

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)

Microporous method was used to analyze the effects of different doses of sub-MIC antibiotics on the biofilm formation of MDR-AB, which was validated by using AB standard strain (ATCC 17978). The expression of biofilm-related gene was detected by RT-PCR. RESULTS: The detected MDR-AB was resistant to carbapenems, cephalosporins, quinolones, aminoglycosides, tetracyclines and macrolides ($MIC \geq 16 \mu\text{g/mL}$). It was sensitive to polymyxin B and tegocycline ($MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$). Different doses of sub-MIC cefepime, ciprofloxacin, azithromycin and amikacin could significantly inhibit the biofilm formation of MDR-AB, and azithromycin had the strongest inhibitory effect (the relative biofilm formation values of the corresponding strains was minimal). Doxycycline could significantly induce the formation of biofilm in most strains, but meropenem, cefoperazone, tigacycline, gentamicin and polymyxin B had no significant effect on the formation of biofilm. Results of validation test showed that compared with untreated control strains, the relative biofilm formation values of standard strains were decreased significantly after treated with 0.25 and 0.125 $\mu\text{g/mL}$ azithromycin and 0.25 $\mu\text{g/mL}$ amikacin ($P < 0.05$), and inhibitory effect of azithromycin showed a dose-dependent relationship ($P < 0.05$). Results of gene expression detection showed that compared with untreated control strains, relative expression of *bap*, *fla*, *pbp-1a* and *pbp-1b* gene were decreased significantly ($P < 0.05$), while relative expression of *ompA* and *csuE* gene had no significant change ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: The drug resistance of MDR-AB strains in our hospital is serious. Sub-MIC cefepime, ciprofloxacin, amikacin and azithromycin shows significant inhibitory effect on biofilm formation, and the inhibitory effect of azithromycin is the strongest, with dose-dependent manner. Azithromycin can inhibit the biofilm formation of MDR-AB which may be associated with the expression down-regulation of *bap*, *fla*, *pbp-1a* and *pbp-1b* gene.

KEYWORDS *Acinetobacter baumannii*; Multi-drug resistance; Biofilm; Sub-MIC; Antibiotics; Azithromycin; Gene expression

鲍曼不动杆菌(AB)是导致院内感染的主要病原菌之一,且多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB,即对3类或3类以上抗菌药物耐药的AB)在临床较为常见,而该类细菌可形成生物膜(Biofilm),最终可造成难以彻底清除的感染^[1]。有研究指出,在重症监护病房(ICU)中虽有高达80%的AB菌株处于抗菌药物的治疗压力下,但却无法被迅速清除,这种现象与AB耐药性强等因素所导致的患者体内抗菌药物浓度处于低于最低抑菌浓度(MIC)且无法杀灭AB的亚抑菌浓度(sub-MIC)有关^[2]。这类sub-MIC抗菌药物虽无法杀灭病原菌,却可显著影响菌株的病原学行为,且其对菌株生物膜形成的影响也可因抗菌药物种类和菌株的差异而有所不同^[3]。因此,探讨sub-MIC抗菌药物对耐药菌株生物膜形成的影响,并从中筛选具生物膜抑制活性的抗菌药物对于AB(尤其是MDR-AB)感染的防治具有重要的临床意义^[4]。为此,本研究以陆军军医大学第二附属医院(以下简称“我院”)临床分离的MDR-AB为对象,探讨sub-MIC抗菌药物对其生物膜形成的影响,以期为临床相关感染防治策略的完善提供参考。

1 材料

1.1 仪器

THZ-92B型恒温振荡培养箱、SPX-150-Z型恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);Power 300型电泳仪、Gel Doc 2000型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);7500型荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司);Sunrise型酶标仪(奥地利Tecan公司);MIT-P型多点接种仪(日本Sakuma公司);MR23i型低速离心机(法国Jouan公司);SW-CJ-2FD型超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);BP221S型电子天平(德国Sartorius公司);DW-86L338型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

美罗培南对照品[批号:130506-201403,纯度:供高效液相色谱法(HPLC)含量测定用]、头孢哌酮对照品(批号:130420-201105,纯度:供含量测定用)、头孢吡肟对照品(批号:130524-201404,纯度:供含量测定用)、环丙沙星对照品(批号:130451-201203,纯度:供HPLC法含量测定用)、阿米卡星对照品(批号:130335-200204,纯度:供含量测定用)、庆大霉素对照品(批号:130326-201015,纯度:供抗生素生物效价测定用)、多西环素对照品(批号:130485-201202,纯度:供含量/限量测定用)、阿奇霉素对照品(批号:130593-201303,纯度:供含量测定用)均由中国食品药品检定研究院提供;多黏菌素B对照品(美国Sigma公司,批号:1222536,纯度:供含量测定用);注射用替加环素(意大利Pfizer Limited,注册证号:H20130483,批号:AIXD/12,规格:50 mg);结晶紫溶液(成都科龙化工试剂厂,批号:2013121101);RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为NAB1335、1221119);LB培养基、MH培养基(北京陆桥技术股份有限公司,批号分别为150813、151012);血琼脂平板(重庆庞通医疗器械有限公司,批号:15K2701);磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 美国HyClone公司,批号:NAG1423);DP430-RNAprep Pure培养细胞/细菌总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号:121221];Prime-Script RT Reagent Kit逆转录试剂盒、RR820A-SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒(日本Takara公司,批号分别为AK3301、AK3101);引物由美国Invitrogen公司设计、合成;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 菌株

AB临床分离菌株均来自于我院临床送检的标本,剔除同一患者同一部位检出的重复菌株。质控菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)以及AB标准菌株(ATCC 17978)均由美国模式培养物集存库提供。上述菌株均常规保存于陆军军医大学第

—附属医院国家药物临床试验机构。

2 方法

2.1 临床分离菌株 MIC 的测定

以大肠埃希菌(ATCC 25922)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)为质控菌株,采用琼脂平板倍比稀释法测定临床分离 AB 菌株的 MIC(MIC 反映抗菌药物对受试菌株的抑制活性,其值越大表明药物对菌株的抑制活性越弱^[5])。取临床分离的 AB 菌株适量,用划线法接种于血琼脂平板上,置于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜。用接种环挑取单个菌落,用生理盐水稀释,制得浓度约为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液。取“1.2”项下各抗菌药物适量,用生理盐水倍比稀释后,取 1 mL 分置于各培养皿中,加入 MH 培养基适量,混匀;用多点接种仪将上述菌悬液接种至含不同质量浓度抗菌药物的 MH 培养基中,于 37 °C 恒温培养箱中培养 18 h 后,参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2015 年标准^[6]读取结果,并选取其中耐药种类最多的 10 株(即 MDR-AB, 编号分别为 WA0719、WB1387、WB1483、WB1486、WB1531、WB1549、WA0611、WB1055、WB1197、WB1032)进行后续试验。

2.2 sub-MIC 抗菌药物对菌株生物膜形成影响的半定量分析

选取临床常用的代表性抗菌药物(如美罗培南、头孢哌酮、阿奇霉素等)以及既往对 AB 具有良好抑制作用的其他抗菌药物(如多黏菌素 B、替加环素、多西环素等),在对应 MIC 的基础上兼顾临床实际可及的组织浓度,设置各抗菌药物的剂量,以未经药物作用的菌株作为对照,采用微孔法对各菌株生物膜的形成进行半定量分析^[5]。取“2.1”项下临床分离的 MDR-AB 菌株适量,用划线法接种于血琼脂平板上,置于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜;用接种环挑取单个菌落至 LB 培养基中,于 37 °C 恒温振荡培养箱中振摇(约 30 r/min)培养过夜。用接种环挑取单个菌落,用生理盐水稀释,制得浓度约为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液,以每孔 200 μ L 加至 96 孔板中,于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后,吸弃上层培养液,残渣用 PBS 清洗 2 次,吹干并固定后,每孔加入 1% 结晶紫溶液 150 μ L,染色 3 min,用超纯水洗净,吹干,每孔加入 30% 冰醋酸溶液溶解染色液,使用酶标仪在 590 nm 波长处测定各孔的吸光度(OD)值。OD 值的高低可间接反映生物膜形成能力的强弱,且当 $OD_{590\text{ nm}} > 0.5$ 时,表明该菌株生物膜形成的能力较强^[6]。其中,与未经药物作用的对照菌株比较, $OD_{590\text{ nm}}$ 值显著增加(组间比较 $P < 0.05$)的为“显著诱导”, $OD_{590\text{ nm}}$ 值无显著差异(组间比较 $P > 0.05$)的为“无显著影响”, $OD_{590\text{ nm}}$ 值显著降低(组间比较 $P < 0.05$)的为“显著抑制”。“相对生物膜形成”指与对照菌株比较,10 株 MDR-AB 菌株 OD 值变化的平均水平(其值等于给药菌株的平均 OD 值与对照菌株的平均 OD 值的比值)。为确保试验的可重复性,本研究以 AB 标准菌株(ATCC 17978)为对象,选取对临床分离菌株生物膜形成具有明显抑制作用的抗菌药物进行验证,并设置更低的剂量以探讨其量效关系。上述试验

重复 3 次。

2.3 MDR-AB 菌株生物膜形成相关调控基因表达的测定

以未经药物作用的菌株作为对照,采用定量逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)测定 MDR-AB 菌株生物膜形成相关调控基因的表达情况。按照培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒说明书方法提取细菌总 RNA,按照逆转录和荧光定量试剂盒说明书方法将 RNA 逆转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA),随后使用荧光定量 PCR 仪进行扩增(引物序列见表 1)。PCR 反应体系:2 \times SYBR Green(荧光定量试剂盒内所含试剂)10 μ L,上、下游引物各 0.3 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 7.4 μ L。扩增条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,52~57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环;72 °C 再延伸 10 min。SYBR Green 试剂的激发波长和发射波长分别为 497 nm 和 520 nm。以表达稳定的 16SrRNA 为内参,通过检测扩增过程中荧光强度的变化,采用 ABI-7500 2.0 软件以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析各基因的表达量,并计算相对表达量(相对表达量=给药菌株的基因表达量/对照菌株的基因表达量)。上述试验重复 3 次。

表 1 引物序列及退火温度

Tab 1 Primer sequence and annealing temperature

基因/内参	引物序列	退火温度, °C
bap	上游: 5'-GTCTCTGGATCAGCATCAA-3'	52
	下游: 5'-ATCCAAACAACAGGTCAAGTC-3'	
ompA	上游: 5'-CAATGGCGGTAAGATGGTAA-3'	55
	下游: 5'-TACGGCTTGATTGTGCTGTCC-3'	
csuE	上游: 5'-CAAAGTGTATCGCCCGGTGT-3'	57
	下游: 5'-AAGAAGCGACCGATTCCACAC-3'	
flaA	上游: 5'-TGCTACAGGTCAAGATGGT-3'	52
	下游: 5'-TTGCTAAGTTCAAAAGTGGA-3'	
bbp1a	上游: 5'-TTAGGTCGTGCTTTGAGTG-3'	52
	下游: 5'-GATTTCTGTTAGTTTGCCTTTT-3'	
bbp1b	上游: 5'-TTATTTAGTCGGTTTGGTTCA-3'	52
	下游: 5'-TAGGCTTGGTTTGCCTTAGA-3'	
16SrRNA	上游: 5'-GCCTTCCTCCAGTTTGTC-3'	55
	下游: 5'-TGTCGTGAGATGTTGGGT-3'	

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 临床分离 MDR-AB 菌株的 MIC 值

10 株 MDR-AB 菌株对 10 种临床常用抗菌药物的 MIC 值见表 2。由表 2 可见,10 株菌株对碳青霉烯类、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,而对多黏菌素 B 和替加环素较敏感。

3.2 sub-MIC 抗菌药物对临床分离 MDR-AB 菌株生物膜形成的影响

10 株 MDR-AB 菌株分别来自于痰液、脑脊液、血液、伤口分泌物和尿液标本,涉及最常被该类菌株感染的人体部位,具有一定的代表性^[7]。以不同剂量的 sub-MIC 抗菌药物对 MDR-AB 菌株生物膜的形成进行干预,结果见表 3。由表 3 可见,头孢吡肟、环丙沙星、阿

表2 10株MDR-AB菌株对10种临床常用抗菌药物的MIC值($\mu\text{g/mL}$)

Tab 2 MICs of 10 strains of MDR-AB to 10 kinds of commonly used antibiotics in clinic($\mu\text{g/mL}$)

抗菌药物	WA0719	WB1387	WB1483	WB1486	WB1531	WB1549	WA0611	WB1055	WB1197	WB1032
美罗培南	32	16	32	32	32	16	16	32	16	8
头孢哌酮	32	32	32	32	64	32	32	64	32	32
头孢吡肟	64	64	64	64	64	128	>256	>256	64	>256
环丙沙星	16	32	32	32	16	32	16	64	16	64
阿米卡星	>256	>256	>256	16	>256	>256	>256	>256	>256	>256
庆大霉素	>256	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
多西环素	32	32	32	16	32	16	32	32	32	64
多黏菌素B	1	2	4	0.5	2	2	2	2	2	1
替加环素	2	2	2	2	2	1	8	2	2	4
阿奇霉素	>256	>256	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	>256

奇霉素、阿米卡星等4种抗菌药物对MDR-AB菌株生物膜的形成具有较强的抑制作用,且阿奇霉素的抑制作用相对最强(其相对生物膜形成值最小,2 $\mu\text{g/mL}$ 即可显示出较强的抑制作用);多西环素对MDR-AB菌株生物膜的形成具有较明显的诱导作用;而美罗培南、头孢哌酮、替加环素、庆大霉素、多黏菌素B对其生物膜形成的影响不明显。

表3 不同剂量sub-MIC抗菌药物对临床分离MDR-AB菌株生物膜形成的影响

Tab 3 Effects of different doses of sub-MIC antibiotics on the biofilm formation of clinical isolated MDR-AB strains

抗菌药物	剂量, $\mu\text{g/mL}$	显著抑制,株	显著诱导,株	无显著影响,株	相对生物膜形成值
美罗培南	4	3	3	4	1.045
	2	2	2	6	1.082
	1	1	1	8	1.064
头孢哌酮	4	2	1	7	1.105
	2	2	1	7	0.61
	1	0	1	9	1.086
头孢吡肟	8	5	1	4	0.904
	4	2	1	7	0.913
	2	1	1	8	0.940
环丙沙星	8	3	0	7	0.884
	4	2	0	8	0.882
	2	3	0	7	0.876
阿米卡星	4	6	0	4	0.815
	2	4	0	6	0.847
	1	4	0	6	0.883
庆大霉素	8	1	0	9	0.940
	4	1	0	9	0.913
	2	1	0	9	0.988
多西环素	8	0	5	5	1.319
	4	0	5	5	1.263
	2	0	5	5	1.253
多黏菌素B	0.25	2	2	6	1.001
	0.125	2	1	7	0.999
	0.06	2	1	7	1.074
替加环素	0.25	1	1	8	0.961
	0.125	0	1	9	1.057
	0.06	0	1	9	1.058
阿奇霉素	8	6	0	4	0.759
	4	5	0	5	0.814
	2	4	0	6	0.831

以标准菌株为对象,选取阿奇霉素和阿米卡星进行验证试验,结果见表4。由表4可见,与未经药物作用的对照菌株比较,经0.25、0.125 $\mu\text{g/mL}$ 阿奇霉素以及0.25 $\mu\text{g/mL}$ 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,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示其生物膜形成受到明显抑制。此外,0.25、0.125、0.06 $\mu\text{g/mL}$ 阿奇霉素组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示这种体外抑制作用呈明显的量效关系;而阿米卡星对其生物膜形成的抑制作用则未见类似量效关系($P>0.05$)。

表4 不同剂量sub-MIC阿奇霉素和阿米卡星对标准菌株生物膜形成的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effects of different doses of sub-MIC azithromycin and amikacin on the biofilm formation of AB standard strains($\bar{x} \pm s$)

组别	相对生物膜形成值	组别	相对生物膜形成值
无药物	1.000 \pm 0.231	无药物	1.000 \pm 0.085
阿奇霉素0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.358 \pm 0.073***	阿米卡星0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.598 \pm 0.096*
阿奇霉素0.125 $\mu\text{g/mL}$	0.720 \pm 0.118**	阿米卡星0.125 $\mu\text{g/mL}$	0.827 \pm 0.090
阿奇霉素0.06 $\mu\text{g/mL}$	0.802 \pm 0.097	阿米卡星0.06 $\mu\text{g/mL}$	1.116 \pm 0.031
阿奇霉素0.03 $\mu\text{g/mL}$	0.945 \pm 0.129	阿米卡星0.03 $\mu\text{g/mL}$	1.085 \pm 0.108

注:与无药物作用的对照菌株比较,* $P<0.05$;与阿奇霉素0.06 $\mu\text{g/mL}$ 作用的受试菌株比较,** $P<0.05$;与阿奇霉素0.125 $\mu\text{g/mL}$ 作用的受试菌株比较,*** $P<0.05$ 。

Note: vs. untreated control strains, * $P<0.05$; vs. strains treated with azithromycin 0.06 $\mu\text{g/mL}$, ** $P<0.05$; vs. strains treated with azithromycin 0.125 $\mu\text{g/mL}$, *** $P<0.05$ 。

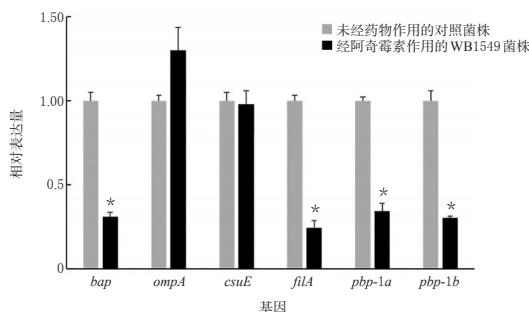
在研究过程中笔者还发现,WB1549菌株生物膜形成受到阿奇霉素和阿米卡星的抑制较显著(相对生物膜形成值均低于0.8),且该菌株来自于呼吸道感染者的痰液标本,而阿奇霉素常用于呼吸道感染的治疗,故将其作为后续机制研究的代表菌株。

3.3 sub-MIC阿奇霉素对WB1549菌株生物膜形成相关调控基因表达的影响

以0.25 $\mu\text{g/mL}$ (验证试验显示,该剂量的抑制作用最强)阿奇霉素作用于WB1549菌株后,对其生物膜形成相关调控基因表达的变化情况进行分析,结果见图1。由图1可见,6个生物膜形成相关调控基因中有4个基因的表达受到显著抑制($P<0.05$),包括生物膜相关蛋白(BAP)编码基因**bab**、III型菌毛合成的调控基因**filA**以及膜结构相关的青霉素结合蛋白(PBPs)编码基因**pbp-1a**、**pbp-1b**;而外膜蛋白(OMPA)编码基因**ompA**和调控菌毛合成的**csu**家族基因**csuE**的表达则未见显著变化($P>0.05$)。这提示阿奇霉素影响了MDR-AB菌株生物膜形成的多个调控途径,包括影响III型菌毛的合成、生物膜的完整性以及生物膜蛋白的合成。

4 讨论

随着抗菌药物的广泛应用及滥用,MDR-AB菌株的临床检出率日益增高^[6]。本研究MIC测定结果显示,我院临床检出的MDR-AB菌株对多类常用抗菌药物耐药,包括碳青霉烯类、头孢菌素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类等。这提示当患者受到MDR-AB



注:与无药物作用的对照菌株比较, * $P < 0.05$

Note: vs. untreated control strain, * $P < 0.05$

图1 0.25 µg/mL阿奇霉素对WB1549菌株生物膜形成相关调控基因表达的影响

Fig 1 Effects of 0.25 µg/mL azithromycin on the expression of biofilm-regulated genes in WB1549 strain

菌株感染时,临床可供选择的抗菌药物有限;此外这也提示,许多抗菌药物的常规治疗浓度难以达到抑制MDR-AB菌株的MIC而处于sub-MIC。在此背景下,探讨sub-MIC抗菌药物对MDR-AB菌株生物膜形成的影响具有极大的临床价值。

本研究结果显示,不同剂量sub-MIC抗菌药物对MDR-AB菌株生物膜的形成会产生不同影响。其中,有明显诱导作用的为多西环素,影响不明显的包括美罗培南、头孢哌酮、替加环素、庆大霉素、多黏菌素B等,而头孢吡肟、环丙沙星、阿奇霉素和阿米卡星则表现出了明显的抑制作用,且阿奇霉素的抑制作用相对最强(2 µg/mL即可显示出较强的抑制作用)。其量效关系在基因背景清楚的AB标准菌株(ATCC 17978)中得到了验证。已有研究表明,阿奇霉素对铜绿假单胞菌和流感嗜血杆菌的生物膜形成具有抑制作用^[9],但其对MDR-AB菌株生物膜形成的影响尚未见相关报道,故本课题组在上述研究的基础上,进一步分析了sub-MIC阿奇霉素影响MDR-AB菌株生物膜形成的可能机制。

MDR-AB菌株生物膜形成的调控机制复杂,目前尚未完全阐明。已有研究显示,其生物膜形成可能与BAP蛋白、OMPA蛋白、膜结构蛋白编码基因以及细菌运动相关基因的表达有关^[10],因此笔者推测sub-MIC抗菌药物对MDR-AB菌株生物膜形成的影响亦有可能涉及以上靶点。相关研究证实,BAP蛋白可通过促进菌株的黏附来诱导其生物膜的形成^[10]。本研究结果显示,经sub-MIC阿奇霉素作用后,bap基因的表达受到显著抑制,但具体机制仍有待进一步研究。OMPA蛋白可诱导菌株黏附或侵袭上皮细胞,促进其生物膜形成,增强其活性^[11],但本研究并未发现阿奇霉素对其编码基因ompA表达的影响,提示该基因可能并非阿奇霉素的作用靶点。值得注意的是,AB菌株没有鞭毛,菌毛是其主要的运动器官,且生物膜的形成与之密切相关^[12]。尽管csu基因家族(csuA/B/C/D/E)编码蛋白可影响细菌菌毛的合成,但本研究并未发现关键调控基因csuE表达的显著

改变,提示csu基因家族介导的菌毛合成可能并未参与阿奇霉素的作用过程^[12]。III型菌毛相关基因filA调控III型菌毛的合成^[12]。本研究结果显示,经sub-MIC阿奇霉素作用后,其表达受到了显著抑制,表明该基因可能是阿奇霉素的作用靶点。PBPs蛋白可与青霉素G共价结合,是一类广泛存在于细菌表面的膜蛋白。该蛋白参与了细菌细胞壁的合成和糖肽结构的形成,对维持细菌的正常形态具有重要的作用^[13]。已有研究表明,大肠埃希菌中PBPs蛋白表达的下调会影响其细胞壁的结构,从而影响鞭毛的活力,导致细菌运动力受损^[13]。后续研究显示,PBP1a、PBP2a、PBP2b等蛋白及其编码基因的缺失对变形链球菌^[14]、金黄色葡萄球菌^[15]等多种细菌的分裂、生长或生物膜形成均有显著影响,但尚未见PBPs对MDR-AB菌株生物膜形成影响的相关报道。本研究结果显示,经sub-MIC阿奇霉素作用后,MDR-AB菌株中PBPs蛋白编码基因pbp-1a、pbp-1b的表达均显著下降,提示PBPs蛋白可能参与了该菌株生物膜的形成,而阿奇霉素对其调控的具体机制仍需进一步探讨。

综上所述,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。但目前对该菌的研究多集中在其流行病学特征上,而对其生物膜形成等病原学行为机制的探讨甚少,故本研究的结论及其具体机制仍有待后续研究进一步验证。

参考文献

- [1] ANTUNES LC, VISCA P, TOWNER KJ. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen[J]. *Pathog Dis*, 2014, 71(3):292-301.
- [2] DAI XT, SUN FJ, CHEN ZH, et al. The epidemiology and resistance mechanisms of Acinetobacter baumannii isolates from the respiratory department ICU of a hospital in China[J]. *Microb Drug Resist*, 2014, 20(6):618-622.
- [3] 枉前, 孙凤军, 夏培元. 亚抑菌浓度抗生素对细菌生物膜形成的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(4):200-204.
- [4] HOWARD A, O'DONOGHUE M, FEENEY A, et al. Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen[J]. *Virulence*, 2012, 3(3):243-250.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement*[S]. 2015-01.
- [6] CRAMTON SE, GERKE C, GÖTZ F. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation[J]. *Methods Enzymol*, 2001, 336:239-255.
- [7] SHIN B, PARK W. Antibiotic resistance of pathogenic Acinetobacter species and emerging combination therapy[J]. *J Microbiol*, 2017, 55(11):837-849.
- [8] EVANS BA, HAMOUDA A, AMYES SG. The rise of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii[J]. *Curr Pharm*

甘地胶囊联合常规治疗用于糖尿病肾病的疗效和安全性及对相关指标的影响^Δ

魏 昕^{1*}, 黄震浩², 张琳琳³(1.上海交通大学医学院附属新华医院药学部, 上海 200092; 2.上海同济大学附属东方医院心内科, 上海 200123; 3.上海交通大学医学院附属新华医院核医学科, 上海 200092)

中图分类号 R587.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3134-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.24

摘要 目的:观察甘地胶囊联合常规治疗用于糖尿病肾病(DN)的疗效和安全性及对相关指标的影响。方法:选择2016年10月—2017年10月上海交通大学医学院附属新华医院收治的205例DN患者,按随机数字表法分为对照组(102例)和观察组(103例)。对照组患者给予赖脯胰岛素注射液,皮下注射,每日3次+甘精胰岛素注射液,皮下注射,每日1次,均根据血糖情况调节胰岛素给药剂量;同时给予氯沙坦钾片100 mg,口服,每日1次+硝苯地平控释片30 mg,口服,每日1次;保持蛋白质和能量摄入量恒定,并结合合理饮食及适当运动等。观察组患者在对照组治疗的基础上给予甘地胶囊0.9 g,口服,每日3次。两组均以2个月为1个疗程,共治疗3个疗程。观察两组患者的临床疗效,治疗前后的血糖[空腹血糖、餐后2 h血糖、糖化血红蛋白(HbA_{1c})]水平、肝功能指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)]、肾功能指标(血尿素氮、血肌酐)、炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、转化生长因子 β (TGF- β)]水平及不良反应发生情况。结果:所有患者均完成治疗,无患者脱落。观察组患者的总有效率(63.11%)显著高于对照组(29.41%)($P < 0.05$)。治疗前,两组患者血糖水平、肝肾功能指标、炎症因子水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后,观察组患者HbA_{1c}水平显著低于同组治疗前及对照组同期($P < 0.05$);两组患者肝肾功能指标、炎症因子水平均显著低于同组治疗前,且观察组显著低于对照组($P < 0.05$)。两组患者不良反应发生率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:在常规治疗的基础上加用甘地胶囊治疗DN可显著提高疗效,降低患者体内血糖及炎症因子水平,改善其肝肾功能,且未增加不良反应的发生。

关键词 甘地胶囊;糖尿病肾病;疗效;安全性;血糖;炎症因子;肝功能;肾功能

Therapeutic Efficacy and Safety of Gandi Capsules Combined with Routine Treatment for Diabetic Nephropathy and Its Effects on Related Indicators

WEI Xin¹, HUANG Zhenhao², ZHANG Linlin³ (1. Dept. of Pharmacy, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Dept. of Cardiology, Dongfang Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200123, China; 3. Dept. of Nuclear Medicine, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Des. 2013, 19(2):223-238.

- [9] DAS MC, SANDHU P, GUPTA P, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by vitexin: a combinatorial study with azithromycin and gentamicin[J]. *Sci Rep*, 2016. DOI:10.1038/srep23347.
- [10] LONGO F, VUOTTO C, DONELLI G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*[J]. *New Microbiol*, 2014, 37(2):119-127.
- [11] GADDY JA, TOMARAS AP, ACTIS LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(8):3150-3160.
- [12] MCQUEARY CN, ACTIS LA. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties[J]. *J Microbiol*, 2011, 49(2):243-250.
- [13] EVANS KL, KANNAN S, LI G, et al. Eliminating a set of four penicillin binding proteins triggers the Res phosphorelay and Cpx stress responses in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(19):4415-4424.
- [14] WEN ZT, BITOUN JP, LIAO S. PBP1a-deficiency causes major defects in cell division, growth and biofilm formation by *Streptococcus mutans*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0124319.
- [15] SANTIAGO C, LIM KH, LOH HS, et al. Prevention of cell-surface attachment and reduction of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) level in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms by *Acalypha wilkesiana* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015. DOI: 10.1186/s12906-015-0615-6.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.51703126);上海交通大学医学院药理学科研项目(No.JDYX2017QW005)

* 主管药师, 硕士。研究方向:心血管药理学。电话:021-25077155。E-mail:weixin@xinhumed.com.cn

(收稿日期:2018-08-24 修回日期:2018-09-25)
(编辑:张元媛)