

铜绿假单胞菌外膜蛋白 D2 与亚胺培南耐药关系的研究*

闫玉兰, 郭世辉, 李 萌, 吴晓宁, 梁宏洁[△] (广西医科大学第一附属医院检验科, 南宁 530021)

【摘要】 目的 研究广西地区铜绿假单胞菌外膜蛋白 D2 (OprD2) 的表达与亚胺培南耐药之间的关系。**方法** 采用 SDS-PAGE 电泳法对提取出的 106 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌的外膜蛋白进行电泳, 并利用水杨酸盐抑制实验确定 OprD2 的位置, 通过凝胶成像系统成像并将其与敏感株比较进行分析。**结果** 106 株耐亚胺培南的铜绿假单胞菌中有 99 株细菌缺失 OprD2。**结论** OprD2 缺失是铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要原因之一。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 耐亚胺培南; 外膜蛋白 D2

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.01.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)01-0013-02

Study on relationship between outer membrane protein D2 of *Pseudomonas aeruginosa* and imipenem-resistance*

YAN Yu-lan, GUO Shi-hui, LI Meng, WU Xiao-ning, LIANG Hong-jie[△] (Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

【Abstract】 Objective To study the relation between the outer membrane protein D2 (OprD2) expression of *Pseudomonas aeruginosa* and imipenem-resistance in Guangxi area. **Methods** The SDS-PAGE electrophoresis was adopted to conduct the electrophoresis on the extracted OprD2 from 106 strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, the salicylates inhibit experiment was used to determine the position of OprD2, then the imaging was performed by the gel imaging system and compared with sensitive strains for conducting analysis. **Results** Among 106 strains of imipenem-resistance *Pseudomonas aeruginosa*, 99 strains lost OprD2. **Conclusion** The OprD2 loss is one of the main reasons of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to imipenem in Guangxi area.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; imipenem-resistance; outer membrane protein D2

铜绿假单胞菌是临床常见的条件致病菌, 常对多种抗菌药物天然耐药, 碳青霉烯类药物[亚胺培南、美罗培南等]是临床用于治疗铜绿假单胞菌感染的常用抗菌药物。然而, 随着碳青霉烯类药物在临床上的广泛应用, 铜绿假单胞菌对此类药物的耐药率也明显升高。有文献报道铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物的耐药主要是由胞壁屏障机制所致, 由碳青霉烯酶所致的耐药只占极少部分^[1]。现将广西地区铜绿假单胞菌中外膜蛋白 D2 (OprD2) 的缺失与亚胺培南耐药之间的关系分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 选择 2011 年 6 月至 2012 年 12 月广西医科大学第一附属医院各科住院患者的各类临床标本。同一患者分离得到的菌株不重复计入。质控标准株 ATCC27853 由卫生部临床检验中心提供。

1.2 主要试剂 水解酪蛋白(MH)琼脂粉(杭州天和微生物试剂有限公司); 抗菌药物亚胺培南粉剂(美国默沙东制药公司); 细菌膜蛋白提取试剂盒购于上海炎彬公司, 蛋白 marker 购于 TaKaRa 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天公司, 考马斯亮蓝快速染色液购于上海双螺旋生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 VITEK 2 和 ATB 鉴定仪(法国梅里埃公司), MINI 垂直电泳槽、恒压恒流电泳仪、凝胶成像分析

(Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 菌株鉴定 用梅里埃的 VITEK-2 和 ATB 鉴定仪进行鉴定。

1.4.2 耐药菌株的筛选 参考美国临床和实验室标准协会(CLSI)2012 年标准, 用琼脂平皿二倍稀释法测定铜绿假单胞菌对亚胺培南的最小抑菌浓度(MIC)值, MIC \geq 8 为耐药。

1.4.3 水杨酸盐抑制实验^[2-3] 将对亚胺培南敏感的铜绿假单胞菌株分别接种于含有和不含 32 mmol/L 水杨酸钠的 MH 平板上, 再将亚胺培南药敏纸片分别贴在两个平板上, 将平板置于 37 °C 培养箱中培养 18~24 h, 观察亚胺培南抑菌圈的大小。

1.4.4 外膜蛋白的提取与制备 根据试剂盒里的说明书提取细菌的膜蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 将蛋白配制成 5.0 mg/mL 的浓度, 并于 -80 °C 储存备用。

1.4.5 蛋白质电泳 将蛋白样品与样品缓冲液以 4 : 1 的比例混匀, 100 °C 加热 5 min 以使蛋白质变性。通过 SDS-PAGE 电泳(分离胶浓度为 10%)分离外膜蛋白, 电泳时浓缩胶的电压为 80 V, 分离胶的电压为 120 V。然后用考马斯亮蓝快速染色液染色、脱色, 并用凝胶成像系统成像。

1.4.6 外膜蛋白位置的确定 将上述在含和不含 32 mmol/L 水杨酸钠的 MH 平板上生长的对亚胺培南敏感的铜绿假单胞

* 基金项目: 广西自然科学基金项目(桂科自 2010GXNSFA013172); 广西卫生厅资助项目(桂卫 Z2010371)。 作者简介: 闫玉兰, 女, 初级检验技师, 硕士研究生, 主要从事临床微生物检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: lianghongjie2004@163.com。

菌分别转到肉汤培养基中,水浴震荡过夜。提取细菌的外膜蛋白并 SDS-PAGE 电泳。利用铜绿假单胞菌 OprD2 能被水杨酸盐抑制的特性^[4]以确定外膜蛋白的位置。

2 结 果

2.1 铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药情况 共检出亚胺培南耐药株 106 株,其对亚胺培南的 MIC 值均大于或等于 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$;30 株亚胺培南敏感株的 MIC 值均小于或等于 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 水杨酸盐抑制实验结果 对亚胺培南敏感的铜绿假单胞菌,在含 32 mmol/L 水杨酸钠的 MH 平板上生长,亚胺培南抑菌圈直径小于或等于 12 mm,即对亚胺培南耐药;而在不含水杨酸钠 MH 平板上生长的亚胺培南的抑菌圈直径大于 25 mm,即对亚胺培南敏感。

2.3 外膜蛋白位置的确定 在含水杨酸钠平板上生长的菌株不表达 OprD2(即 OprD2 蛋白缺失),生长在不含水杨酸钠平板上的菌株则表达 OprD2 蛋白(即 OprD2 蛋白不缺失),由此确定铜绿假单胞菌的 OprD2 的位置。

2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳结果 铜绿假单胞菌 ATCC27853 及亚胺培南敏感株均在 45×10^3 处出现了 OprD2 蛋白条带,在 106 株亚胺培南耐药菌中,有 99 株在 45×10^3 处未出现 OprD2 蛋白条带,缺失率为 86.8%,其余 7 株亚胺培南耐药株未出现 OprD2 的缺失。

3 讨 论

铜绿假单胞菌细胞壁两侧有内、外两层膜,其外膜蛋白本身的通透性不高,缺乏其他多数革兰阴性菌具有的“典型”高通透性孔蛋白,仅存在着低通透性微孔蛋白形成的小孔道,只允许小分子亲水性物质跨膜扩散,对进入菌体的药物具有选择性,因此外膜结构在抗菌药物耐药中担任重要的角色^[4]。铜绿假单胞菌有多种外膜蛋白,其中 OprC(70×10^3)、OprD2(45×10^3)、OprE(43×10^3)均有孔道活性,其中外膜孔蛋白 OprD2 孔道被认为是小分子碳青霉烯类药物选择性快速进入菌体的特异性通道^[5]。

以亚胺培南为代表的碳青霉烯类药物是目前临床用于治疗铜绿假单胞菌感染应用最广也是效果最好的药物之一,亚胺培南药物是以细菌内膜上的青霉素结合蛋白 PBP-2 及 PBP-3 为作用靶位的,但药物必须要通过细菌的外膜才能到达作用靶位,而 OprD2 是亚胺培南进入细菌的特异性通道^[6],编码 OprD2 的结构基因 OprD 位于染色体上,编码基因 OprD 的突变可使 OprD2 蛋白表达减少甚至缺失,所以当 OprD2 缺失或表达减少时可导致菌体外膜通透性改变从而使得碳青霉烯类药物进入菌体受到阻碍,在临床上表现为铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物耐药。除此以外,OprD2 还能形成碳青霉烯类药物特异性结合位点,是目前所知的铜绿假单胞菌中唯一有助于抗菌药物通过的孔道蛋白^[7]。因此,外膜蛋白 OprD2 缺失是介导铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制之一^[8]。而 β -内酰胺类抗菌药物如青霉素或头孢菌素的作用机制是通过抑制胞壁黏肽合成酶,即青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins,PBPs),从而阻碍细胞壁黏肽合成,使细菌胞壁缺损,菌体膨胀裂解。多数青霉素类或头孢菌素类抗菌药物主要与 PBP1 和(或)PBPs 结合,形成丝状体和球形体,使细菌发生变形萎缩,逐渐溶解死亡^[9]。即 β -内酰胺类抗菌药物如青霉素和头孢菌素等不能通过 OprD2,因此,以亚胺培南为代表的碳青

霉烯类药物与 β -内酰胺类药物无交叉耐药性^[10-11]。

本次研究发现,106 株亚胺培南耐药铜绿假单胞菌中,99 株 OprD2 缺失,缺失率为 86.8%,由此可推断 OprD2 的缺失在介导本院铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药中起着重要的作用。其余 7 株亚胺培南耐药株未出现 OprD2 的缺失,说明介导铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的还有其他的机制,如产生 β -内酰胺酶^[12]、主动外排泵的存在等^[13-14]。本次研究中,OprD2 的缺失率为 86.8%,这与颜英俊等^[15]对 34 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌临床标本用 PCR 方法扩增 OprD 基因并对扩增产物进行 DNA 分析后发现,对亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌的 OprD 基因突变率达 92.3%的研究结果相似。颜英俊等的研究还发现 OprD 基因突变的方式主要有点突变、缺失突变以及插入突变等。细菌因发生基因突变而引起 OprD 茎环结构 L2、L3 和亚胺培南药物主要结合位点氨基酸发生替换和移位突变,最终导致铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药^[16]。国外也有与颜英俊类似的报道,如 Yoneyama 等^[17]研究发现,OprD2 基因缺失存在缺失突变,编码区 DNA 片段发生缺失,导致移位突变,并形成 1 个位置提前的新终止密码子进而引起其肽链异常,最终导致铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药^[18]。这说明 OprD2 的缺失是导致铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物耐药的重要机制之一。

本研究 OprD2 缺失率为 86.8%,而 2010 年哈尔滨地区的 OprD2 缺失率为 26.19%(42 株耐亚胺培南菌株中 11 株完全缺失)^[11],2007 年北京一所医院的 OprD2 缺失率为 56.10%^[19],这与本研究的 OprD2 缺失率有差异,可能是地区不同而导致的差异或研究的年份不同而导致的差异。本研究只是针对广西地区耐亚胺培南的铜绿假单胞菌进行耐药机制的研究,对 OprD2 的缺失仅作了定性分析,OprD2 的表达量与铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药程度之间的关系有待作进一步研究。

参考文献

- [1] 康梅,陈慧莉,过孝静,等.产金属酶的革兰阴性杆菌的表型筛选[J].华西医学,2003,18(3):359.
- [2] Yoshihara E,Nakae T. Identification of porins in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* that form small diffusion pores[J]. J Biol Chem,1989,264(11):6297-6301.
- [3] Sumita Y,Fukasawa M. Transient carbapenem resistance induced by salicylate in *Pseudomonas aeruginosa* associated with suppression of outer membrane protein D2 synthesis [J]. Antimicrob Agents Chemother,1993,37(12):2743-2746.
- [4] Li H,Luo YF,Williams BJ,et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies[J]. Int J Med Microbiol,2012,302(2):63-68.
- [5] 陈瑞,唐英春,朱家馨,等.水杨酸盐体外抑制铜绿假单胞菌外膜蛋白 OprD2 的表达[J].中华医院感染学杂志,2004,14(11):1204-1206.
- [6] Och MM,Mc Cusker MP,Bains M,et al. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic (下转第 17 页)

明显升高,但 FPG 由于受到饮食、疾病等因素影响,波动性大,重复性不佳,而 GSP 是血清中蛋白质与葡萄糖发生非酶促反应的产物,反映糖尿病患者 2~3 周内的平均血糖水平,其指标较稳定,不受前一天饮食等因素的影响,较 FPG 更适于作为危险分层的指标。本研究将 T2DM 患者的 GSP 值以 10 μmol/L 分层,发现 GSP>220 μmol/L 时,T2DM 患者接受冠状动脉介入治疗围术期出现不良预后事件的例数明显增加;其相对风险为 GSP≤220 μmol/L T2DM 患者的 2.69 倍。所以,在对糖尿病合并冠心病的患者进行冠状动脉介入治疗之前,临床医师可将 GSP 作为危险度分层指标,尽早筛查高危患者,根据病情给予强化治疗,达到改善患者预后的目的。

糖尿病合并冠心病患者接受冠状动脉介入治疗时较无糖尿病患者更易发生围术期并发症。在对糖尿病患者接受冠状动脉介入治疗前常规检查血糖及 HbA1c 等指标外,测定 GSP 可能对围术期预后具有危险度分层的作用。

参考文献

[1] Schalkwijk CG, Liew-a-Fa M, van Hinsbergh VW, et al. Pathophysiological role of Amadori-glycated proteins in diabetic microangiopathy[J]. *Semin Vasc Med*, 2002, 2(2):191-197.

[2] Fukushima Y, Daida H, Morimoto T, et al. Relationship between advanced glycation end products and plaque progression in patients with acute coronary syndrome; the JAPAN-ACS Sub-study[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12:5-10.

[3] Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, et al. Vascular smooth

muscle cell activation by glycated albumin(Amadori adducts)[J]. *Hypertension*, 2002, 39(1):22-28.

[4] Settler C, Allemann S, Wandel S, et al. Drug eluting and bare metal stents in people with and without diabetes; collaborative network meta-analysis[J]. *BMJ*, 2008, 337: 1331-1341.

[5] Sato T, Ono T, Morimoto Y, et al. Differences in clinical and angiographic outcomes with different drug-eluting stents in Japanese patients with and without diabetes mellitus[J]. *J Cardiol*, 2012, 60(5):361-366.

[6] Marfella R, Sasso FC, Siniscalchi M, et al. Peri-procedural tight glycemic control during early percutaneous coronary intervention is associated with a lower rate of in-stent restenosis in patients with acute ST-elevation myocardial infarction[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(8):2862-2871.

[7] Nusca A, Patti G, Marino F, et al. Prognostic role of pre-procedural glucose levels on short-and long-term outcome in patients undergoing percutaneous coronary revascularization[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2012, 80(3):377-384.

[8] Zhang QY, Li Y, Guan SY, et al. Incidence and predictors of definite stent thrombosis after coronary stent implantation[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2012, 125(9):1547-1551.

(收稿日期:2013-05-22 修回日期:2013-08-29)

(上接第 14 页)

amino acids[J]. *Antimicrob Agents Chmother*, 1999, 43(5):1085-1090.

[7] Adewoye L, Suherland A, Srikumar R, et al. The mexR repressor of the MexAB-OprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity[J]. *Bacteriol*, 2002, 184(15):4308-4312.

[8] Kohler T, Michea-Hamzhepour M, Epp SF, et al. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of oprD and efflux systems[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(2):424-427.

[9] 于海军. β-内酰胺类抗生素作用机制及头孢菌素发展[J]. *石家庄职业技术学院学报*, 2009, 21(2):12-16.

[10] Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(1):147-151.

[11] 多丽波,张联博,栾英,等. 哈尔滨地区铜绿假单胞菌外膜蛋白 D2 与亚胺培南耐药关系研究[J]. *临床检验杂志*, 2010, 28(2):147-148.

[12] Strateva T, Ouzounova-Raykova V, Markova B, et al. Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum β-lactamases among nosocomial ceftazidim-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate in Sofia Bulgaria[J]. *J*

Chemother, 2007, 19(2):140-145.

[13] 李红玲,廖康,陈亚岗,等. 碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌外排泵和外膜孔蛋白表达水平的研究[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2008, 8(6):414-418.

[14] Morita Y, Kimura N, Mima T, et al. Roles of Mex-XY and Mex-AB multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2001, 47(1):27-32.

[15] 颜英俊,喻华,周忠华,等. 亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌 oprD 基因突变的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(4):451-454.

[16] 何萍,丁云芳. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(8):850-851.

[17] Yoneyama H, Nakae T. Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 37(11):2385-2390.

[18] 吴伟清,李国明. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 18(22):2812-2815.

[19] 衣美英,刘迎春,王鹏远,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌外膜孔蛋白与 β-内酰胺酶研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(10):1198-1203.

(收稿日期:2013-06-22 修回日期:2013-09-01)