

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.24.017

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211025.1133.024.html\(2021-10-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211025.1133.024.html(2021-10-25))

亚胺培南作用下的大肠埃希菌膜渗透性改变的分子机制研究*

何建春¹, 杨雷¹, 赵峻英¹, 董剑¹, 王丹¹, 裴昌贞^{2△}

(重庆市大足区人民医院:1. 检验科;2. 睡眠心身中心 402360)

【摘要】目的 调查分析在亚胺培南(IPM)选择压力下,大肠埃希菌为了适应和生存所做出的防御反应。

方法 回顾性收集该院 2019 年 1—6 月分离的含有不同类别 β-内酰胺酶的 8 株大肠埃希菌,统计大肠埃希菌的临床特征及药敏结果,并将大肠埃希菌暴露在 IPM 下 8 h,采用聚合酶链反应进行耐药基因检测,并使用 SPSS22.0 进行统计分析。结果 所选的 8 株大肠埃希菌,2 株不产 β-内酰胺酶,2 株产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)菌株分别携带 blaTEM 和 blaCTX-M,2 株产 ampC 酶,2 株产 ESBLs 酶+ampC 酶。IPM 治疗后大肠埃希菌对 IPM、美罗培南(MEM)或厄他培南(ETP)的 MIC 值发生改变(≥2 倍)的百分比达到 83.3%(20/24)。与 8 株原始菌相比,治疗后大肠埃希菌的膜孔蛋白 ompF 基因表达均有不同程度的下调,且有 5 株大肠埃希菌表达差异有统计学意义($P<0.05$),而 ompC 基因表达差异无统计学意义;而从外排泵基因分析,与 8 株原始菌相比,治疗后大肠埃希菌的 acrA 基因表达差异均有统计学意义($P<0.05$),而有 7 株菌的 tolC 和 acrB 基因表达差异有统计学意义($P<0.05$)。在更多临床菌株中研究发现,acrA 基因和 ompF 基因差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 临床应当合理使用 IPM,以减少耐碳青霉烯类大肠埃希菌的流行。

【关键词】 大肠埃希菌;亚胺培南;膜孔蛋白;外排泵

【中图分类号】 R446.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-8348(2021)24-4223-05

Study on the molecular mechanisms of membrane permeability in *Escherichia coli* exposed to imipenem*

HE Jianchun¹, YANG Lei¹, ZHAO Junying¹, DONG Jian¹, WANG Dan¹, PEI Changzhen^{2△}

(1. Department of clinical laboratory; 2. Center for Sleep and Psychosomatic Medicine, the People's Hospital of Dazu, Chongqing 402360, China)

【Abstract】 Objective To investigate and analyze the defense responses of *Escherichia coli* for adaption

and survival under the imipenem selection pressure. Methods A total of eight *E. coli* strains containing different β-lactamases in our hospital from January 2019 to June 2019 were retrospectively collected. The clinical features and drug susceptibility of all strains were collected and measured. All selected isolates were grown in the presence of imipenem for eight hours. The resistance related molecular markers for all strains were measured by the PCR assays. And all data were analyzed by the SPSS22.0. Results Of the eight strains, two isolates did not produce β-lactamase enzyme; two isolates were ESBLs-producing *E. coli* carrying blaTEM and blaCTX-M respectively; two isolates were AmpC-producing *E. coli*; and two isolates were ESBLs-producing + AmpC-producing *E. coli*. Following the IPM induction, 83.3% (20/24) of isolates showed the increased carbapenem (IPM, MEM and ETP) MICs (≥2 doubling dilutions). Compared to that of the eight original bacteria, the expressions of the ompF gene in the induced bacteria were down-regulated, and there were statistically significant differences in the five isolates ($P<0.05$); the expressions of the ompC gene were not statistically significant. However, following the efflux pump genes, in contrast to the eight original strains, there were statistically significant differences in the expressions of the acrA gene in all of the isolates ($P<0.05$), while the expressions of the tolC and acrB genes in seven strains were statistically significant different ($P<0.05$). The

* 基金项目:重庆市科卫联合医学科研项目(2018MSXM059、2020MSXM072)。 作者简介:何建春(1987—),主管检验师,硕士,主要从事临床微生物研究。 △ 通信作者, E-mail:66467955@qq.com。

expressions of the *acrA* and *ompF* genes in more clinical strains were verified, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The application of the imipenem should be reasonable in the clinical work to reduce the prevalence of carbapenem-resistant *E. coli*.

[Key words] *Escherichia coli*; imipenem; membrane porin; efflux pump

大肠埃希菌是临床最常见的条件致病菌, 根据中国 CHINET 数据显示, 其分离率一直居所有监测菌的首位。随着抗生素的广泛使用, 产超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum β -lactamases, ESBLs) 大肠埃希菌的分离率也越来越高^[1-2]。碳青霉烯类抗生素一直被认为是治疗该类菌株引发感染最有效的抗生素。相关文献报道亚胺培南 (imipenem, IPM) 是碳青霉烯类抗生素中使用频率最高且效果最好的抗生素之一^[3-5]。而在临床治疗过程中, 很多时候由于感染灶不明确、患者个体药物吸收差异等原因使得 IPM 到达感染灶的剂量不足, 导致临床治疗失败。在 IPM 作用于大肠埃希菌时, 大肠埃希菌为了生存, 主要通过什么途径来防御 IPM 的杀灭作用, 膜孔蛋白和外排泵各自是否产生作用, 到目前为止还不清楚, 值得深入研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性收集大足区人民医院 2019 年 1—6 月痰液、血液、尿液等标本中首次分离的大肠埃希菌共 16 株, 先分别选择 2 株非产 β -内酰胺酶大肠埃希菌、2 株产 ESBLs 酶大肠埃希菌、2 株产 AmpC 酶大肠埃希菌、2 株产 ESBLs 酶 + AmpC 酶的大肠埃希菌共 8 株, 进行膜孔蛋白和外排泵差异基因的筛选。再按照上述选菌方式再选择 8 株大肠埃希菌进行差异基因的验证。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及最低抑菌浓度 (MIC) 值

根据第 4 版《全国临床检验操作规程》进行微生物样本的培养和纯化, 然后通过 Vitek 2 Compact 系统进行菌株鉴定及药敏测定, 并依据 CLSI M100-S29 进行结果判读。

1.2.2 微量肉汤稀释法

依据 CLSI 推荐的方法进行 MIC 值测定, 配制好相应浓度的抗生素溶液和菌悬液, 分别加入 96 孔板中, 并设定阳性和阴性对照, 孵育 18~24 h 后进行结果判读。

1.2.3 ESBLs 确证实验和 ampC 酶筛选实验

ESBLs 确证实验^[6]: 选取 Vitek 2 Compact 初筛为产 ESBLs 的大肠埃希菌, 然后选择药敏纸片头孢他啶 (30 μg)、头孢他啶/克拉维酸 (30/10 μg)、头孢噻肟 (30 μg) 和头孢噻肟/克拉维酸 (30/10 μg) 完成纸片扩散法实验, 若头孢他啶/头孢噻肟加克拉维酸与不加克拉维酸的抑菌圈直径之差大于或等于 5 mm, 则

为产 ESBLs。

ampC 酶筛选实验^[7]: 运用 K-B 纸片扩散法, 贴上 FOX 药敏纸片, 若 FOX 抑菌圈直径小于或等于 18 mm 则初步判定为产 ampC 酶。大肠埃希菌标准菌株 ATCC25922 作为阴性对照。

1.2.4 ESBLs 基因和 ampC 基因的 PCR 扩增

利用 PCR 法检测 ESBLs 基因 (*bla*CTX-M、*bla*-TEM 和 *bla*SHV) 和 ampC 基因 (*bla*DHA、*bla*EBC、*bla*CIT、*bla*ACC、*bla*MOX 和 *bla*FOX)。反应中所需引物序列和反应条件参考文献^[7]。

1.2.5 IPM 进行菌株诱导

菌株诱导参考孙坤玲^[8]的研究: 按照说明书配制新鲜无菌 LB 肉汤, 并配置相应浓度的 IPM 抗生素溶液加入上述 LB 肉汤中, 得到含 IPM 的 LB 肉汤。再将本实验的 8 株新鲜菌分别用无菌 LB 肉汤进行比浊, 加入上述含有抗生素的 LB 肉汤中, 最终使实验菌在 3/4 MIC 值 (亚抑菌浓度) 的含 IPM 的 LB 培养基中生长, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 8 h。

1.2.6 RT-qPCR 方法

将实验的 8 株原始菌和诱导 8 h 后的菌分别进行 RT-qPCR 检测基因表达量, 检测的基因包括膜孔蛋白基因 (*ompF* 和 *ompC*)、外排泵基因 (*acrA*、*acrB*、*tolC*、*macB* 和 *emrA*) 和外排泵调控基因 (*marA*)。最后将上述差异基因在另外 8 株菌中进行统计学验证, 验证差异基因是否在所有菌中具有统计学差异。其反应所需引物序列和反应条件参考文献^[9-10]。

1.3 统计学处理

所有数据的统计分析采用 SPSS 22.0 软件完成。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株的基本特征

8 株大肠埃希菌从标本来源看: 2 株来源于痰标本, 2 株来源于血液标本, 3 株来源于尿液标本, 1 株来源于脓液标本。从产 β -内酰胺酶来看: 2 株不产 β -内酰胺酶, 2 株产 ESBLs 菌株分别携带 *bla*TEM 和 *bla*CTX-M, 2 株产 ampC 酶, 2 株产 ESBLs 酶 + ampC 酶。从 MIC 值来看: 其对 IPM 的 MIC 值为 0.125~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对美罗培南 (MEM) 的 MIC 值为 0.125~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和对厄他培南 (ETP) 的 MIC 值为 0.125~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均为敏感, 见表 1。

2.2 治疗后菌株的特征

对比分析 8 株菌在 IPM 治疗前后 MIC 值变化情

况,结果发现:对 IPM 的 MIC 值无变化的有 1 株菌,增加 2 倍的有 4 株菌,增加 4 倍的有 3 株菌。而对 MEM 的 MIC 值无变化的有 3 株菌,增加 2 倍的有 4 株菌,增加 4 倍的有 1 株菌。而对 ETP 的 MIC 值增加 2 倍的有 3 株菌,增加 4 倍的有 1 株菌,增加 8 倍的有 4 株菌。诱导后引起 IPM、MEM 和 ETP 的 MIC 值发生改变的百分比达到 83.3%(20/24)。而从 4 种类型 β-内酰胺酶菌株诱导前后 MIC 变化情况来看,不产 β-内酰胺酶菌株基本保持不变,而只产 ESBLs 酶/ampC 酶菌株有一定变化,变化最大的为产 ESBLs 酶+ampC 酶菌株,见表 1。

表 1 实验菌株的基本特征

编号	来源	β-内酰胺酶基因	MIC (μg/mL)					
			IPM	IPM*	MEM	MEM*	ETP	ETP*
1	痰液	—	0.25	0.25	0.5	0.5	0.125	0.25
2	血液	—	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5
3	脓液	TEM	0.25	1.0	0.25	0.5	0.125	1.0
4	尿液	CTX-M	0.5	2.0	0.5	1.0	0.25	2.0
5	痰液	ampC	0.5	1.0	0.25	0.5	0.25	1.0
6	尿液	ampC	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5
7	血液	ampC+ CTX-M	1.0	2.0	0.5	1.0	0.5	4.0
8	尿液	ampC+ CTX-M	0.5	2.0	0.125	0.5	0.25	2.0

*:治疗 8 h 后菌株。

2.3 治疗前后菌株膜孔蛋白表达情况

对比分析 8 株菌在 IPM 治疗前后膜孔蛋白 ompF 和 ompC 表达量的变化情况,结果发现:与 8 株原始菌相比,诱导后菌株的 ompC 基因表达虽然均有不同程度的下调,但差异均无统计学意义;而对 ompF 基因来说,诱导后菌株的 ompF 基因表达也均有不同程度的下调,且有 5 株菌表达差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.4 治疗前后菌株外排泵基因表达情况

对比分析 8 株菌在 IPM 治疗前后外排泵表达量变化情况,结果发现:与 8 株原始菌相比,绝大部分诱导菌外排泵基因表达有不同程度的上调,对 tolC 和 acrB 基因来说,除第 1 株不产 β-内酰胺酶的菌差异无统计学意义外,其余 7 株菌差异均有统计学差异($P < 0.05$);对 acrA 基因来说,所有菌株的表达量差异均有统计学意义($P < 0.05$);对 macB 基因来说,所有菌株表达量差异均无统计学意义;对 emrA 基因来说,仅有 2 株菌表达差异有统计学意义($P < 0.05$),其余菌表达量差异均无统计学意义,见图 2。

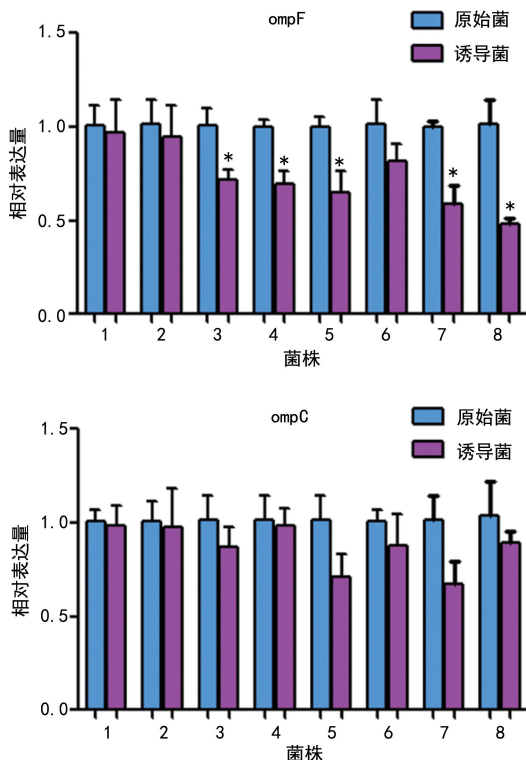


图 1 IPM 诱导对大肠埃希菌膜孔蛋白基因表达的影响

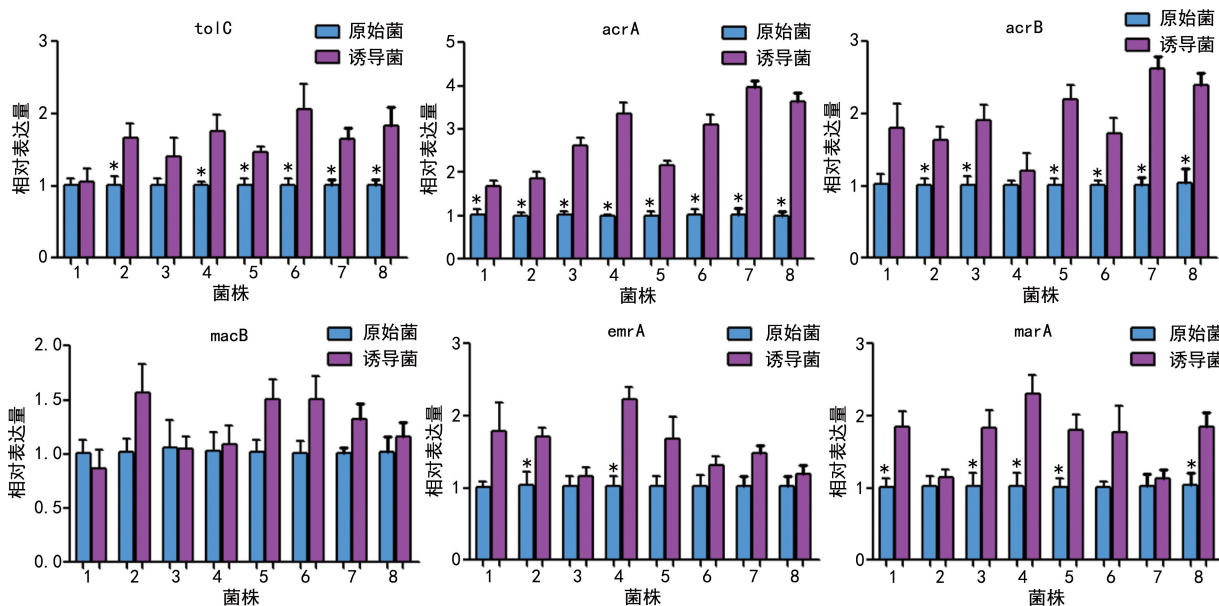


图 2 IPM 诱导对大肠埃希菌外排泵及调控基因表达的影响

2.5 菌株治疗前后外排泵调控因子表达情况

对比分析 8 株菌在 IPM 治疗前后外排泵调控因子表达量的变化情况,结果发现:与 8 株原始菌相比,诱导菌的 *marA* 基因表达虽然均有不同程度的上调,但第 2、6 和 7 共 3 株菌表达差异无统计学意义,其余菌株差异均有统计学差异($P < 0.05$),见图 2。

2.6 *acrA* 和 *ompF* 基因表达在更多临床菌株中的验证

进一步分析 *acrA* 和 *ompF* 基因在 16 株临床菌经过 IPM 治疗前后的表达差异。结果发现:原始菌组与诱导菌组 *acrA* 基因的表达分别为 1.00 ± 0.36 、 2.36 ± 0.58 ,差异有统计学意义($P < 0.01$);*ompF* 基因的表达为 1.00 ± 0.09 、 0.72 ± 0.11 ,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

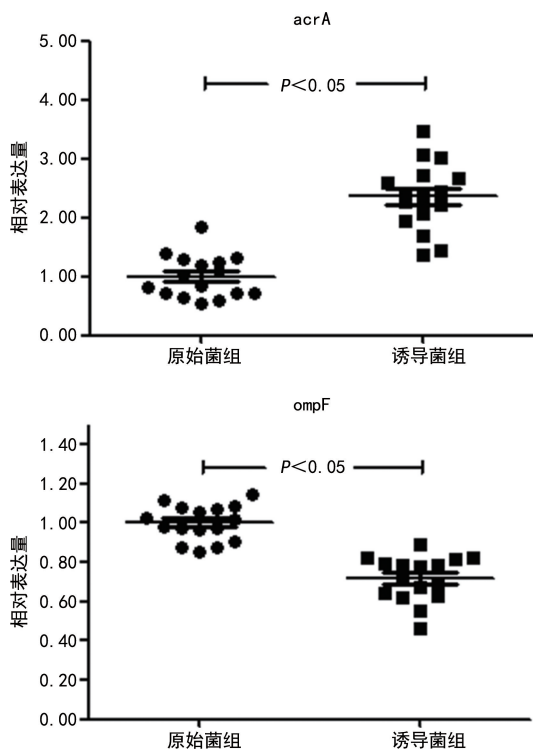


图 3 IPM 诱导对大肠埃希菌 *acrA* 和 *ompF* 基因表达的影响

3 讨论

大肠埃希菌是临床所有分离菌株中检出率最高的细菌^[2],由于产 ESBLs 酶,甚至产 *ampC* 酶、乙酰转移酶和/或氨基糖苷类钝化酶等产酶大肠埃希菌的广泛出现,使得临床使用大部分常见抗生素进行抗感染治疗均达不到理想效果^[11]。此时,碳青霉烯类抗生素常常被临床使用,虽然耐碳青霉烯类大肠埃希菌已经出现,甚至达到了 2% 的检出率^[2],但仍然是治疗产 ESBLs 等酶大肠埃希菌最有效药物。其中亚胺培南是碳青霉烯类抗生素中临床使用率最高一种抗生素,也是第一个批准上市的碳青霉烯类药物^[3,5]。因此,本研究首次实验并分析了在 IPM 作用下,大肠埃希菌膜孔蛋白和外排泵所产生的作用,从而为细菌和抗生素的相互作用机制提供依据,甚至新药的研发提供

帮助,并进行如下讨论分析。

从所选菌株是否产 β -内酰胺酶来看,实验菌中分别为 2 株不产 β -内酰胺酶、2 株只产 ESBLs 酶、2 株只产 *AmpC* 酶和 2 株共产 ESBLs 酶 + *AmpC* 酶菌,使得实验能够多角度观察分析大肠埃希菌在 IPM 治疗下的膜孔蛋白和外排泵的变化。从 IPM 治疗前后菌株的 MIC 值变化来看,不产 β -内酰胺酶菌基本保持不变,产生这种现象的可能原因是仅靠膜孔蛋白基因下调或者外排泵基因上调可能不足以引起碳青霉烯类抗生素有明显变化。而只产 ESBLs 酶/*AmpC* 酶菌有一定变化,变化最大的为产 ESBLs 酶 + *AmpC* 酶菌;其中又以 ETP 的 MIC 值变化最大,甚至有些治疗后的菌达到了耐药水平。产生这种现象的原因可能是 DELPHINE 等^[12]研究发现的 CTX-M 型基因的高表达合并膜孔蛋白下调能够引起 ETP 敏感性下降相关,也可能是部分研究者^[13-14]发现的产 ESBLs 酶和/或 *AmpC* 酶合并膜孔蛋白缺失或外排泵的高表达引起碳青霉烯耐药相关。由于以上原因,相关研究^[15]还建议在临床治疗产 ESBLs 酶和/或 *AmpC* 酶大肠埃希菌时,尽可能少用 ETP 治疗。本研究还发现,在产 ESBLs 酶和/或 *AmpC* 酶大肠埃希菌中,IPM 和 MEM 的 MIC 值也发生了变化,说明在临床使用 IPM 治疗的过程中,对于产 ESBLs 酶和/或 *AmpC* 酶大肠埃希菌,也需要合理用药,否则很容易导致临床抗感染治疗失败,甚至导致耐药菌的出现。

从 IPM 治疗前后菌的膜孔蛋白表达结果来看,*ompC* 基因表达差异无统计学意义,而 *ompF* 基因表达明显下调,且大部分差异有统计学意义。研究^[16-17]表明,*ompF* 是膜孔蛋白中最主要最重要的孔蛋白,大部分抗生素包括 IPM 进入细菌需通过 *ompF*,且膜孔蛋白 *ompF* 的缺失能引起抗生素 MIC 值增高。而本研究第一次探讨了在 IPM 诱导下,大肠埃希菌最开始为了适应和生存在 IPM 环境中,细菌作出的其中一个重要的防御反应为膜孔蛋白 *ompF* 表达下调。从外排泵基因表达结果来看,本研究也第一次探究分析发现在 IPM 治疗下,*macB* 和 *emrA* 基因表达差异无统计学意义,而外排泵 *tolC*、*acrA* 和 *acrB* 基因表达明显增加,且差异有统计学意义,说明 IPM 也能够诱导外排泵基因表达的改变,是大肠埃希菌作出的另一个重要防御反应。相关研究^[10,18]表明外排泵也是控制抗生素进入细菌的重要因素,其中 *acrAB-tolC* 系统是目前为止最主要的与抗生素耐药相关的外排泵系统。

总之,在 IPM 治疗下,产 ESBLs 酶和/或 *ampC* 酶的大肠埃希菌更能引起对碳青霉烯类抗生素 MIC 值的增高,主要是通过膜孔蛋白 *ompF* 基因表达下调和外排泵 *acrAB-tolC* 基因表达上调引起的。进而能够适应碳青霉烯类抗生素,导致临床抗感染治疗失败。因此,临床应当合理使用 IPM,以减少耐碳青霉

烯类大肠埃希菌的流行。这也有助于理解大肠埃希菌最开始为了适应和生存在 IPM 环境中,细菌作出的重要防御反应。

参考文献

- [1] 夏飞,秦涛,张明伟,等.产 ESBL 大肠埃希菌致血流感染的临床特征及危险因素分析[J].中国医院药学杂志,2020,40(3):69-73.
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2020,20(1):1-10.
- [3] 陈志.我院碳青霉烯类抗菌药物及替加环素使用情况分析[J/CD].全科口腔医学电子杂志,2020,7(3):138-142.
- [4] 杨桂玲,高义玲,王贝,等.碳青霉烯类抗菌药物使用现状调查[J].中国医药导刊,2020,22(1):38-42.
- [5] HO C M,HO M W,LIUY C,et al. Correlation between carbapenem consumption and resistance to carbapenems among Enterobacteriaceae isolates collected from patients with intra-abdominal infections at five medical centers in Taiwan,2006—2010[J]. Int J Antimicrob Agents,2012,40(S1):S24-28.
- [6] 何建春,董剑,杨雷,等.血流感染中产 CTX-M 型 ESBLs 大肠埃希菌的分子流行病学和危险因素研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(12):58-62.
- [7] 宋羽希,王琴,胡健,等.碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌分子流行病学分析[J].中国感染与化疗杂志,2020,20(1):60-66.
- [8] 孙坤玲.大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药分子机制研究及碳青霉烯酶表型检测方法评价[D].重庆:重庆医科大学,2017.
- [9] MONICA P,CAMILA V,MARIA A,et al. Molecular mechanisms of membrane impermeability in clinical isolates of Enterobacteriaceae exposed to imipenem selective pressure[J]. Int J Antimicrob Agents,2016,48(1):78-85.
- [10] PU Y,ZHAO Z,LI Y,et al. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance indormant bacterial cells[J]. Molecular Cell,2016,62(2):284-294.
- [11] 王粟,赵虎.碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌临床检测与治疗方案的发展及应用[J].检验医学,2020,35(10):967-970.
- [12] DELPHINE G,LAURENT P,PATRICE N. CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. [J]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53(2):832-834.
- [13] CHANG Y T,SIU L K,WANG J T,et al. Resistance mechanisms and molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible Escherichia coli in Taiwan,2012-2015[J]. Infect Drug Resist,2019,12:2113-2123.
- [14] NASIRI M J,MIRSAEIDI M,MOUSAVIS M J,et al. Prevalence and mechanisms of carbapenem resistance in klebsiella pneumoniae and Escherichia coli;a systematic review and meta-analysis of cross-sectional studies from iran [J]. Microbial Drug Resistance,2020,26(12):1491-1502.
- [15] TSAI Y K,LIOU C H,FUNG C P,et al. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of Klebsiella pneumoniae contribute to varied susceptibility to different carbapenems [J]. PLoS One,2013,8(11):e79640.
- [16] JONATHAN S,DAMIEN J,SYMA K. Outer membrane proteins ompa, fhuA, ompF, esta, btub,and ompx have unique lipopolysaccharide fingerprints[J]. J Chem Theory Comput Actions,2019,15(4):2608-2619.
- [17] CHISTYULIN D K,NOVIKOVA O D,ZELEPUGA E A,et al. An abnormally high closing potential of the OMPF porin channel from Yersinia Ruckeri; the role of charged residues and intramolecular bonds [J]. Acta Naturae,2019,11(3):89-98.
- [18] CHARLERIC B,CHOLLET R,MONIQUE M,et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in Enterobacter aerogenes[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,301(4):985-990.

(收稿日期:2021-02-22 修回日期:2021-09-09)