

副溶血弧菌耐药诱导株的生物特性与 多药外排泵表达

张政, 马更勤, 王宏勋, 侯温甫, 周敏

(武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023)

摘要: 本研究将初始菌株副溶血弧菌 F7 经过环丙沙星连续体外诱导得到的实验室诱导株 H128、H256、H512 作为研究对象, 研究了菌株 F7、H128、H256、H512 的药敏性、泳动能力、生长曲线、生物膜形成能力等生物学特性, 分析了多药外排泵基因 *vmeB*、*vmeD*、*vpoC*、*vmrA* 的相对表达量。结果表明, 诱导菌株不仅对诱导抗生素环丙沙星的耐药性明显提高, 还对多种非诱导抗生素呈现交叉耐药。与初始菌株 F7 相比, 诱导菌株 H128、H256、H512 泳动能力下降, 泳动圈直径分别为 4.83 mm、4.57 mm、5.13 mm, 生物膜形成能力增强, 吸光值分别为 4.35 nm、4.35 nm、4.29 nm。诱导菌株 H128、H256、H512 均检测到外排泵基因 *vmeD* 的相对表达量均高于 F7, 分别上调了 1.20、3.55、2.02 倍, 仅在 H256 中检测到 *vmeB*、*vpoC*、*vmrA* 基因表达量上调, 分别上调了 1.47、2.90、1.71 倍, 说明 RND 型外排系统 VmeCD-VpoC 是与副溶血弧菌对环丙沙星的耐药性以及交叉耐药相关的主要外排系统。本研究为耐药性副溶血弧菌的风险评估提供参考依据, 为解决副溶血弧菌耐药问题提供新的思路。

关键词: 体外诱导; 副溶血弧菌; 泳动能力; 生长曲线; 生物膜形成能力; 交叉耐药; 外排泵

文章编号: 1673-9078(2020)08-15-22

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.1278

Biological Characteristics of Drug-resistant Strains of *Vibrio parahaemolyticus* and Expression of Multi-drug Efflux Pump

ZHANG Zheng, MA Geng-qin, WANG Hong-xun, HOU Wen-fu, ZHOU Min

(School of Food science and Engineering, Wuhan Polytechnical University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In this study, the laboratory-induced strains H128, H256 and H512 obtained from the initial strains of *Vibrio parahaemolyticus* F7 after continuous *in vitro* induction with ciprofloxacin were used as the research objects. The biological characteristics of F7, H128, H256, H512 strains, including drug sensitivity, mobility, growth curve and biofilm-forming ability were examined. The relative expressions levels of multidrug efflux pump genes, *vmeB*, *vmeD*, *vpoC* and *vmrA* were analyzed. The results showed that all the laboratory-induced strains had an increased drug resistance to ciprofloxacin, with their cross-resistance to a variety of non-induced antibiotics also detected. Compared with the original strain F7, the mobility of all the laboratory-induced strains H128, H256 and H512 decreased, with the diameter of moving circle as 4.83 mm, 4.57 mm and 5.13 mm respectively. The biofilm-forming abilities of all laboratory-induced strains were enhanced, with the absorbance reaching 4.35 nm, 4.35 nm and 4.29 nm respectively. The expression level of the efflux pump gene *vmeD* for all laboratory-induced strains was higher than that of F7 (increase by 1.20, 3.55, and 2.02 times respectively), and the expression levels of the *vmeB*, *vpoC* and *vmrA* genes in H256 were higher than that of F7 (increase by 1.47, 2.90, and 1.71 times respectively). These results indicated that the RND efflux system VmeCD-VpoC played important role in the resistance to ciprofloxacin and the main cross-resistance-related efflux systems of *Vibrio parahaemolyticus*. This study provided a reference for the risk assessment of drug-resistant *Vibrio parahaemolyticus*, and a new idea for solving

引文格式:

张政,马更勤,王宏勋,等.副溶血弧菌耐药诱导株的生物特性与多药外排泵表达[J].现代食品科技,2020,36(8):15-22

ZHANG Zheng, MA Geng-qin, WANG Hong-xun, et al. Biological characteristics of drug-resistant strains of *Vibrio parahaemolyticus* and expression of multi-drug efflux pump [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 15-22

收稿日期: 2019-12-27

基金项目: “十三五”重点研发计划项目 (2017YFC1600100)

作者简介: 张政 (1994-), 男, 研究生, 研究方向: 农产品加工与安全

通讯作者: 周敏 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与安全

the problem of drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus*.

Key words: *in vitro* induction; *Vibrio parahaemolyticus*; mobility; growth curve; biofilm-forming ability; cross resistance; efflux pump

副溶血弧菌是一种兼性厌氧的革兰氏阴性嗜盐菌,隶属于弧菌科弧菌属,是一种食源性的致病菌。自然环境中该菌主要存在于河口和沿海,通常通过感染海蟹、海虾等常见水产品进入人体,使人体出现食物中毒的症状,轻者出现头晕、恶心等症状,重者出现败血症甚至可能危及生命^[1-5],由该菌引发的食物中毒事件在世界各地均有报道,对水产品加工与食品安全领域造成了严重的潜在威胁。

目前,抗生素药物不仅是临床上治疗副溶血弧菌的主要方式,也是在水产养殖过程中防治副溶血弧菌污染的重要手段。抗生素的滥用会使得细菌长期暴露于抗生素压力环境下,导致耐药菌种类和数量不断增加,甚至出现交叉耐药。世界卫生组织也多次在世界级重大会议中强调微生物耐药性的重要性^[6]。第三代抗菌药头孢菌素和氟喹诺酮是治疗和控制副溶血性弧菌感染的常用药物。尽管副溶血性弧菌对氟喹诺酮的耐药率较低,但是在一些国家也呈现增加的趋势,同时多重耐药株的检出率也越来越高^[7,8]。

副溶血弧菌对氟喹诺酮类药物的耐药性可能由于其外排系统的过度表达而产生^[9]。迄今为止,在副溶血性弧菌中已发现两种外排系统对氟喹诺酮类药物具有耐药性。Chen 等人^[10]报道了副溶血性弧菌中 MATE 家族外排泵基因 *vmrA*, *vmrA* 基因不仅介导了对诺氟沙星和环丙沙星的耐药性,而且参与了副溶血弧菌中 Na^+ 离子的膜转运过程(副溶血弧菌的生长过程需要 Na^+ 离子)^[11],属于副溶血弧菌中特有的外排泵基因。Matsuo 等人^[12]报道了副溶血性弧菌中耐药结节细胞分裂(RND)家族的12个假定外排泵,其中,内膜蛋白 VmeAB 和 VmeCD 以及外膜蛋白 Vpoc 构成的三聚体,被认为是副溶血弧菌中 RND 型外排转运蛋白家族的核心成员,同时本实验室研究人员吴高升^[13]发现,在初始菌株 F7 中存在 RND 型多药外排泵系统 VmeAB-Vpoc 和 VmeCD-Vpoc,而且其相关编码基因 *vmeB*、*vmeD* 参与了诱导菌株 H128 的喹诺酮耐药。

本研究以环丙沙星连续体外诱导得到的耐药菌为对象,研究了诱导株的耐药性与生物学特性,测定了 RND 型多药外排泵系统 VmeAB-Vpoc 和 VmeCD-Vpoc 与 MATE 家族外排泵相关基因 *vmeB*、*vmeD*、*vpoC* 和 *vmrA* 的相对表达量,旨在为揭示副溶血弧菌耐药性的产生和传播机制提供理论基础,为解决副溶血弧菌耐药问题提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

菌株:副溶血弧菌食源菌株 F7;诱导菌株 H128、H256、H512 由武汉轻工大学食品科学与工程学院实验室提供,诱导方法见实验方法 1.2.1。

试剂:TCBS 琼脂,青岛高科技工业园海波生物技术有限公司;Agar 琼脂粉,飞扬生物有限公司;酵母提取素(Yeast Extract),北京瑞达恒辉公司;胰蛋白胨(Typetone),北京瑞达恒辉公司;氯化钠,上海国药集团化学试剂有限公司;N-N-二甲基甲酰胺,国药集团化学试剂有限公司;冰乙酸,国药集团化学试剂有限公司;MH 肉汤,青岛高科技工业园海波生物技术有限公司;氨苄青霉素(青霉素钠)、阿莫西林、头孢唑林(钠)、诺氟沙星、环丙沙星、萘啶酮酸、四环素、磺胺复合物、氯霉素、(硝基)呋喃妥因,源叶生物科技有限公司;结晶紫,天津石英钟厂霸州市化工分厂;TrizolRNA 裂解液,天根生化有限公司;异丙醇,科密欧化学试剂有限公司;无水乙醇,国药化学试剂公司;杂质 DNA 去除试剂盒、RNA 反转录试剂盒, Takara 公司;基因荧光定量试剂盒,生命科学公司。

所需的配制:(1)TCBS 培养基:称取 TCBS 粉末 8.9 g,煮沸溶解于 100 mL 蒸馏水中,冷至 50 °C 时,倾入无菌平皿中待其凝固,备用。(2)LB 培养基(嗜盐型):称取酵母提取素 1 g、胰蛋白胨 2 g、氯化钠 6 g,溶解于 200 mL 蒸馏水中,用橡胶塞或薄膜密封,再用牛皮纸包扎,放入立式压力蒸汽灭菌锅中,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。(3)0.6% LA 培养基(嗜盐型):称取酵母提取素 0.5 g、胰蛋白胨 1 g、氯化钠 3 g、Agar 粉 0.6 g,溶解于 100 mL 蒸馏水中,用橡胶塞或薄膜密封,再用牛皮纸包扎,放入立式压力蒸汽灭菌锅中,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。(4)MH 肉汤培养基:称取本品 21 g,加热溶解于 1000 mL 蒸馏水中,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。(5)无菌生理盐水:称取 8.5 g NaCl 溶解于蒸馏水中,定容至 1000 mL,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。(6)0.1% 结晶紫溶液:取结晶紫乙醇饱和液(结晶紫 2 g 溶解于 200 mL 95% 乙醇)20 mL,1% 草酸铵水溶液 80 mL,

混匀静置 24 h 后, 过孔径为 0.22 μm 滤膜, 备用。(7) 33%冰乙酸: 取 33 mL 冰乙酸, 溶解于 67 mL 蒸馏水中, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 备用。

1.1.2 主要仪器

96 孔微量培养板, 美国康宁公司; 48 孔微量培养板, 美国康宁公司; DDHZ-200 型分式恒温振荡器, 太仓市实验设备厂; DRP-9062 型电热恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司; HPX-9082 电热恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; SW-CJ-2FD 型单人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; BXM-3DR 型立式压力蒸汽锅, 上海博讯实业有限公司; 全自动生长曲线测定仪, 芬兰 Bioscreen 公司; 蜂窝板, 芬兰 Bioscreen 公司; 牙签, 广州宜洁日用品有限责任公司; CFX96 型荧光定量 PCR 仪, 生命科学公司。

1.2 实验方法

1.2.1 副溶血弧菌耐药株的诱导

表 1 菌株 F7 H128 H256 H512 对各类抗生素的 MIC 值

Table 1 MIC value of strain F7 H128 H256 H512 against various antibiotics

抗生素名称	抗生素种类	F7	H128	H256	H512
环丙沙星	喹诺酮类	<0.25(S)	8(I)	16(I)	128(R)
诺氟沙星	喹诺酮类	<0.25(S)	0.5(S)	0.5(S)	0.5(S)
萘啶酮酸	喹诺酮类	0.5(S)	64(R)	64(R)	64(R)
氯苄青霉素	β -内酰胺类	32 (R)	256(R)	256(R)	256(R)
阿莫西林	β -内酰胺类	16(I)	512(R)	512(R)	512(R)
头孢唑林钠	β -内酰胺类	4(S)	16(I)	16(I)	64(R)
四环素	四环素类	<0.25(S)	16(I)	32(I)	64(R)
磺胺复合物	磺胺类	>512(R)	>512(R)	>512(R)	>512(R)
氯霉素	氯霉素类	32(R)	256(R)	256(R)	256(R)
呋喃妥因	硝基呋喃类	4(S)	4(S)	8(S)	8(S)

注: “S”代表“敏感”, “I”代表“中介”, “R”代表“耐药”。

1.2.2 交叉耐药性实验

将配制好的抗生素溶液浓度稀释至 1024 $\mu\text{g/mL}$, 备用。采用微量肉汤倍比稀释法^[15]测定多种常见抗生素对实验菌株的最低抑菌浓度, 每种菌株设定三次重复, 同时设定不含抗生素不含菌液的 MH 肉汤培养基, 不含抗生素的 MH 肉汤菌液为对照组, 以大肠杆菌 ATCC25922 作为质控菌株。结果判读依照 2018 年美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 交叉耐药的判定标准: 非诱导药物对诱导耐药株的最低抑制浓度 (MIC 值) 比诱导前升高 4 倍或以上。

1.2.3 生物学特性分析

参考 Michéa-Hamzhepour M 等人^[14]的方法进行微调, 根据食品分离株 F7 对抗生素环丙沙星的最小抑菌浓度 (MIC 值), 配制环丙沙星浓度为 0.5 MIC、1 MIC、2 MIC、4 MIC、8 MIC、16 MIC、32 MIC、64 MIC、128 MIC、256 MIC、512 MIC 的 MH 肉汤培养基。将 F7 从 0.5 MIC 浓度开始培养三代, 并经过 TCBS 培养基筛选后, 在放入下一浓度的 MH 肉汤培养基中, 重复依次进行。将经环丙沙星浓度为 0.5 MIC 的 MH 肉汤培养基培养三代后, 经过 TCBS 培养基筛选后得到的诱导菌株命名为 H0.5, 以此类推, 将经环丙沙星诱导后的系列菌株依次命名为 H0.5~H512。将上述诱导株在无环丙沙星的 MH 培养基中转接 20 次, 并经过 TCBS 培养基筛选后, 采用微量肉汤稀释法^[13]测定环丙沙星对诱导株的最低抑菌浓度。选择相对于初始菌株 F7, 对环丙沙星耐药水平提高, 并且耐药性能够稳定遗传的诱导株 H128、H256、H512 作为研究对象, 环丙沙星对诱导株 H128、H256、H512 的最低抑菌浓度见表 1。

1.2.3.1 副溶血弧菌的纯化与培养

取 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保藏的副溶血弧菌 F7、H128、H256、H512, 接种到 TCBS 培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 活化培养 16 h。挑取单菌落用无菌生理盐水配制成悬浮液, 并用麦氏比浊管进行比对, 以 0.5 号麦氏比浊管为标准, 将细菌浓度调整至 0.5 麦氏浊度 (此时菌浓度约 1.5×10^8 cfu/mL) 用于后续实验。

1.2.3.2 生长曲线的测定

用 LB 培养基将配制好的菌悬液稀释 150 倍, 此时细菌浓度为 1×10^6 cfu/mL, 取 200 μL 加入蜂窝盒中, 每株菌做 3 个平行, 放入生长曲线测定仪中, 每隔 2 小时测一次 OD₆₀₀ 值, 共测 48 h。利用 Excel 归整数

据并求出平均值与标准差,做出带误差线的折线图。

1.2.3.3 泳动能力的测定

具体方法参鉴张燕飞硕士论文^[16],用无菌生理盐水将配置好的菌悬液稀释 150 倍,此时细菌浓度为 1×10^6 cfu/mL。用无菌牙签蘸取菌悬液稀释液,点种于琼脂含量为 0.6% 的 LA 半固体培养基上,置于恒温培养箱中 37 °C 培养 24 h,测定泳动圈直径,每株菌设定 3 个重复。

1.2.3.4 生物膜形成能力的测定

参鉴雷欢等^[17]以结晶紫法进行测定。取 50 μ L 配置好的菌悬液与 150 μ L TSB 培养基加入 96 孔板中,于 37 °C 培养 24 h 后,取出 96 孔板,弃去浮游菌,用 250 μ L 无菌生理盐水清洗 3 次,37 °C 干燥 30 min,每孔加入 0.1% 结晶紫溶液 200 μ L,染色 15 min,用 250 μ L 无菌生理盐水洗 3 次,37 °C 干燥 30 min,再加入

33% 冰乙酸 200 μ L,静置 10 min,用酶标仪测 OD₅₉₅ 值,每株设定 6 个平行,取 OD₅₉₅ 值最接近的三组数据作为最终数据。

1.2.4 外排泵 *vmeB* *vmeD* *vpoC* *vmrA* 的表达

参考文献力等^[18]进行微调,采用 Trizol 法提取菌株总 RNA,使用超微量分光光度计测定 RNA 质量和浓度后,采用逆转录试剂盒将其反转录成 cDNA,使用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测 *vmeB*, *vmeD*, *vpoC*, *vmrA* 基因的相对表达量,以 *16srna* 为内参基因对照。RT-PCR 程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 20 s;退火 30 s;72 °C 延伸 1 min;35 个循环;72 °C 延伸 7 min。通过 C_t 值的变化计算得出 *vmeB*, *vmeD*, *vpoC*, *vmrA* 基因的相对表达量。退火温度与引物序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物

Table 2 RT-PCR primers

基因名称	引物序列	Tm 值/°C	扩增长度
<i>vmeB</i>	RT-F CCGTGCTATGGGTTACTTCTC	59	124 bp
	RT-R AAGGCTCAGGGAGTCTTGTA		
<i>vmeD</i>	RT-F TTCGTGAATACCCTGAAATG	57	104 bp
	RT-R CTCCAAAGGCTGAGTAATAA		
<i>vpoC</i>	RT-F TAGCAAAGCAAATGATCCACA	57	86 bp
	RT-R AGCACTACGGCTAGAGGTGA		
<i>vmrA</i>	RT-F CCTGATGCCTATTGTCGCAAC	53	211 bp
	RT-R TAGCCGCTCCTGTTAGCTC		
<i>16sRNA</i>	RT-F ACGTTAGCGACAGAAGAAGC	54.5	281 bp
	RT-R ACCGCTACACCTGAAATTCT		

注: RT-F/R 代表荧光定量 PCR 的前引物与后引物。

1.3 统计学分析

应用统计学软件 SPSS 20.0,计数和计量资料分别进行 χ^2 和 t 检验, $p < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 交叉耐药性实验

本研究采用微量肉汤倍比稀释法测定了几种常见抗生素对初始菌株 F7 和诱导菌株 H128、H256、H512 的最低抑制浓度 (MIC 值),见表 1。随着诱导药物环丙沙星浓度不断提高,诱导菌株对环丙沙星的耐药水平不断提高,环丙沙星对 H512 的 MIC 值达到 128 μ g/mL,相比于 F7 提高了约 512 倍。同时非诱导药物(氨苄青霉素、阿莫西林、头孢唑林钠、萘啶酮酸、四环素、氯霉素)对诱导菌株的 MIC 值提高 4 倍及 4

倍以上,其中对于头孢唑林钠、萘啶酮酸、四环素,随着诱导药物环丙沙星的浓度不断提高,诱导株呈现中介耐药或者耐药。对于阿莫西林,相比初始菌株 F7 的中介耐药,诱导株 H128、H256、H512 表现为耐药。但是对于诺氟沙星和呋喃妥因,相对于初始菌株 F7,诱导株的 MIC 值只提高了 1~2 倍,同时耐药水平也没发生变化,均为敏感,造成这一现象的原因可能是呋喃妥因属于硝基呋喃类抗生素与环丙沙星不属于同类抗生素,耐药机制存在差异,而诺氟沙星与环丙沙星虽同属于喹诺酮类抗生素,但两者作用靶点还是存在一定区别,程旭^[19]等报道了经体外诱导的得到的环丙沙星耐药沙门氏菌,对诺氟沙星敏感的现象,两种抗生素并不一定发生交叉耐药。本实验以梯度浓度的环丙沙星通过体外连续诱导的方式,得到了对环丙沙星中介耐药诱导株 H128、H256 以及高水平耐药诱导株 H512,诱导株不仅对诱导药物环丙沙星的耐药程度明

显提高, 还出现了对氨基青霉素、阿莫西林、头孢唑林钠、萘啶酮酸、四环素、氯霉素等非诱导抗生素的交叉耐药, 周维^[20]等曾报道了以诺氟沙星经过体外诱导的方式得到哈维氏弧菌诺氟沙星耐药株, 对非诱导抗生素(甲砒霉素、环丙沙星、恩若沙星)出现交叉耐药, 这些诱导株的多重耐药表型表明了非特异性耐药机制的存在, 如细胞膜通透性发生变化导致抗生素流入减少, 或者外排泵的活性增强。

2.2 生长曲线的绘制

对各菌株生长曲线进行测定, 结果见图 1。

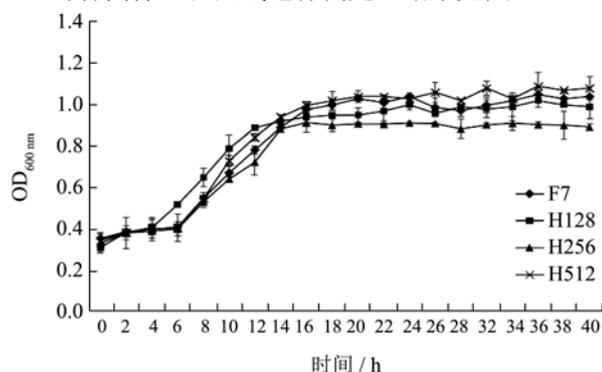


图 1 诱导株与初始菌株的生长曲线

Fig.1 Growth curve of induced strain and initial strain

由图 1 可知, F7、H256、H512 在 6 h 左右进入对数生长期, 而 H128 进入对数生长期的时间稍有缩短, 在 4 h 左右进入对数生长期。进入对数生长期后,

表 3 菌株 F7 H18 H256 H512 的泳动能力

Table 3 Moving ability of strain F7 H18 H256 H512

菌株	F7	H128	H256	H512
泳动圈直径/mm	8.63±0.094	4.83±0.047**	4.57±0.124*	5.13±0.04**

注: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ 。

2.4 生物膜形成能力

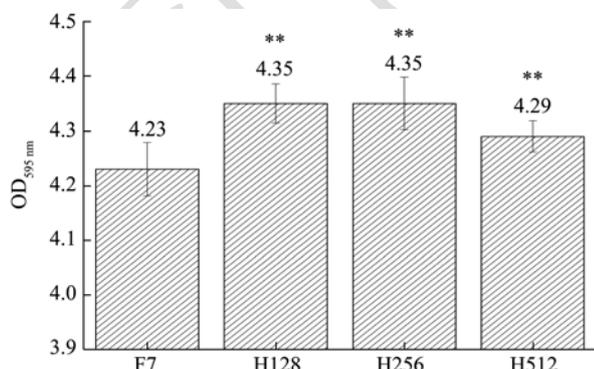


图 2 菌株 F7, H128, H256, 4512 生物膜形成量

Fig.2 The amount of biofilm formation of strain F7, H128, H256 and H512

初始菌株 F7 与诱导耐药菌 H128、H256、H512

通过折线图的斜率可以发现, H256 生长速率要略小于 F7、H128、H512。所有试验菌株都在 14 h 左右进入稳定期, 其中 F7、H128、H512 在稳定期的吸光值 OD_{600} 达到 1, 而 H256 在稳定期的吸光值 OD_{600} 为 0.9, 略低于 F7。

说明诱导耐药株相比于初始菌株 F7, 在非抗生素选择环境下的生长情况没有显著变化。研究人员李永慧等^[21], 测定了肠炎沙门菌多重耐药株与敏感株在 LB 培养基中的生长曲线与生化反应谱, 发现二者在生长速率与生化反应上均无明显差异, 与本研究结果一致。Gillespie 等人^[22]发现, 体外诱导喹诺酮耐药肺炎链球菌与初始菌株相比生长速率没有明显变化, 与本实验结论一致。

2.3 泳动能力的测定

将 F7 和各诱导株在半固体培养基上培养 24 h, 测量其泳动圈直径, 见表 3。3 株诱导耐药株中 H512 泳动直径最大为 5.13 mm, H256 最小为 4.57 mm, 均小于初始菌株 F7, 说明经过环丙沙星诱导后菌株的泳动能力均明显降低。有研究表明^[23], 细菌在获得对一种或多种抗生素的耐药性的同时, 会付出适应性代价, 即耐药株在泳动能力、毒力、生存能力等环境适应性上会弱于敏感菌株。本实验中诱导耐药株相对于初始菌株泳动能力的减弱, 可能是因为在连续体外环丙沙星诱导的过程中, 诱导株出现了适应性代价的现象。

于相同条件培养相同时间后, 采用结晶紫染色法测定生物膜的形成量, 见图 2。 OD_{595} 值越高, 生物膜形成量就越大, 反之, 生物膜形成量就越小。

生物膜是由细菌以细菌自身代谢产生的胞外多聚基质(包括多糖、蛋白质、DNA), 共同粘附在某些生物和非生物材料表面, 伴随、保护细菌正常生长的一种膜状结构群, 是一种细菌适应环境变化、应对不良环境的自我调节方式^[24]。在 LB 培养基中培养 24 h 后, 诱导株 H128、H256、H512 生物膜形成量均高于初始菌株 F7, 说明经过抗生素环丙沙星诱导后, 诱导株的生物膜形成能力明显提高。其中, H256 与 H128 生物膜形成能力较强 (OD 值为 4.35 nm), H512 较弱 (OD 值为 4.29 nm), 均高于初始菌株 F7 (OD 值为 4.23 nm)。研究人员韩婷等^[25]以喹诺酮类抗生素采用体外连续诱导多株铜绿假单胞菌, 得到对诱导抗

生素高耐药的实验室诱导菌株,发现相比于初始菌株,其诱导株的生物膜形成能力明显增强,认为当铜绿假单胞菌获得对喹诺酮类抗生素耐药性时会导致其生物膜形成能力增强,这与本文实验结果一致。本实验中并没有检测到诱导株生物膜形成能力增强程度与耐药水平高低之间的联系,推测原因可能是细菌生物膜的形成受到其相关编码基因、调控基因、群体感应等多重因素共同影响^[26],并不仅与其耐药性相关。同时,有研究表明^[27],生物膜形成强的细菌对抗生素药物、化学消毒剂的耐受能力明显高于生物膜形成能力较弱的细菌,部分细菌甚至可以依靠生物膜抵御寄主的免疫系统,说明生物膜与耐药性之间存在一定的相互影响。

2.5 外排泵 *vmeB vmeD vpoC vmrA* 的表达

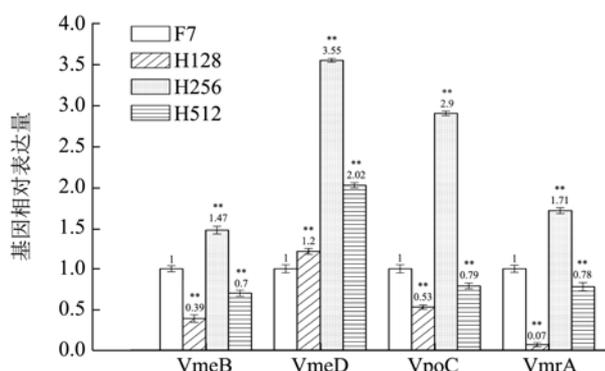


图3 外排泵基因 *vmeB vmeD vpoC vmrA* 相对表达量

Fig.3 Expression of efflux pump gene *vmeB vmeD vpoC vmrA*

采用反转录荧光定量 PCR 对 RND 型外排泵中内膜蛋白编码基因 *vmeB*、*vmeD* 和外膜蛋白编码基因 *vpoC*, 以及 MATA 家族外排泵基因 *vmrA* 的表达量进行分析,由图 3 可知,外排泵 *vmeB*、*vmeD*、*vpoC*、*vmrA* 在诱导耐药株和初始菌株中的相对表达量存在一定的差异。其中在所有诱导株中均检测到 *vmeD* 基因的表达量均高于初始菌株, H256 中 *vmeD* 基因的相对表达量最高,为初始菌株的 3.55 倍。同时仅在 H256 中外排泵 *vmeB*、*vpoC*、*vmrA* 的相对表达量上调,分别为初始菌株的 1.47、2.90、1.71 倍,这说明在诱导菌对环丙沙星耐药与交叉耐药的过程中,外排泵基因 *vmeD* 起到主要作用,外排泵基因 *vmeB*、*vpoC*、*vmrA* 起到辅助协同的作用,并推测 RND 型外排系统 VmeCD-VpoC 在诱导株的喹诺酮耐药与交叉耐药现象中扮演的重要角色。刘献清等^[28]人将鲍曼不动杆菌中 RND 外排泵相关基因敲除,比较基因敲除前后鲍曼不动杆菌耐药水平,发现 RND 外排泵介导了鲍曼不动杆菌的多重耐药,亦有研究报道了 VmeCD-VpoC 外排系统在副溶血弧菌对环丙沙星耐

药和交叉耐药中,起到了重要作用^[29],这些报道与本实验结论一致。后期可以通过外排泵抑制剂,比较抑制前后诱导耐药株 H128、H256、H512 耐药水平的变化,与外排泵基因 *vmeC*、*vmeD*、*vpoC* 相对表达量差异之间的关联,来进一步验证 VmeCD-VpoC 外排系统在副溶血弧菌对氟喹诺酮耐药以及交叉耐药中的重要作用。

3 结论

本文研究了环丙沙星诱导耐药株 H128、H256、H512 与初始菌株 F7 对十种常见抗生素的耐药性,生物学特性,以及外排泵基因 *vmrA*、*vmeC*、*vmeD*、*vpoC* 的相对表达量。实验结果表明,经过梯度浓度的环丙沙星体外诱导后,所得的诱导菌株相比于初始菌株 F7,不仅对环丙沙星的耐药性明显提高,而且对非诱导药物出现交叉耐药现象。与初始菌株 F7 相比,诱导耐药株在生物学特性上发生了以下变化:泳动能力下降、生物膜形成能力增强;同时所有诱导耐药株中,外排泵基因 *vmeD* 的相对表达量均明显高于初始菌株 F7。实验结果说明将副溶血弧菌长期暴露于低于最低抑菌浓度的抗生素药物环境中,会出现对环境抗生素高水平耐药的菌株,甚至出现交叉耐药。提示在使用抗生素药物进行治疗或者灭菌时,抗生素浓度一定要超过其最低抑菌浓度(MIC 值),不可少量反复使用,同时发现 VmeCD-VpoC 外排系统在副溶血弧菌对氟喹诺酮耐药以及交叉耐药中的重要作用,为解决副溶血性弧菌耐药问题提供了新的思路,即抗生素与外排泵抑制剂联合使用。本研究为揭示副溶血弧菌耐药性的产生和传播机制提供理论基础,为解决副溶血弧菌耐药问题提供新的思路。

参考文献

- [1] 何德辉,孔波力,何伟鹏,等.广西贵港市双壳贝类中副溶血性弧菌的分布情况[J].医学动物防制,2019,35(11):1081-1083
HE De-hui, KONG Bo-li, HE Wei-peng, et al. Distribution of *vibrio parahaemolyticus* in bivalve shellfish in guigang city, Guangxi [J]. Medical Animal Control, 2019, 35(11): 1081-1083
- [2] 赵峰,周德庆,于维森,等.东部沿海贝类中副溶血弧菌的分布及特征[J].食品与生物技术学报,2011,30(5):711-715
ZHAO Feng, ZHOU De-qing, YU Wei-sen, et al. Distribution and characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in bastern coastal shellfish [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2011, 30(5): 711-715

- [3] Kubota, Kunihiro, wasaki, et al. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus* in miyagi prefecture, Japan [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2008, 5(5): 641-648
- [4] Annick Robert-Pillot, Alain Guénolé, Jean Lesne, et al. Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 91(3): 319-325
- [5] 刘杰,曾令泽,贺晓晨,等.广西凡纳滨对虾源副溶血弧菌的分离鉴定及其耐药性[J].广西畜牧兽医,2019,35(5):197-202
LIU Jie, ZENG Ling-ze, HE Xiao-chen, et al. Isolation, identification and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from *Penaeus vannamei* in Guangxi [J]. Guangxi Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 35(5): 197-202
- [6] 郭丹凤,张昭寰,肖莉莉,等.不同耐药性致病性副溶血性弧菌的生长特性比较研究[J].食品工业科技,2014,35(19):137-141
GUO Dan-feng, ZHANG Shao-huan, XIAO Li-li, et al. Comparative study on growth characteristics of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* with different drug resistance [J]. Food Industry Technology, 2014, 35(19): 137-141
- [7] Han F, Walker R D, Janes M E, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana gulf and retail raw oysters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 7096-7098
- [8] Jiang Y, Yao L, Li F, et al. Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicas*) [J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 59(2): 147-154
- [9] Lupien A, Billal D S, Fani F, et al. Genomic Characterization of ciprofloxacin resistance in a laboratory-derived mutant and a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(10): 4911-4919
- [10] Chen J, Morita Y, Huda M N, et al. *VmrA*, a member of a novel class of Na⁺-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(2): 572-576
- [11] Kiralj R, MárciaM C, Ferreira. Comparative chemometric and QSAR/SAR study of structurally unrelated substrates of a MATE efflux pump *vmrA* from *V. parahaemolyticus*: prediction of multidrug resistance [J]. Qsar & Combinatorial Science, 2008, 27(3): 314-329
- [12] Matsuo T, Nakamura K, Kodama T, et al. Characterization of all RND-type multidrug efflux transporters in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbiology Open, 2013: 732-734
- [13] 吴高升.体外诱导副溶血弧菌耐药株对喹诺酮类药物的抗性机制研究[D].武汉:武汉轻工大学,2015
WU Gao-sheng. *In vitro* induced resistance mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* resistant strains to quinolones [D]. Wuhan: Wuhan Ploytechnical University, 2018
- [14] Michéa-Hamzehpour M, Kahr A, Pechère J C. *In vitro* stepwise selection of resistance to quinolones, beta-lactams and amikacin in nosocomial gram-negative bacilli [J]. Infection, 1994, 22: 105-110
- [15] 樊英,盖春蕾,王晓璐,等.中草药抑制剂对中国对虾致病菌哈维氏弧菌的抑制效果[J].湖南农业大学学报(自然科学版), 2017,43(6):657-661
FAN Ying, GAI Chun-lei, WANG Xiao-lu, et al. Inhibitory effect of Chinese herbal medicine inhibitors on the shrimp pathogen *Vibrio harveyi* [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2017, 43(6): 657-661
- [16] 张燕飞.溶藻弧菌双组份调控系统KdpDE减毒活疫苗的构建及其交叉免疫保护性研究[D].湛江:广东海洋大学,2015
ZHANG Yan-fei. Construction of KdpDE live attenuated vaccine of two-component regulatory system of *Vibrio alginolyticus* and its cross-immune protection [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015
- [17] 雷欢,魏宇清,方祥,等.副溶血弧菌生物膜的形成及壳聚糖的抑制作用[J].食品与发酵工业,2016,42(10):29-33
LEI Huan, WEI Yu-qing, FANG Xiang, et al. Formation of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm and inhibition of chitosan [J]. Food and Fermentation Industry, 2016, 42(10): 29-33
- [18] 文星力,黄小翠,余婷,等.多药耐药鲍曼不动杆菌外排系统Ade B、Ade IJK与氟喹诺酮类耐药的关系[J].解放军预防医学杂志,2019,37(08):169-170
WEN Xin-li, HUANG Xiao-cui, YU Ting, et al. Relationship between Ade B, Ade IJK and fluoroquinolones resistance in multidrug resistant efflux system of *Acinetobacter baumannii* [J]. Journal of Preventive Medicine of People Liberation Army, 2019, 37(8): 169-170
- [19] 程旭,沈欣悦,刘梅,等.五种喹诺酮类药物体外诱导鸡白痢沙门菌耐药与交叉耐药的研究[J].中国家禽,2017,39(9): 20-23
CHENG Xu, SHEN Xin-yue, LIU Mei, et al. Study on five quinolone drugs inducing resistance and cross-resistance of *Salmonella* in chicken [J]. Chinese poultry, 2017, 39(9):

- 20-23
- [20] 周维. 体外诱导哈维氏弧菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2016
- CHOU Wei. Study on the mechanism of induction of the resistance of *Vibrio harveyi* to quinolones *in vitro* [D]. ShenJiang: Guangdong Ocean University, 2016
- [21] 李永慧, 苏硕青, 李巧玲, 等. 肠炎沙门菌 pagC 基因缺失株构建及其相关生物学特性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(22): 3378-3382
- LIU Yong-hui, SU Suo-qing, LI Qiao-lin, et al. Construction of pagC gene deletion strain of *Salmonella enteritis* and its related biological characteristics [J]. Chinese Journal of Nosocomial Infectiology, 2019, 29(22): 3378-3382
- [22] Gillespie S H, Voelker L L, Dickens A. Evolutionary barriers to quinolone resistance in streptococcus pneumoniae [J]. Microbial Drug Resistance, 2002, 8(2): 79-84
- [23] 杨焰, 游雪甫, 李聪然. 耐药细菌的适应性代价及补偿性进化[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(7): 784-792
- YANG Yan, YOU Xue-fu, LI Cong-ran. The adaptive cost and compensatory evolution of drug-resistant bacteria [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2019, 44(7): 784-792
- [24] Niels H, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms [J]. International Journal of Antimicrobial Agent, 2010, 35(4): 322-332
- [25] 韩婷. 喹诺酮类药物诱导铜绿假单胞菌后对其生物膜形成能力影响的研究[D]. 太原: 山西医药大学, 2015
- HAN Ting. Effect of quinolone-induced *Pseudomonas aeruginosa* on its biofilm formation ability [D]. TaiYuan: Shanxi Medical University, 2015
- [26] 霍佳楠. 蒲公英水提物对金黄色葡萄球菌生物膜的影响[D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2014
- HUO Jia-nan. Effect of dandelion water extract on *Staphylococcus aureus* biofilm [D]. Heilongjiang: Northeast Agricultural University, 2014
- [27] 张智琪. 氟喹诺酮类药物诱导铜绿假单胞菌生物膜及耐药机制研究[D]. 太原: 山西医药大学, 2018
- ZHANG Zhi-qi. Fluoroquinolones induced biofilms and drug resistance mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018
- [28] 刘献清, 蔺飞, 彭勤, 等. 鲍曼不动杆菌耐药结节化细胞分化家族外排泵基因对耐药性的影响[J]. 成都医学院学报, 2019, 14(5): 551-556
- LIU Xian-qing, LIN Fei, PENG Qin, et al. Effect of efflux pump genes of *Acinetobacter baumannii* drug-resistant nodule cell differentiation family on drug resistance [J]. Journal of Chengdu Medical College, 2019, 14(5): 551-556
- [29] Matsuo T, Hayashi K, Morita Y, et al. VmeAB, an RND-type multidrug efflux transporter in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbiology, 2007, 153(12): 4129-4137

(上接第 219 页)

- [29] 张莉会, 廖李, 汪超, 等. 超声和渗透预处理对干燥草莓片品质及抗氧化活性影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(12): 196-203
- ZHANG Li-hui, LIAO Li, WANG Chao, et al. Effects of ultrasonic and osmotic pretreatment on the quality and antioxidant activity of dried strawberry tablets [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(12): 196-203
- [30] 赵丹丹, 陈冬, 彭郁, 等. 枸杞热风干燥过程动力学模型及品质分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(3): 114-124
- ZHAO Dan-dan, CHEN Dong, PENG Yu, et al. Dynamic model and quality analysis of *Lycium barbarum* hot air drying process [J]. Chinese Journal of Food, 2018, 18(3): 114-124
- [31] 李朋亮, 廖若宇, 王旭, 等. 枸杞晒干过程中黄酮类化合物和苯丙氨酸解氨酶活性的变化[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 79-83
- LI Peng-liang, LIAO Ruo-yu, WANG Xu, et al. Changes of flavonoids and phenylalanine ammonia-lyase activities during drying of *Lycium barbarum* [J]. Food Science, 2014, 35(23): 79-83
- [32] 唐璐璐, 易建勇, 毕金峰, 等. 预处理对压差闪蒸干燥丰水梨脆片品质及微观结构的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 73-78
- TANG Lu-lu, YI Jian-yong, BI Jin-feng, et al. Effect of pretreatment on quality and microstructure of fengshui pear chips dried by differential pressure flash [J]. Food Science, 2016, 37(21): 73-78