{NDM-1}、bla_{VIM}和 bla_{IMP}。见图2。

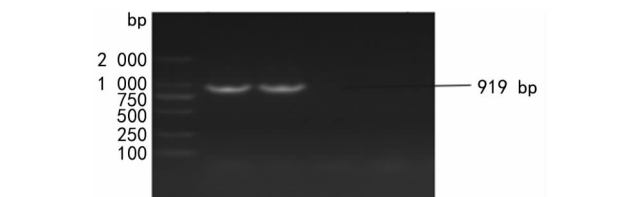
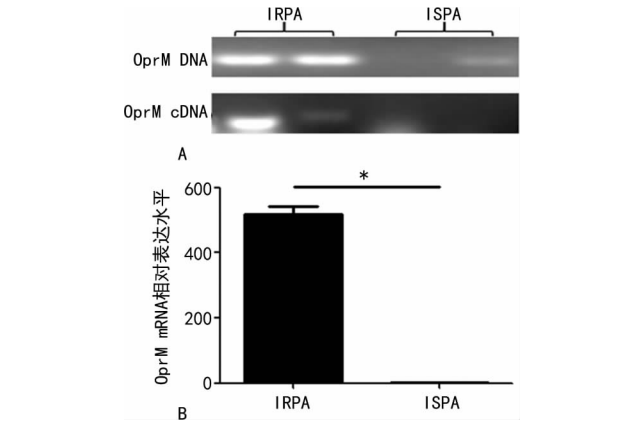


图2 PA TEM基因扩增电泳图

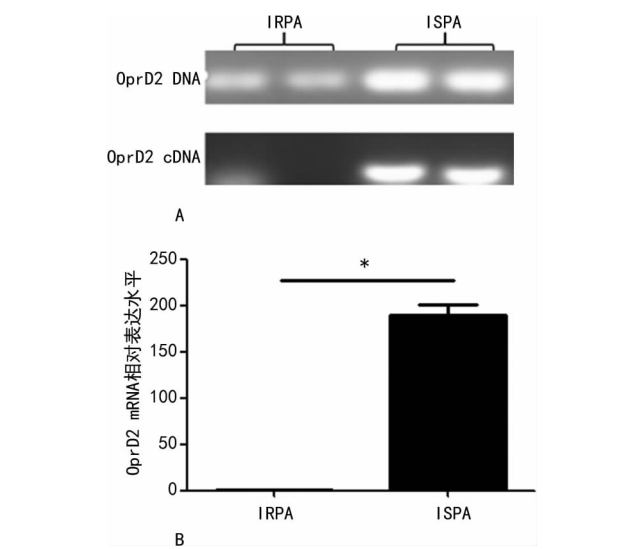
2.4 PA的外排泵及外膜蛋白检测结果 外排泵的PCR结果显示PA01、PA02的 MexA、MexB、OprM均阳性,PA03、PA04的 MexA、MexB阳性,OprM阴性,并且PA01、PA02的外排基因OprM的mRNA相对表达水平是PA03、PA04的519倍,差异有统计学意义($P<0.05$),见图3。4株PA的外膜蛋白基因OprD2均为阳性,并且PA01、PA02的OprD2的mRNA相对表达水平低于PA03、PA04,差异有统计学意义($P<0.05$),见图4。

2.5 生物膜形成能力体外测定结果 4株PA的生物膜形成能力均为阳性,分别为:0.20±0.02、0.32±0.05、3.81±0.12、0.85±0.03,结果显示PA01、PA02的生物膜形成能力弱于PA03、PA04,且PA03菌株的生物膜形成能力最强,差异有统计学意义($P<0.05$)。



注:A为PA主动外排基因扩增电泳图;B为PA主动外排基因OprM mRNA的相对表达水平与细菌耐药的关系。IRPA(PA01、PA02)与ISPA(PA03、PA04)比较,* $P<0.05$ 。

图3 PA主动外排基因OprM扩增电泳结果及其mRNA相对表达水平与细菌耐药的关系



注:A为PA外膜蛋白基因扩增电泳图;B为PA外膜蛋白基因OprD2 mRNA相对表达水平与细菌耐药的关系。IRPA(PA01、PA02)与ISPA(PA03、PA04)比较,* $P<0.05$ 。

图4 PA外膜蛋白基因OprD2扩增电泳结果及其mRNA相对表达水平与细菌耐药的关系

3 讨论

近年来,随着广谱抗菌药物的广泛应用,PA在抗菌药物的选择性压力下,多重耐药菌株不断增加,甚至出现泛耐药菌株,但是其耐药的形成并非单一耐药机制介导,而是多种耐药机制相互作用结果,给临床的抗感染治疗带来了难题,应引起广泛重视^[7]。

整合子是细菌重要的可移动性元件,通过位点特异性重组捕获外源耐药基因使之表达并在不同菌株之间广泛传播^[8]。本研究主要探讨CAZ、IMP的不同浓度对PA菌株Int I表达的影响,结果显示PA01、PA02、PA04菌株在CAZ、IMP的诱导下,随着抗菌药物浓度的升高,Int I mRNA相对表达水平上升,且IRPA Int I mRNA的相对表达水平更高,进一步

说明 Int I 基因在抗菌药物的压力下,会上调其表达,从而提高整合酶对耐药基因的捕获概率,有利于细菌多重耐药的形成,这与 GUERIN^[9]等的研究报道相符。但是 PA03 菌株的 Int I mRNA 在抗菌药物诱导下,相对表达水平较低,且无统计学意义,考虑菌株个体差异或者该菌株的耐药并非是由整合子介导的,可能由其他耐药机制介导,将在后面进一步阐述。

PA 中对抗菌药物有水解作用的 β -内酰胺酶按 Ambler 结构分类分成 A、B、C、D 4 类。其中 A 类酶包括质粒介导的 TEM、KPC-1 酶和 GES-2 酶;B 类酶主要是金属酶包括 IMP、VIM、SPM、GIM、NDM-1 型,C 类酶主要是染色体编码的 AmpC 酶;D 类酶大部分是苯唑西林水解酶,即 OXA 型-1^[10-11]。本研究中,PA01、PA02 检测到 bla_{TEM},其余 β -内酰胺酶(bla_{NDM-1}、bla_{VIM}、bla_{IMP})均未检测到,说明产酶因素在本院 PA 对碳青霉烯类药物耐药中的作用并不是主要的。

主动外排系统在 PA 耐药中起到重要作用,多药外排的存在可能是导致 PA 多重耐药形成的主要机制。MexAB-OprM 是第一个发现的外排系统,也是 PA 对碳青霉烯类抗菌药物耐药最主要的外排系统^[12]。有文献^[13]报道 MexAB-OprM 外排泵由 MexA、MexB 和 OprM 3 种蛋白组成,操纵子 MexO 同时编码这 3 种蛋白,因此可利用定量检测其中一个基因的 mRNA 转录水平来反映外排泵 MexAB-OprM 的表达情况。本研究通过反转录外膜蛋白 OprM 基因的 mRNA,观察 MexAB-OprM mRNA 的相对表达水平,结果显示 IRPA 菌株外排泵表达水平高于 ISPA($P < 0.05$),表明主动外排的过量表达参与了 PA 对碳青霉烯类药物耐药的机制。

OprD2 是以 IMP 为代表的碳青霉烯类抗菌药物(美罗培南除外)进入菌体的特异性通道,具有配体特异性,能形成 IMP 的特异性结合位点^[12]。有学者认为 PA 对碳青霉烯类抗菌药物耐药主要是由于 OprD2 表达减少甚至缺失引起外膜通透性下降所致^[12],也有研究认为单纯 OprD2 基因缺失仅表现对 IMP 低水平耐药,总是和其他因素(主动外排系统、 β -内酰胺酶)一起作用才对碳青霉烯类药物产生明显耐药^[13]。本研究中,IRPA 菌株的 OprD2 mRNA 的相对表达水平低于 ISPA 菌株($P < 0.05$),进一步表明 IRPA 对碳青霉烯类耐药可能是由于外膜蛋白的表达减少,不能使抗菌药物进入细菌体内,从而介导耐药。

生物膜是细菌与其分泌的胞外基质相互粘连形成的具有特定结构和功能的细胞群体^[14]。生物膜一旦形成,抗菌药物难以渗透入细胞膜内,无法发挥抑菌或杀菌作用,表现为细菌对抗菌药物的耐药性增加,所以细菌耐药与生物膜关系密切^[15-16]。但是也有

研究表明生物膜是细菌为了适应环境而存在的一种方式,与细菌耐药关系不大^[14,17]。本研究中,ISPA 的生物膜形成能力强于 IRPA($P < 0.05$),且 PA03 菌株的生物膜形成能力最强,分析原因如下:(1)细菌生物膜形成与耐药性是细菌在恶劣条件下生存的两种能力。ISPA 由于耐药率低,会形成更强的生物膜来适应环境的变化,逃避抗菌药物及机体免疫系统的攻击;IRPA 一旦形成生物膜,将很难彻底清除,给临床抗感染治疗带来困难;(2)生物膜的体外测定需连续培养 48 h,而抗菌药物敏感性试验所需时间为 12~16 h(甚至更短),尚不足以形成成熟的生物膜;(3)考虑本试验菌株数量较少,课题组将进一步加大菌株数量来加以验证。

4 结 论

PA01、PA02、PA04 的 Int I 在抗菌药物的选择性压力下表达增强,意味着携带整合子的细菌捕获外源耐药基因的概率大大提高,有利于耐药性迅速形成及耐药范围扩大,严重威胁人类健康,应引起临床广泛重视。此外,IRPA 的主动外排表达能力强于 ISPA,细胞外膜通透性、生物膜形成能力低于 ISPA,故 PA01、PA02 对碳青霉烯类耐药主要由整合酶基因高表达、外排泵过表达及膜通透性下降介导,与 β -内酰胺酶及生物膜形成关系不大。PA03 菌株 Int I mRNA 相对表达水平低,生物膜形成能力最强,考虑其耐药机制主要由生物膜介导。

参考文献

- [1] 杨明,钱扬会,赵强元. 2013—2015 年临床分离铜绿假单胞菌耐药性及 I 类整合子变化分析[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(7):886-889.
- [2] 王娟,张秀明,兰海丽,等. 多药耐药铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类药物耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(16):3620-3622.
- [3] CASTANHEIRA M, DOYLE T B, SMITH C J, et al. Combination of MexAB-OprM overexpression and mutations in efflux regulators, PBPs and chaperone proteins is responsible for ceftazidime/avibactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from US hospitals[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(9): 2588-2595.
- [4] 刘蓉,杨莉莉,罗必蓉,等. 荧光定量 PCR 法检测不同状态下铜绿假单胞菌 int I 1 基因的表达式[J]. 四川大学学报(医学版),2009,40(1):33-36.
- [5] 闫玉兰. 铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药机制的研究[D]. 南宁:广西医科大学,2014.
- [6] 刘永芳,吕晓菊,俞汝佳,等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药性及其耐药表型与外膜蛋白 OprD2 的关系[J]. 中国抗生素杂志,2007,32(9):564-568. (下转第 2881 页)

凋亡,使细胞凋亡率从诱导前的(10.1±0.09)%增至(31.8±0.15)%,抑制 DcR3 表达能够加强 LPS 的诱导作用,LPS+siRNA DcR3 组细胞凋亡明显高于单纯 LPS 刺激组($P<0.05$)。而 LPS+pEGFP-DcR3 组细胞内 DcR3 表达明显升高,流式和 Western blot 检测细胞凋亡情况显示,过表达 DcR3 能够显著抑制 LPS 诱导的细胞凋亡,可使凋亡率降至(21.5±0.16)%。

4 结 论

脓毒症时存在静脉内皮细胞损伤,且内皮细胞凋亡增加,DcR3 在脓毒症引起的内皮细胞凋亡中起重要作用,过表达 DcR3 能够抑制 LPS 诱导的细胞凋亡。试验结果在脓毒症的治疗和预后判断中具有潜在研究价值,尚需进一步证实。

参考文献

[1] 隆彩霞,朱之尧,胥志跃,等. 儿童脓毒症发生毛细血管渗漏综合征的临床危险因素分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2013,15(3):219-222.

[2] DOS SANTOS M H B, DA COSTA A F E, FERREIRA B J, et al. A phosphoramidon-sensitive metalloprotease induces apoptosis of human endothelial cells by Group B Streptococcus[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013, 104 (6):1125-1133.

[3] HOU Y Q, XU P, ZHANG M, et al. Serum decoy receptor 3, a potential new biomarker for sepsis[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(7/8):744-748.

[4] LANZIOTTI V S, PÓVOA P, SOARES M, et al. Use of biomarkers in pediatric sepsis: literature review[J]. Rev

Bras Ter Intensiva, 2016, 28(4):472-482.

[5] HOTCHKISS R S, NICHOLSON D W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(11):813-822.

[6] LIANG Y J, LI X, ZHANG X J, et al. Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells[J]. Shock, 2014, 41(4):275-281.

[7] 李苗,王丽丽,常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(8):730-736.

[8] KRÜTTGEN A, ROSE-JOHN S. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome[J]. J Interferon Cytokine Res, 2012, 32(2):60-65.

[9] 娄晓丽,梁冬雨,侯彦强. 诱骗受体 3 在疾病中的检测进展[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(10):877-880.

[10] LIN W W, HSIEH S L. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(7):838-847.

[11] TATEISHI K, MIURA Y, HAYASHI S, et al. DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin α 4[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 389(4):593-598.

[12] ZHOU J, SONG S D, HE S B, et al. Silencing of decoy receptor 3 (DcR3) expression by siRNA in pancreatic carcinoma cells induces Fas ligand-mediated apoptosis in vitro and in vivo[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(3):653-660.

(收稿日期:2020-02-03 修回日期:2020-06-26)

(上接第 2875 页)

[7] ALVAREZ-ORTEGA C, WIEGAND I, OLIVARES J, et al. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(10):4159-4167.

[8] 李彦媚,赵喜红,徐泽智,等. 新型细菌耐药元件——整合子系统[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(1):1-7.

[9] GUERIN E, CAMBRAY G, SANCHEZ-ALBEROLA N, et al. The SOS response controls integron recombination[J]. Science, 2009, 324(5930):1034.

[10] 李智伟,王昌敏,郭淑丽,等. 铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶基因检测研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25 (20):4561-4563.

[11] 姚建平,黄永茂. TEM 型 β 内酰胺酶的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(6):550-555.

[12] ARABESTANI M R, RAJABPOUR M, YOUSEFIMA SHOUF R, et al. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR[J]. Arch Iran Med, 2015, 18(2):102-108.

[13] QUALE J, BRATU S, GUPTA J, et al. Interplay of efflux system, AmpC, and OprD expression in carbapenem

resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(5):1633-1641.

[14] 牛付轩,吴亮,王廷廷,等. 临床分离鲍氏不动杆菌生物膜形成能力与耐药性关系研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(18):2721-2724.

[15] TAHA M N, SAAFAN A E, AHMEDY A, et al. Two novel synthetic peptides inhibit quorum sensing-dependent biofilm formation and some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. J microbiol, 2019, 57 (7):618-625.

[16] ORAZI G, RUOFF K L, O'TOOLE G A. *Pseudomonas aeruginosa* increases the sensitivity of biofilm-grown staphylococcus aureus to membrane-targeting antiseptics and antibiotics[J]. mBio, 2019, 10(4):e01501-e01519.

[17] VILLALÓN P, VALDEZATE S, CABEZAS T, et al. Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital[J]. BMC microbiol, 2015, 15:47.

(收稿日期:2020-02-18 修回日期:2020-06-29)