

MTHFR和MTRR基因多态性与陕西地区汉族人群冠心病发生的相关性研究

白晓丹^{1*}, 赵超², 刘琳娜^{1#} (1.空军军医大学第二附属医院药剂科, 西安 710038; 2.空军军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032)

中图分类号 R968;R541.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3125-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.22

摘要 目的:探讨5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(*MTHFR*)和甲硫氨酸合成酶还原酶(*MTRR*)基因多态性与陕西地区汉族人群冠心病发生的相关性。方法:选取2016年11月—2017年5月于空军军医大学第二附属医院心内科就诊的陕西地区汉族冠心病患者350例,作为病例组;选取同期于该院行体检的陕西地区汉族健康受试者347例,作为对照组。采用聚合酶链反应法检测各受试者*MTHFR*基因C677T、A1298C位点以及*MTRR*基因A66G位点的基因型,比较两组受试者各基因型及等位基因分布的差异,考察其基因多态性与冠心病发生的相关性。结果:共检出*MTHFR*基因C677T位点CC、CT、TT型,*MTHFR*基因A1298C位点AA、AC、CC型,*MTRR*基因A66G位点AA、AG、GG型等基因型。其中,对照组受试者C677T位点CC、CT、TT型分布频率分别为26.80%、44.96%、28.24%,A1298C位点AA、AC、CC型分布频率分别为71.18%、24.78%、4.04%,A66G位点AA、AG、GG型分布频率分别为54.47%、38.62%、6.91%;病例组受试者C677T位点CC、CT、TT型分布频率分别为15.43%、49.71%、34.86%,A1298C位点AA、AC、CC型分布频率分别为77.14%、21.71%、1.15%,A66G位点AA、AG、GG型分布频率分别为54.57%、38.29%、7.14%。两组受试者各基因型分布频率均符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$)。两组受试者C677T、A1298C位点各基因型分布频率及等位基因频率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),其中对照组受试者C677T位点CC型分布频率及C等位基因频率、A1298C位点CC型分布频率及C等位基因频率均显著高于病例组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。两组受试者A66G位点各基因型分布频率及等位基因频率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:陕西地区汉族人群*MTHFR*基因C677T位点以突变型居多,A1298C位点以野生型居多;上述两个位点的多态性可能与该类人群冠心病的发生有关,其中C677T位点突变可能是冠心病发生的危险因素之一,A1298C位点突变则可能是有益因素。而*MTRR*基因A66G位点多态性可能与该类人群冠心病的发生无关。

关键词 陕西地区;汉族;5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因;甲硫氨酸合成酶还原酶基因;C677T;A1298C;A66G;基因多态性;冠心病;相关性

Study on Correlation of Gene Polymorphism of *MTHFR* and *MTRR* with the Occurrence of Coronary Heart Disease in Han Population in Shaanxi Area

BAI Xiaodan¹, ZHAO Chao², LIU Linna¹ (1. Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710038, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the correlation of gene polymorphism of *MTHFR* and *MTRR* with the occurrence of coronary heart disease in Han population in Shaanxi area. METHODS: Totally 350 Shaanxi Han patients with coronary heart disease were selected from cardiovascular department of the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University during Nov. 2016-May 2017 as case group. Totally 347 Shaanxi Han healthy volunteers were selected from the hospital in the same period as control group. The genotypes of *MTHFR* gene C677T, A1298C site and *MTRR* gene A66G site were detected by PCR assay. The genotype and allelic distribution were compared between 2 groups. The relationship between gene polymorphism and the occurrence of coronary heart disease was investigated. RESULTS: CC, CT and TT genotype in *MTHFR* gene C677T site, AA, AC and CC genotype in *MTHFR* gene A1298C site as well as AA, AG, GG genotype in *MTRR* gene A66G site were detected. In control group, the frequencies of CC, CT and TT genotype in C677T site were 26.80%, 44.96%, 28.24%; the frequencies of AA, AC and CC genotype in A1298C site were 71.18%, 24.78%, 4.04%; and the frequencies of AA, AG and GG genotype in A66G site were 54.47%, 38.62%, 6.91%, respectively. In case group, the frequencies of CC, CT and TT genotype in C677T site were 15.43%, 49.71%, 34.86%; the frequencies of AA, AC and CC genotype in A1298C site were 77.14%, 21.71%, 1.15%; and the frequencies of AA, AG and GG genotype in A66G site were 54.57%, 38.29%, 7.14%, respectively. The frequencies of genotype distribution in 2 groups were all in line with the Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$). There was statistical

* 主管药师,硕士。研究方向:遗传药理学。电话:029-84777541。E-mail: xunzhaojane@163.com

通信作者:副主任药师,博士。研究方向:中药药理学、分子药理学。电话:029-84777631。E-mail: liulinna@fimmu.edu.cn

significance in genotype distribution frequencies and allele frequencies in C677T and A1298C site between 2 groups ($P < 0.05$). The frequencies of CC genotype distribution and C allele in C677T site, the frequencies of CC genotype distribution and C allele in A1298C site in control group were significantly higher than case group, with statistical significance ($P < 0.05$). There was no statistical significance in genotype distribution frequencies or allele frequencies in A66G site between 2 groups ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: *MTHFR* gene is mainly mutant type in C677T site and wild type in A1298C site among Han population in Shaanxi area. Gene polymorphism of above two sites may be associated with the occurrence of coronary heart disease; C677T site mutation may be a risk factor for coronary heart disease, while A1298C site mutation may be a beneficial factor. *MTRR* gene polymorphism in A66G site maybe has no relationship with coronary heart disease in the population.

KEYWORDS Shaanxi area; Han population; *MTHFR* gene; *MTRR* gene; C677T; A1298C; A66G; Gene polymorphism; Coronary heart disease; Relationship

5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)和甲硫氨酸合成酶还原酶(MTRR)是甲硫氨酸-叶酸代谢系统中的关键酶,在维持叶酸正常代谢的过程中具有重要作用^[1]。*MTHFR*基因C677T、A1298C位点以及*MTRR*基因A66G位点的多态性会影响MTHFR和MTRR酶的活性,造成机体叶酸代谢异常^[2-3],而叶酸代谢异常可进一步导致同型半胱氨酸(Hcy)水平升高,后者与冠心病的发生密切相关^[4];同时,有学者发现,*MTHFR*基因C677T位点多态性是早发冠心病的危险因素,可作为该疾病的独立预测因子^[5-6]。目前,临床对*MTHFR*和*MTRR*基因位点突变与冠心病发生的相关性研究较少,且不同种族和地区人群相关基因的多态性分布也存在一定差异^[7-8]。为此,本研究对陕西地区汉族人群*MTHFR*和*MTRR*基因的多态性进行检测,初步探讨其与该类人群冠心病发生的相关性,以为当地冠心病防治及叶酸等补充治疗提供参考。

1 材料

7500型荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司);5452型离心机(德国Eppendorf公司,离心半径:6 cm);MX-S型涡旋振荡仪(大龙医疗器械有限公司);HH-1A型水浴锅(常州万合仪器制造有限公司)。

DNA提取试剂(批号:20160302、20170209,含蛋白酶K、缓冲液BE、活化液BH₁、活化液BH₂、缓冲液BW₁、缓冲液BW₂、洗脱液BE)、吸附柱均由上海百傲科技股份有限公司提供;PCR扩增试剂(批号:20160523、20161217,含反应预混液1、反应预混液2、聚合酶预混液、质控品1和质控品2)由陕西佰美基因股份有限公司提供;其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 资料与方法

2.1 研究对象

选取2016年11月—2017年5月于空军军医大学第二附属医院心内科就诊的冠心病患者为病例组。纳入标准:(1)符合1979年世界卫生组织(WHO)修订的冠心病诊断标准^[9];(2)汉族;(3)陕西地区常住人口。排除标准:(1)预计生存期短于1年者;(2)严重烟酒嗜好者;(3)伴有甲状腺功能异常及其他代谢相关性疾病者。

选取同期于该院行体检的健康者为对照组。纳入标准:(1)无冠心病及其他心脑血管疾病;(2)汉族;(3)陕西地区常住人口。排除标准:(1)严重烟酒嗜好者;(2)有甲状腺功能异常及其他代谢相关性疾病者。

本研究方案经医院医学伦理委员会审核通过。因本研究对受试者几乎没有风险,故豁免了其知情同意。

2.2 血样采集

采集所有受试者的外周静脉血2 mL,置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,于-20℃下冷冻保存,备用。

2.3 DNA提取与扩增

2.3.1 吸附柱活化 向吸附柱中加入活化液BH₁ 500 μL,静置2~3 min,以12 000 r/min离心30 s后,弃去上清液;随后加入活化液BH₂ 500 μL,以12 000 r/min离心30 s后,弃去上清液,即得活化后的吸附柱,备用。

2.3.2 DNA提取 向离心管中依次加入蛋白酶K 20 μL、经EDTA抗凝的全血样品200 μL,加入缓冲液BL (pH=6) 200 μL,涡旋振荡15 s、低速离心(转速:7 000~8 000 r/min,下同)7~8 s后,置于56℃水浴锅中加热10 min以裂解细胞。取出离心管,冷却至室温后,加入无水乙醇200 μL,充分混匀,涡旋振荡15 s、低速离心7~8 s。取上清液至已活化的吸附柱中,以12 000 r/min离心1 min后,依次加入缓冲液BW₁、BW₂(pH均为6)各500 μL,以12 000 r/min离心1 min;取出吸附柱,置于另一离心管中,开盖挥发溶剂2~3 min,加入洗脱液BE 60 μL,于56℃水浴锅中加热5 min后,以12 000 r/min离心1 min,留取上清液,即得受试者DNA样品,备用。

2.3.3 DNA扩增 采用PCR法。引物由陕西佰美基因股份有限公司设计并合成。PCR反应体系:反应预混液1和反应预混液2各14.75 μL(上述预混液中含有位点特异性引物、内标引物、荧光探针、dNTPs、缓冲溶液等)、聚合酶预混液0.25 μL(含DNA聚合酶)、DNA模板5 μL(质控品反应体系则对应加入相同剂量的质控品,不加DNA模板)。扩增条件:95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火40 s,共40个循环。严格按照PCR扩增试剂说明书操作。

2.3.4 结果判定 参考文献[10-11],分别根据各位点反应体系两个孔道检测信号的循环阈值(Ct)的差值进行检测结果判定:若两个孔道均正常扩增,其差值的绝对值小于3,则样本为突变杂合型;若只有加入反应预混液1的孔道正常扩增,或两个孔道均正常扩增且加入反应预混液2孔道的Ct值与加入反应预混液1孔道的Ct值的差值大于3,则样本为野生纯合型;若只有加入反应预混液2的孔道正常扩增,或两个孔道均正常扩增且加入

反应预混液1孔道的Ct值与加入反应预混液2孔道的Ct值的差值大于3,则样本为突变纯合型。

2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。采用 χ^2 检验考察受试者基因型频率是否符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律(HWE)。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两组受试者的基本资料

对照组共纳入健康者347例,其中男性209例、女性138例,平均年龄(61 ± 14)岁;病例组共纳入冠心病患者350例,其中男性255例、女性95例,平均年龄(65 ± 12)岁。两组受试者的性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

3.2 HWE检验结果

共检出MTHFR基因C677T位点3种基因型:CC(野生纯合)型、CT(突变杂合)型、TT(突变纯合)型,A1298C位点3种基因型:AA(野生纯合)型、AC(突变杂合)型、CC(突变纯合)型;共检出MTRR基因A66G位点3种基因型:AA(野生纯合)型、AG(突变杂合)型、GG(突变纯合)型。

HWE检验结果显示,对照组、病例组受试者MTHFR基因C677T、A1298C位点以及MTRR基因A66G位点各基因型频率实测值与理论值的吻合度良好,其频率均符合HWE($P > 0.05$),表明样本来自于一个较大的且处于随机婚配平衡状态的群体,具有一定代表性,详见表1。

表1 两组受试者各基因型频率HWE检验结果[例(%)]

Tab 1 Results of Hardy-Weinberg equilibrium tests of genotype frequencies in 2 groups[case(%)]

组别	n	位点	基因型	实测值	理论值	χ^2	P
对照组	347	MTHFR基因C677T	CC	93(26.80)	84(24.21)	3.517	0.061
			CT	156(44.96)	174(50.14)		
			TT	98(28.24)	89(25.65)		
		MTHFR基因A1298C	AA	247(71.18)	242(69.74)	3.288	0.070
			AC	86(24.78)	95(27.38)		
			CC	14(4.04)	10(2.88)		
		MTRR基因A66G	AA	189(54.47)	189(54.47)	0.001	0.970
			AG	134(38.62)	134(38.62)		
			GG	24(6.91)	24(6.91)		
病例组	350	MTHFR基因C677T	CC	54(15.43)	57(16.29)	0.388	0.533
			CT	174(49.71)	168(48.00)		
			TT	122(34.86)	125(35.71)		
		MTHFR基因A1298C	AA	270(77.14)	271(77.43)	0.277	0.599
			AC	76(21.71)	74(21.14)		
			CC	4(1.15)	5(1.43)		
		MTRR基因A66G	AA	191(54.57)	190(54.29)	0.051	0.822
			AG	134(38.29)	136(38.86)		
			GG	25(7.14)	24(6.85)		

3.3 两组受试者基因型分布比较

两组受试者中,MTHFR基因C677T位点CT型和A1298C位点AA型均占较大比例(占比分别超过40%

和70%),MTRR基因A66G位点AA型占比均超过50%。两组受试者各基因型分布频率及等位基因频率比较见表2~表4。

表2 两组受试者MTHFR基因C677T位点各基因型分布频率及等位基因频率比较[例(%)]

Tab 2 Comparison of genotype distribution frequencies and allele frequencies in C677T site of MTHFR gene between 2 groups[case(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
对照组	347	93(26.80)	156(44.96)	98(28.24)	342(49.28)	352(50.72)
病例组	350	54(15.43)*	174(49.71)	122(34.86)	282(40.29)*	418(59.71)
χ^2			13.934		11.401	
P			0.001		0.001	

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

Note:vs. control group,* $P < 0.05$

表3 两组受试者MTHFR基因A1298C位点各基因型分布频率及等位基因频率比较[例(%)]

Tab 3 Comparison of genotype distribution frequencies and allele frequencies in A1298C site of MTHFR gene between 2 groups[case(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	AC	CC	A	C
对照组	347	247(71.18)	86(24.78)	14(4.04)	580(83.57)	174(6.43)
病例组	350	270(77.14)	76(21.71)	4(1.15)*	616(88.00)	84(12.00)
χ^2			7.183		5.603	
P			0.028		0.018	

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

Note:vs. control group,* $P < 0.05$

表4 两组受试者MTRR基因A66G位点各基因型分布频率及等位基因频率比较[例(%)]

Tab 4 Comparison of genotype distribution frequencies and allele frequencies in A66G site of MTHFR gene between 2 groups[case(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
对照组	347	189(54.47)	134(38.62)	24(6.91)	512(73.78)	182(26.22)
病例组	350	191(54.57)	134(38.29)	25(7.14)	516(73.71)	184(26.29)
χ^2			0.018		0.001	
P			0.991		0.975	

由表2~表4可见,两组受试者MTHFR基因C677T、A1298C位点各基因型分布频率及等位基因频率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而两组受试者MTRR基因A66G位点各基因型分布频率及等位基因频率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。两两比较结果显示,对照组受试者MTHFR基因C677T位点CC型分布频率及C等位基因频率、A1298C位点CC型分布频率及C等位基因频率均显著高于病例组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这提示MTHFR基因C677T位点和A1298C位点的多态性可能与冠心病的发生有关。

4 讨论

MTHFR基因位于人类第1号染色体1p36.3处,编码由656个氨基酸残基组成的蛋白;该基因全长约20 kb,

共有11个外显子和10个内含子。其中,C677T位点发生C→T突变可导致MTHFR酶中的丙氨酸被缬氨酸取代,A1298C位点发生A→C突变可导致该酶中的谷氨酸被丙氨酸取代^[12]。MTRR基因位于人类第5号染色体5p15.2~5p15.3处,编码由726个氨基酸残基组成的蛋白;该基因全长约32 kb,共有15个外显子和14个内含子。其中,A66G位点发生A→G突变可导致MTRR酶中的甲硫氨酸被异亮氨酸取代^[13]。MTHFR和MTRR基因位点的突变均能够引发DNA的低甲基化进而阻碍甲基四氢叶酸的生成,造成血浆Hcy水平升高,使血管内皮细胞处于氧化应激状态,由此促进血小板的聚集和血栓的形成,最终造成冠心病、脑卒中等多种心脑血管疾病的发生^[14-15]。编码基因单核苷酸多态性(SNP)与冠心病遗传易感性之间的相关性是近年来临床研究的焦点之一。目前国外已有研究表明,载脂蛋白E(ApoE)^[16-17]、MTHFR^[6]等基因的突变对心脑血管疾病的发生均具有非常重要的作用,且MTHFR基因C677T、A1298C位点以及MTRR基因A66G位点是近年来的研究热点。

本研究发现,陕西地区汉族人群MTHFR基因C677T位点发生突变比例较高(CT+TT型受试者的比例超过70%),高于国内已报道的南宁市、华南地区和琼海市人群(后三者CC型受试者占较大比例,分别为59%^[18]、55%^[19]、62%^[20]);A1298C位点突变率较低,AA型受试者占比超过70%,高出南部地区人群(后者AA型受试者占比约为57%^[18,20]),充分体现了基因型分布的南北地区差异。MTRR基因A66G位点突变率与南部地区人群接近(后者约为50%^[18,20])。χ²检验结果显示,对照组和病例组受试者MTHFR基因C677T、A1298C位点各基因型分布频率及等位基因频率比较,差异均有统计学意义。这提示陕西地区汉族人群MTHFR基因C677T位点和A1298C位点的多态性可能与该类人群冠心病的发生有关。而两组受试者MTRR基因A66G位点各基因型分布频率及等位基因频率比较,差异均无统计学意义。这提示该位点多态性可能与该类人群冠心病的发生无关。两两比较结果显示,对照组受试者MTHFR基因C677T、A1298C位点CC型分布频率及C等位基因频率均显著高于病例组,差异均有统计学意义。这提示C677T位点突变可能是冠心病发生的危险因素之一,而A1298C位点突变则可能是有益的。但由于冠心病与多种因素(如高血压、糖尿病、吸烟等^[21])有关,故上述结论仍有待进一步确证。

综上所述,陕西地区汉族人群MTHFR基因C677T位点的突变比例较高,而A1298C位点的突变比例较低,且上述两个位点突变可能与该类人群冠心病的发生有关;MTRR基因A66G位点的突变率接近50%,但此位点突变可能与其冠心病的发生无关。但本研究样本量较小,只能为相关基因突变与冠心病发生的相关性研究提供一定的参考;同时,我国不同地区、不同人群基因突变率的差异也会对研究结果造成影响。故在今后的研究中,本课题组将进一步扩大样本量,收集不同地区、不同

人群的基因突变类型,以进一步揭示易感基因多态性与冠心病发生的相关性。

参考文献

- [1] KIM SY, PARK SY, CHOI JW, et al. Association between MTHFR 1298A>C polymorphism and spontaneous abortion with fetal chromosomal aneuploidy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2011, 66(4): 252-258.
- [2] 朱武, 张坤. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T多态性与高血压患者动脉粥样斑块形成的相关性[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(13): 1783-1785.
- [3] LIEW SC, GUPTA ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases[J]. *Eur J Med Genet*, 2015, 58(1): 1-10.
- [4] HOUCHER B, HOUCHER Z, TOUABTI A, et al. Nutritional factors, homocysteine and C677T polymorphism of the methylene tetrahydrofolate reductase gene in Algerian subjects with cardiovascular disease[J]. *Pteridines*, 2012. DOI: 10.1515/pteridines.2012.23.1.14.
- [5] RAMKARAN P, PHULUKDAREE A, KHAN S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in young South African Indians[J]. *Gene*, 2015, 571(1): 28-32.
- [6] HOU X, CHEN X, SHI J. Genetic polymorphism of MTHFR C677T and premature coronary artery disease susceptibility: a meta-analysis[J]. *Gene*, 2015, 565(1): 39-44.
- [7] BOTTO LD, YANG G. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review[J]. *Am J Epidemiol*, 2000, 151(9): 862-877.
- [8] ROBIEN K, ULRICH CM. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk: a HuGE minireview[J]. *Am J Epidemiol*, 2003, 157(7): 571-582.
- [9] 冠心病诊断参考标准: 1979年修订[J]. *医学研究通讯*, 1979(12): 14-17.
- [10] 裴利花. 同型半胱氨酸及其代谢酶基因多态性与神经管畸形发生的关系[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
- [11] 刘英华, 陈瑛. 叶酸代谢基因与出生缺陷和不良妊娠的关系[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(8): 6-8.
- [12] 陈路明, 王若丹, 帅杰. 血中同型半胱氨酸和亚甲基四氢叶酸还原酶C677T基因多态性与脑血管狭窄的关系[J]. *中国脑血管病杂志*, 2013, 10(3): 119-124.
- [13] 余科, 顾少华, 谢毅, 等. 甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性与肿瘤易感性关系的Meta分析[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 2009, 48(5): 640-647.
- [14] FARACI FM, LENTZ SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction[J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 345-347.
- [15] EL SEBAY HM, SAFAN MA, DAOUD AA, et al. Association of factor V Leiden, Janus kinase 2, prothrombin, and MTHFR mutations with primary Budd-Chiari syndrome in Egyptian patients[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(1): 235-240.

亚抑菌浓度抗菌药物对多重耐药鲍曼不动杆菌生物膜形成的影响[△]

樊莉^{1*}, 孙凤军², 枉前², 夏培元², 周世文^{1#} (1. 陆军军医大学第二附属医院药学部, 重庆 400037; 2. 陆军军医大学第一附属医院药学部, 重庆 400038)

中图分类号 R969.3; R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3129-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.23

摘要 目的:探讨亚抑菌浓度(sub-MIC)抗菌药物对多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)生物膜形成的影响,为临床相关感染的防治提供参考。方法:采用琼脂平板倍比稀释法测定临床分离鲍曼不动杆菌(AB)的最低抑菌浓度(MIC),筛选MDR-AB菌株;采用微孔法分析不同剂量sub-MIC抗菌药物对MDR-AB菌株生物膜形成的影响,并使用AB标准菌株(ATCC 17978)进行验证;采用定量逆转录聚合酶链反应法测定其生物膜形成相关调控基因的表达情况。结果:临床检出的MDR-AB菌株对碳青霉烯类、头孢菌素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类抗菌药物耐药(MIC≥16 μg/mL),对多黏菌素B和替加环素较敏感(MIC≤8 μg/mL)。不同剂量sub-MIC头孢吡肟、环丙沙星、阿奇霉素、阿米卡星均可显著抑制大多数MDR-AB菌株生物膜的形成,且以阿奇霉素的抑制作用相对最强(其对应菌株的相对生物膜形成值最小);多西环素可显著诱导大多数菌株生物膜的形成,而美罗培南、头孢吡肟、替加环素、庆大霉素、多黏菌素B对其生物膜形成的影响并不明显。验证试验结果显示,与未经药物作用的对照菌株比较,经0.25、0.125 μg/mL阿奇霉素以及0.25 μg/mL阿米卡星作用后,标准菌株的相对生物膜形成值均显著下降(P<0.05),且阿奇霉素的抑制作用呈现一定的量效关系(P<0.05)。基因表达测定结果显示,与未经药物作用的对照菌株比较,经0.25 μg/mL阿奇霉素作用后, *bap*, *filA*, *pbp-1a*, *pbp-1b* 基因的相对表达量均显著下降(P<0.05),而 *ompA*, *csuB* 基因的相对表达量均无显著变化(P>0.05)。结论:我院MDR-AB菌株的耐药情况严重。sub-MIC头孢吡肟、环丙沙星、阿米卡星、阿奇霉素对其生物膜的形成具有明显的抑制作用,其中阿奇霉素的作用最强且呈量效关系。阿奇霉素对MDR-AB菌株生物膜形成的抑制作用可能与其下调 *bap*, *filA*, *pbp-1a*, *pbp-1b* 基因的表达有关。

关键词 鲍曼不动杆菌;多重耐药;生物膜;亚抑菌浓度;抗菌药物;阿奇霉素;基因表达

Effects of Sub-MIC Antibiotics on the Biofilm Formation of Multi-drug Resistant *Acinetobacter baumannii*

FAN Li¹, SUN Fengjun², WANG Qian², XIA Peiyuan¹, ZHOU Shiwen¹ (1. Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of sub-MIC antibiotics on the biofilm formation of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR-AB), and to provide reference for the prevention and treatment of related infection. **METHODS:** Agar plate doubling dilution method was used to detect MIC of clinically isolated *A. baumannii* (AB) and screen MDR-AB.

[16] WEI LK, AU A, MENON S, et al. Clinical relevance of MTHFR, eNOS, ACE, and ApoE gene polymorphisms and serum vitamin profile among Malay patients with ischemic stroke[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2015, 24 (9):2017-2025.

[17] YUAN H, WANG X, XIA Q, et al. Angiotensin converting enzyme (I/D) gene polymorphism contributes to ischemic stroke risk in Caucasian individuals: a meta-analysis based on 22 case-control studies[J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126 (6):488-498.

[18] 蒋武, 鲁衍强, 李瑛, 等. 南宁市壮族和汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因单核苷酸多态性比较[J]. *广西医学*, 2014, 36(11):1517-1519.

[19] 吴自强, 徐韞健. 华南地区汉族人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37 (13):1791-1792, 1795.

[20] 颜珠苗, 鲁衍强, 李瑛, 等. 琼海市汉族女性 MTHFR 和 MTRR 基因多态性分布研究[J]. *海南医学院学报*, 2013, 19(1):18-20.

[21] 赵艳梅, 许为炎, 陈坚, 等. 同型半胱氨酸及其代谢酶 MTHFR C677T 基因多态性与广西壮族自治区玉林地区汉族冠心病患者的相关性[J]. *中国药物与临床*, 2016, 16 (10):1409-1412.

△ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81373451)

* 博士研究生。研究方向:临床药学。E-mail: fanli1977411@126.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。E-mail: swzhou56@163.com

(收稿日期:2018-03-07 修回日期:2018-08-23)

(编辑:张元媛)