

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.03.005

粉防己提取液对大肠埃希菌 AcrAB-TolC 外排泵调控基因的影响研究^①

乐小丽, 曾杨梅, 陈红伟, 张常华,
杨 森, 金顺鑫, 吴俊伟

西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460

摘要: 目的: 为考察粉防己提取液致耐药大肠埃希菌外排泵表达量的下降是否由其外排泵调控基因 *acrR* 和 *marR* 基因突变引起. 方法: 选取临床对喹诺酮类药物耐药性较强的大肠埃希菌菌株 25-1,4-5,72-1,79 和质控菌 ATCC25922 作为受试菌, 用粉防己提取液进行处理, 并分析其多重耐药抑制基因 *marR* 和 *acrAB* 外排泵抑制基因 *acrR* 的突变情况. 结果: 耐药大肠埃希菌在粉防己提取液处理后, 乳酸环丙沙星对其 MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 值明显降低, 且其 *acrR* 和 *marR* 基因序列较处理前有多处明显突变. 结论: 中药粉防己提取液可能具有逆转大肠埃希菌喹诺酮类药物耐药性的作用.

关键词: 粉防己; 大肠埃希菌; 外排泵; *acrR* 基因; *marR* 基因

中图分类号: S853.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)03-0028-06

由于抗菌药物持续、广泛地使用, 致病菌对抗菌药物的耐药性日益严重, 在很大程度上影响药物的临床疗效. 大肠埃希菌作为人畜常见条件致病菌之一, 已产生了非常严重的耐药性, 导致临床治疗失败. 大肠埃希菌耐药性主要与其外排系统有关, 有研究结果提示 AcrAB-TolC 外排泵是大肠埃希菌最主要的药物外排泵^[1], 也是目前研究最深入的外排泵, 其表达受多种调控因子如 *marA*、*soxS*、*rob*、*acrR* 等的影响^[2]. *acrR* 是位于 *acrAB* 基因上游的一个阻遏子基因的产物, 对 *acrAB* 转录起一定程度的抑制作用, *acrR* 突变可使 *acrAB* 转录增加, *acrAB* 表达水平提高^[3-4]. *marR* 基因发生点突变可引起 *marA* 的过量表达, *marA* 是转录时的催化剂, 突变可使 *acrAB* 的表达增加^[5], *acrR* 和 *marR* 的共同突变可提高大肠埃希菌对多种抗生素的耐药性^[6].

前期的相关研究表明, 经粉防己提取液处理过的大肠埃希菌, 其外排泵基因 *acrA* 表达量会相应降低^[7], 为进一步研究其降低的原因, 本试验扩增大肠埃希菌的外排泵调控基因 *acrR* 和 *marR*, 通过对 *acrR* 和 *marR* 基因测序分析, 推测粉防己提取液逆转大肠埃希菌多重耐药性与 *acrR* 和 *marR* 基因突变的相关性, 以期为进一步研究粉防己作为外排抑制剂奠定理论基础.

1 材 料

1.1 菌 种

临床分离耐氟喹诺酮类药物的大肠埃希菌菌株 25-1,4-5,72-1,79, 由西南大学荣昌校区药学教研室提

① 收稿日期: 2015-02-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372483).

作者简介: 乐小丽(1989-), 女, 福建尤溪人, 硕士, 主要从事兽药研究.

通信作者: 吴俊伟, 教授.

供;质控菌 ATCC25922,购自中国兽医药品监察所.

1.2 药材与试剂

粉防己,购自重庆市荣昌县东升堂大药房;普通肉汤培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司;麦康凯琼脂培养基,杭州微生物试剂有限公司;标准 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs、溶菌酶、蛋白酶 K,均购自北京基因组研究所;PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;大肠埃希菌基因组 DNA 提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒,购自上海生工生物工程技术有限公司.

1.3 仪器

LRH-150 型生化培养箱:上海一恒科技有限公司;DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱:上海一恒科技有限公司;YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸汽灭菌器:上海博讯实业有限公司;SWCFCO 超净工作台:苏州净化设备有限公司;JA5003G 电子天平:上海精密科学仪器有限公司;微量移液器:德国 Eppendorf 公司;S1000TM Thermal Cycler PCR 仪:Bio-Rad Laboratories Inc;TG16-W 型高速台式离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;ZD-85 型气浴恒温振荡器:金坛市金城国胜实验仪器厂;DW-86W420 低温冰箱;海尔集团.

2 方法

2.1 粉防己提取液的制备及成分确认

采用醇提水沉法提取粉防己^[8].称取干燥粉防己生药 50 g,加适量 95%乙醇浸没药材,浸渍 30 min 后置于回流装置中,回流煎煮 2 次,每次 1 h,合并滤液,浓缩、水沉、过滤、再浓缩后定容至 50 mL,使其含生药 1 g/mL,灭菌,得到粉防己提取物受试液.将该受试液体参照中国兽药典进行主要成分的薄层色谱鉴定,以确认其含有粉防己主要成分.

2.2 药敏试验

2.2.1 分别测定乳酸环丙沙星、粉防己提取液的 MIC

采用试管二倍稀释法分别测定乳酸环丙沙星、粉防己提取液最小抑菌质量浓度 MIC,用 LB 培养基对原始药液采用试管二倍稀释法进行稀释,最终稀释的质量浓度分别为 500,250,125,62.5,31.25,15.6,7.8 mg/mL.每个试验重复 3 次,每次设 3 个对照组:菌液对照为接种同数量的多重耐药菌液,不加药液;培养基对照为不接种多重耐药菌液,不加药液;药物对照不加菌液只加适量药液;37 °C 培养 18 h,确定亚抑菌质量浓度^[9].

2.2.2 亚抑菌质量浓度逆转大肠埃希菌耐药性

用含有亚抑菌质量浓度的粉防己提取液的培养基持续传代 3 次培养耐药菌株,每传代培养 1 次后测定乳酸环丙沙星对该次培养细菌的 MIC.

2.3 亚抑菌质量浓度粉防己提取液作用前后大肠埃希菌基因组 DNA 的提取

取 2.2.2 中传代培养 3 次后的菌株,培养 5 mL 至饱和状态,取 1 mL 8 h 培养的细菌菌液,加入 1.5 mL 离心管中,室温 8 000 r/min 离心 1 min,弃上清,收集菌体.加入 400 μ L Buffer Digestion,震荡混匀.65 °C 水浴 1 h 至细胞完全裂解.加入 200 μ L Buffer PB,充分颠倒混匀,-20 °C 冰箱放置 5 min.室温 10 000 r/min 离心 5 min,将上清液(500~550 μ L)转移到新的 1.5 mL 离心管中.加入等体积的异丙醇,颠倒 5~8 次使之充分混匀,室温放置 2~3 min.室温 10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 75%乙醇,颠倒漂洗 1~3 min,10 000 r/min 离心 2 min,弃上清,并重复此步骤 1 次.开盖室温倒置 5~10 min 至残留的乙醇完全挥发(TE Buffer 为 10 mM Tris-HCl,1 mM EDTA,pH=8.0).提取出的 DNA 置 -20 °C 冰箱保存备用.

2.4 引物设计与合成

参照基因库中 *marR* 和 *acrR* 的全序列,引用参考文献[7]中的引物,*acrR* 和 *marR* 基因的扩增引物见表 1.

2.5 亚抑菌质量浓度粉防己作用前后大肠埃希菌 *acrR* 和 *marR* 基因扩增

从 GenBank 中查到大肠埃希菌 *acrR* 和 *marR* 基因序列, 借助计算机软件设计引物, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 以大肠埃希菌基因组作为模板。

2.6 *acrR* 和 *marA* 基因 PCR 产物测序及序列分析

由上海生工生物工程技术有限公司完成测序, 用 DNASTAR 软件进行序列分析。

表 1 *acrR* 和 *marR* 基因 PCR 扩增引物

名称/bp	序 列	长度/bp	扩增片段
<i>acrR</i> (upper)	P3 5'-CTGAACCTGAAGAACGACCTG-3'	21	1 000
<i>acrR</i> (lower)	P4 5'-ACTGTTACTACGCCAACG-3'	18	
<i>marR</i> (upper)	P1 5'-GCCAGGCCAAGAAATAACGC-3'	20	900
<i>marR</i> (lower)	P2 5'-CCGTTACCAGCAGGTTAGG-3'	20	

3 结 果

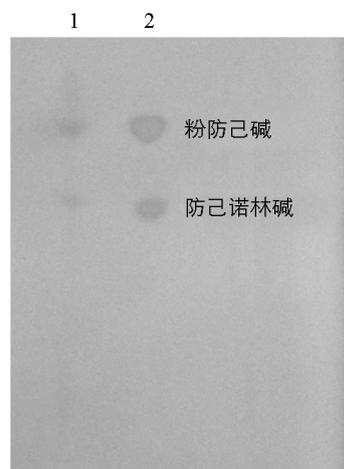
3.1 粉防己提取液的成分鉴定

从图 1 可以看出, 提取物含有粉防己的 2 种主要有效成分粉防己碱和防己诺林碱。

3.2 药敏试验

3.2.1 乳酸环丙沙星、粉防己提取液 MIC 值

乳酸环丙沙星及粉防己提取液对质控菌 ATCC25922 和临床分离菌 72-1, 25-1, 79, 4-5 号菌株的最小抑菌质量浓度 MIC 如表 2 所示, 取各菌株的 0.5 MIC 即为其亚抑菌质量浓度, 该质量浓度即为处理各菌株的药物质量浓度。



1. 提取液; 2. 粉防己对照品。

图 1 粉防己提取液薄层色谱图

表 2 乳酸环丙沙星和粉防己提取液对各菌株的 MIC 值

药 液	菌 株				
	ATCC25922	72-1	25-1	79	4-5
乳酸环丙沙星	0.0078	250	125	125	500
粉防己提取液	250	500	500	500	>500

3.2.2 乳酸环丙沙星对亚抑菌质量浓度粉防己提取液处理后菌株的 MIC 值

表 3 乳酸环丙沙星对亚抑菌质量浓度粉防己提取液处理后菌株 MIC 值

药 液	菌 株				
	ATCC25922	72-1	25-1	79	4-5
乳酸环丙沙星	0.0078	15.6	31.25	31.25	31.25

3.3 DNA 提取及 PCR 产物结果

acrR 和 *marR* 基因提取结果符合要求, 粉防己提取液处理前后各菌株 *acrR* 和 *marR* 基因 PCR 产物结果符合要求, PCR 扩增后对其产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, *acrR* 和 *marR* 基因分别在 1 000 bp 和 900 bp 处出现明显的特异性条带(图 2)。

3.4 粉防己处理前后各菌株 *acrR* 和 *marR* 基因序列比对结果

3.4.1 各菌株 *acrR* 基因序列比对结果

粉防己提取液处理后 25-1 菌株的 16 位碱基 A 和 935 位碱基 T 缺失, 934 位碱基由 T 突变为 A(图 3); 4-5 菌株 935 位碱基 T 缺失(图 3); 72-1 菌株 16 位碱基 A 缺失, 935 位碱基 T 缺失; 79 菌株 13 位碱基 A

4 分析与讨论

4.1 粉防己提取液的主要成分是耐药逆转的作用基础

粉防己又名汉防己、白木香^[10],含有粉防己碱、防己诺林碱、轮环藤酚碱、二甲基粉防己碱及小檗胺等多种有效成分,临床应用范围广,可用于抗炎、抗过敏;解热、利尿及抗休克作用;对血小板作用凝集有抑制作用;抗癌作用^[11].其中粉防己(碱)甲素为其主要成分,有报道其对癌细胞外排抗癌药物具有逆转作用^[12],因此其有可能是引起大肠埃希菌外排泵调控基因突变的主要成分,为此控制提取液中该成分具有重要的作用.薄层色谱证明该提取液中含有这一成分.

4.2 AcrAB-TolC 调控基因 *acrR*、*marR* 的突变对耐药性的影响

通过对粉防己提取液处理前后临床分离,4株耐药菌的MIC值都有明显降低,其中73-2菌株为单一外排耐药机制,因此其效果最佳,其他菌株分别也有4~16倍的降低,从*acrR*和*marR*基因产物的序列分析可以看出,多重耐药大肠埃希菌外排泵调控基因中*acrR*和*marR*基因都发生了多个碱基突变.在所有试验菌株中*acrR*基因的935位碱基T均消失,有3株耐药菌和质控菌的16位碱基A消失或发生变化,这两位点的碱基突变有可能与其调控外排泵的表达量具有相关性.而*marR*基因的碱基在多数试验菌株中也发生了不一样的突变,缺乏共性,是否对外排泵的表达量产生影响还不能确定,有待进一步研究.试验结果说明粉防己对外排泵过度表达引起的大肠埃希菌耐药性有一定的逆转作用.本试验所选粉防己属于粗提物,对试验过程中的亚抑菌质量浓度测定及基因组DNA的提取可能会有一定的影响^[7],为此后期将加大对单一有效成分作用的进一步研究.

4.3 逆转 AcrAB-TolC 外排泵功能的意义

相关研究表明,抑制AcrAB-TolC外排系统的活性、改变其结构及降低其表达水平,都可使大肠埃希菌对环境的适应能力及抗生素耐药水平下降^[13].在本试验中粉防己使大肠埃希菌多重耐药外排泵抑制基因*acrR*和*marR*发生突变,从而说明粉防己使大肠埃希菌对喹诺酮类药物的耐药性有一定的逆转作用,为此可以初步预测前期粉防己处理导致大肠埃希菌外排泵表达量的下降,是由外排泵调控基因*acrR*的突变所致.已有文献报道大肠埃希菌的多重耐药性主要与AcrAB-TolC外排系统有关,但菌体细胞膜通透性的改变与主动外排系统的超量表达共同作用,可引起细菌对多重抗菌药高频率、高水平的耐药,而耐药性质粒的存在可能使多重耐药水平提高数倍^[14].至于这些过程的相互作用机理及粉防己是否也通过调节这些作用过程而起到抑菌作用,还需进一步研究.

本试验用中药粉防己处理多重耐药大肠埃希菌和质控菌株ATCC25922,其*acrR*基因的935位碱基T、16位碱基A均消失,说明粉防己对细菌外排调控基因的作用没有选择性,其是否对其他外排泵的调控基因具有相似作用还有待进一步研究.

参考文献:

- [1] SULAVIK M C, HOUSEWEART C, CRAMER C, et al. Antibiotic Susceptibility Profiles of Escherichia Coli Strains Lacking Multidrug Efflux Pump Genes [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 1126-1136.
- [2] 张海旺,张丽云,刘旭东,等.大肠杆菌*acrA*基因的克隆、表达、抗体制备及不同耐药水平大肠杆菌AcrA表达水平的检测[J].中国预防兽医学报,2006,28(3):279-284.
- [3] 佟海山,李乾学,邓彦宏,等.大肠杆菌多重耐药调节基因AcrR和MarR突变[J].中国兽医杂志,2007,43(7):10-12.
- [4] 马红霞,马述清,刘玉堂,等.大肠埃希菌AcrAB-TolC外排泵表达水平调控机制的研究进展[J].中国抗生素杂志,2008,33(8):449-452.
- [5] COHEN S P, HACHLER H, LEVY S B. Genetic and Functional Analysis of the Multiple Antibiotic Resistance (*mar*) Locus in Escherichia Coli [J]. J Bacteriol, 1993, 175(5): 1484-1492.
- [6] MA D, ALBERTI M, LYNCH C, et al. The Local Repressor AcrR Plays a Modulating Role in the Regulation of *acrAB*

- Genes of *Escherichia coli* by Global Stress Signals [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 19(1): 101–112.
- [7] 张 静, 张梦华, 刘晴晴, 等. 中药提取物对耐药大肠杆菌 MIC 及 *acrA* 基因表达量的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(5): 728–732.
- [8] 任玲玲, 关立增, 连翘对大肠埃希菌多重耐药基因 *AcrA* 的影响研究 [J]. *动物医学进展*, 2008, 29(5): 43–45.
- [9] 白 华, 齐 静, 朱小玲, 等. 恩诺沙星对大肠杆菌全基因组表达谱的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 35(10): 1537–1544.
- [10] 王洪鹏, 叶 琳, 王 驰, 等. 粉防己碱与抗肿瘤药物相互作用对 HNE-1 细胞周期的影响 [J]. *中国中医急症*, 2010, 19(3): 481–482.
- [11] 叶 琳, 王 驰, 陈鸿雁, 等. 氧化苦参碱和粉防己碱对鼻咽癌耐药细胞株的耐药逆转作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(11): 967–970.
- [12] 顾建华, 郭仁德, 张志斌, 等. 汉防己甲素对人胰腺癌耐药细胞株 SW1990-GEM 多药耐药性的逆转机制 [J]. *天津医药*, 2013, 41(1): 48–51.
- [13] 贺政新, 贾克然, 徐 铮. 大肠埃希菌多重药物外排泵 *AcrAB-TolC* 研究进展 [J]. *华北国防医药*, 2004, 16(2): 87–90.
- [14] WHITE D G, GOLDMAN J D, DEMPLE B, et al. Role of the *AcrAB* Locus in Organic Solvent Tolerance Mediated by Expression of *MarA*, *SoxS*, or *RobA* in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(19): 6122–6126.

Study on the Effects of *Stephania Tetrandra* Extract on *AcrAB-TolC* Efflux Pump Regulatory Gene in *Escherichia coli*

LE Xiao-li, ZENG Yang-mei, CHEN Hong-wei, ZHANG Chang-hua,
YANG Sen, JIN Shun-xin, WU Jun-wei

Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: Objective: To study if the mutation(s) of *acrR* and *marR* genes could lead to a decrease in the efflux pump expression quantity by *Stephania tetrandra* extract treatment in drug-resistant *Escherichia coli*. Methods: The *E. coli* strains 25-1, 4-5, 72-1 and 79, which are clinically tolerant to quinolones drugs, were treated with *S. tetrandra* extract, while the quality-control strain ATCC25922 was used as the control. Then the mutations of *acrR* and *marR* genes were analyzed. Results: The MIC values for ciprofloxacin of the tolerant strains significantly decreased after *S. tetrandra* extract treatment, and a number of obvious mutations were detected in *acrR* and *marR* genes. Conclusion: *S. tetrandra* extract may reverse the tolerance to quinolones drugs of *E. coli*.

Key words: *Stephania tetrandra*; *Escherichia coli*; efflux pump; *acrR*; *marR*

责任编辑 夏 娟

