

昆明地区耐碳青霉烯铜绿假单胞菌 10 种膜蛋白编码基因表达的实验研究

卢 赞¹, 赵红燕¹, 李春付¹, 尹利民¹, 任宝军¹, 宋贵波², 杨 旭³ (1. 昆明市第一人民医院, 昆明 650221; 2. 昆明医科大学第一附属医院, 昆明 650032; 3. 昆明医科大学第二附属医院, 昆明 650101)

摘要: **目的** 掌握昆明地区碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌 (CRPA) 膜蛋白表达的分子流行情况, 为临床合理用药及外排泵抑制剂的应用提供依据。**方法** 收集昆明地区四所医院 2022 年 10 月 ~ 2023 年 8 月分离的铜绿假单胞菌, 使用 SYBR-PCR 法定量检测 10 种膜蛋白编码基因 mRNA 相对表达量 (RE), 包括 mexA, B, C, D, E, F, X, Y 及 oprD, M。根据头孢他啶 (CAZ)、头孢吡肟 (CFP)、亚胺培南 (IPM)、美罗培南 (MEM) 耐药表型组合将菌株分为 5 组, 包括全敏感组 (I 组), 全耐药组 (II 组), IPM, MEM 耐药、CAZ 及 CFP 敏感组 (III 组), IPM 耐药、MEM 非耐药 (敏感或中介) 组 (IV 组) 和 IPM, MEM 耐药、CAZ 和 CFP 非耐药组 (V 组), 分析不同耐药表型组间各膜蛋白编码基因的 RE 中位数情况。**结果** 共收集 108 株铜绿假单胞菌, I 组 24 株作为对照, 84 株为碳青霉烯耐药组, 包括 II 组 32 株, III 组 22 株, IV 组 13 株和 V 组 17 株。耐药组 mexD, mexE, mexF, mexX 和 mexY 表达高于对照组, 差异具有统计学意义 ($U=409.5 \sim 661.0$, 均 $P<0.05$); mexA, mexB, mexC, oprD, oprM 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($U=767.0 \sim 1\,004.5$, 均 $P>0.05$)。各膜蛋白编码基因 RE 在不同医院来源菌株间的表达, 差异无统计学意义 ($H=0.914 \sim 7.407$, 均 $P>0.05$)。四组不同表型中, mexA 和 oprM RE 在各组无规律分布与对照组比较差异无统计学意义 ($U_{mexA}=95.0 \sim 264.0$, $U_{oprM}=143.0 \sim 331.0$); 各组 mexC RE 均低于对照组, 但差异无统计学意义 ($U=134.0 \sim 344.5$, 均 $P>0.05$); mexE 和 mexY RE 均高于对照组 ($U_{mexE}=48.0 \sim 230.0$, $U_{mexY}=83.0 \sim 184.0$), mexB 在 IV 组中低于对照组 ($U=72.0$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。mexD 和 mexF 表现一致, 在 III, IV, V 组表达高于对照组 ($U_{mexD}=34.0 \sim 102.0$, $U_{mexF}=65.0 \sim 113.0$), mexX 在 II, IV, V 组表达高于对照组 ($U=164.0, 58.0, 111.0$), oprD 仅在 III 组表达低于对照组 ($U=140.0$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$); oprD 在 II, IV, V 组中表达虽低于对照组, 但差异无统计学意义 ($U=381.0, 102.0, 144.0$, 均 $P>0.05$)。**结论** mexCD, mexEF, mexXY 是昆明地区 CRPA 主要外排泵的膜蛋白组合, 通过 mexD, E, F, X, Y 膜蛋白表达上调加强外排, mexAB-oprM 外排泵与该地区 CRPA 碳青霉烯耐药相关性低, oprD 低表达在不产 β -内酰胺酶的菌株中与外排机制共同发挥作用, 但在产酶菌株中则未见显著的低表达差异。

关键词: 铜绿假单胞菌; 碳青霉烯耐药; 外排泵; 膜蛋白

中图分类号: R378.991; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 01-007-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.01.002

Experimental Study on Expression of Carbapenem Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*'s 10 Membrane Protein Coding Genes in Kunming

LU Zan¹, ZHAO Hongyan¹, LI Chunfu¹, YIN Limin¹, REN Baojun¹, SONG Guibo², YANG Xu³

(1. the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650221, China; 2. the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China; 3. the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China)

Abstract: **Objective** To understand the membrane protein molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA) in the region, and provide some evidence for rational drug use or application of efflux pump inhibitors. **Methods** Collected *Pseudomonas aeruginosa* isolated from four hospitals in the region from October 2022 to August 2023, and used SYBR-PCR method to quantitatively detect the relative mRNA expression (RE) levels of 10 membrane protein coding genes, including mexA, B, C, D, E, F, X, Y, and oprD, M. Then categorized the strains into five groups based on ceftazidime, cefepime, imipenem, and meropenem resistance phenotype combination, including the compassionate group (Group I), Group II with full resistance, IPM, MEM resistant, CAZ and CFP sensitive groups (Group III), IPM resistance, MEM non-resistance

基金项目: 昆明市卫生健康委员会卫生科研项目 (2022-11-01-022)。

作者简介: 卢赞 (1978-), 男, 学士, 副主任技师, 研究方向: 临床微生物检验, E-mail: luzan_km@163.com。

(sensitive or intermediate) group (Group IV), IPM, MEM resistance, CAZ and CFP non-resistance groups (Group V). The median RE of each membrane protein-coding gene was analyzed. **Results** A total of 108 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were collected, with 24 strains in Group I as controls and 84 strains in the carbapenem resistant group, including 32 strains in Group II, 22 strains in Group III, 13 strains in Group IV, and 17 strains in Group V. The expression of mexD, mexE, mexF, mexX and mexY in the drug-resistant group was higher than that in the control group, and the differences were statistically significant ($U=409.5 \sim 661.0$, all $P<0.05$). There was no statistically significant difference in mexA, mexB, mexC, oprD and oprM with the control group ($U=767.0 \sim 1004.5$, all $P>0.05$). There was no significant difference in the expression of RE genes encoding various membrane proteins among strains from different hospitals ($H=0.914 \sim 7.407$, all $P>0.05$). Among the four different phenotypes, there was no statistically significant difference in the irregular distribution of mexA and oprM RE between each group and the control group ($U_{\text{mexA}}=95.0 \sim 264.0$, $U_{\text{oprM}}=143.0 \sim 331.0$). The mexC RE in each group was lower than that in the control group, but the differences were not statistically significant ($U=134.0 \sim 344.5$, all $P>0.05$). MeixE and meixY RE were both higher than the control group, and the differences were statistically significant ($U_{\text{mexE}}=48.0 \sim 230.0$, $U_{\text{mexY}}=83.0 \sim 184.0$). MeixB was lower than the control group in group IV ($U=72.0$), and the differences were statistically significant (all $P<0.05$). MeixD and meixF showed consistent expression, with higher expression in groups III, IV and V compared to the control group ($U_{\text{meixD}}=34.0 \sim 102.0$, $U_{\text{meixF}}=65.0 \sim 113.0$). MeixX was expressed higher in groups II, IV and V compared to the control group ($U=164.0, 58.0, 111.0$), while oprD was only expressed lower in group III than in the control group ($U=140.0$), with statistically significant differences (all $P<0.05$). Although the expression of oprD in groups II, IV and V was lower than that in the control group, the differences were not statistically significant ($U=381.0, 102.0, 144.0$, all $P>0.05$). **Conclusion** ExCD, mexEF and mexXY are the main membrane protein combinations of CRPA efflux pumps in Kunming area. Upregulation of mexD, E, F, X, and Y membrane protein expression enhanced efflux. The correlation between mexAB oprM efflux pump and carbapenem resistance in CRPA in this area was low. The low expression of oprD played a role in the efflux mechanism in strains that do not produce β -lactase, but there was no significant difference in low expression in enzyme producing strains.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenem resistance; efflux pump; membrane protein

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是一种引起医院感染的重要病原菌^[1], 在住院患者中分离率居第四位^[2]。多重耐药 PA 引起感染会导致更高的死亡率^[3], 其耐药机制较肠杆菌更为复杂, 包括形成生物膜、膜通透性改变、产生碳青霉烯酶及外排增强等^[4]。膜通透性改变与外排依赖于膜蛋白的表达与功能, 其中外膜蛋白作为通道蛋白, 既可独立决定抗生素的通过, 又与内膜蛋白、膜融合蛋白共同组成外排泵^[5-6], 外排泵过表达同时影响群体感应系统而增强 PA 对环境的适应性^[7]。目前已知 PA 有 1 种抗性结节细胞分裂 (resistance nodule cell division, RND) 超家族外排系统^[8], 由三类膜蛋白组合而成, 膜蛋白表达受编码基因控制。本研究通过检测昆明地区四所医院碳青霉烯耐药 PA (carbapenem resistance PA, CRPA) 10 种膜蛋白编码基因的相对表达量以反映膜蛋白的表达情况, 旨在掌握本地 CRPA 膜蛋白分子流行情况及其与碳青霉烯耐药的相关性, 为临床合理用药及外排泵抑制剂的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 根据碳青霉烯类药物敏感性收集昆明市四所三级医院 2022 年 10 月 ~ 2023 年 8 月自各类

临床标本分离的铜绿假单胞菌 108 株。其中昆明医科大学第一附属医院 (附一院)、昆明医科大学第二附属医院 (附二院) 各 16 株耐药菌, 昆明市第一人民医院南院区 (市一南院) 14 株 (11 株耐药, 3 株敏感), 昆明市第一人民医院北院区 (市一北院) 62 株 (41 株耐药, 21 株敏感)。

1.2 仪器与试剂 Bruker Microflex 质谱仪 (德国 Bruker Dalonik); Vitek2 Compact 全自动细菌鉴定药敏分析仪 (法国生物梅里埃); Lambda XLS+ 紫外/可见光光谱仪 (美国 PerkinElmer); SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪 (上海宏石); 浊度仪 (法国生物梅里埃); RNAperp Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒 (北京天根); cDNA 第一链合成试剂盒 (美国 GEN-VIEW); SYBR Green PCR Premix HS Taq (Real Time) 试剂盒 (美国 GEN-VIEW); 铜绿假单胞菌标准菌株 (ATCC27853) 由国家卫健委临床检验中心提供。引物由上海生工合成。

1.3 方法

1.3.1 细菌分离: 培养按照《全国临床检验操作规程》第四版执行, 鉴定根据 Bruker Microflex 质谱仪说明操作, 稀释法药敏试验使用 Vitek2 Compact 按仪器标准操作程序操作, 折点执行 CLSI-M100 文件第 32 版。

1.3.2 RNA 与 PCR 模板制备

1.3.2.1 冻存菌株室温解冻后，接种于哥伦比亚血平板，过夜培养 18 ~ 24h 后，取新鲜菌落接种于血培养瓶肉汤中摇晃培养 18 ~ 24h 形成浓菌液。将浓菌液稀释至浊度为 3.5 ± 0.3 麦氏单位，根据 RNA 提取试剂盒说明书操作提取细菌总 RNA。

1.3.2.2 使用 Lambda XLS+ 紫外 / 可见光光谱仪检测 RNA 浓度：检测参数：波长 260nm，因子 40。浓度低于 136.4mg/ml 为不合格，需重新提取，合格 RNA 即时进行 cNDA 合成或 -70℃冻存。

1.3.3 cDNA 合成：使用 cDNA 第一链合成试剂盒按说明书定量合成 cDNA。定量方法：以 1.5 μg RNA 加入

量为标准，根据 RNA 浓度计算加入体积，总反应体系 20 μl，不足量用 ddH₂O 补足。产物 -20℃保存备用。

1.3.4 膜蛋白编码基因 mRNA 检测与相对定量

1.3.4.1 实时荧光定量 PCR（RT-PCR）：使用 SYBR Green PCR Premix HS Taq（Real Time）试剂盒，配制 10 μl 反应体系：SYBR Premix Ex Taq II（2 × ）5 μl，10 倍稀释 cDNA 1 μl，正反向引物各 0.5 μl，ddH₂O 3 μl。反应条件：95℃ 3min；95℃ 5s，60℃ 34s，40 个循环。每个基因重复检测 3 次取均值，同时检测 16s-rRNA 作为内参基因，记录 Ct 值。以标准菌株 ATCC27853 相同处理作为表达量对照株。引物序列见表 1。

表 1 PA 膜蛋白编码基因引物序列		
基因	上游序列	下游序列
oprM	5'-CGGTTTCGGTTCCTGGTTG-3'	5'-CGTCTGGATCGCCTTCTCGT-3'
mexE	5'-CACTTCTCCTGGCGCTACC-3'	5'-GAATTCGTCCTCCACTCGTTCA-3'
oprD	5'-CTGACTTTTCATGGTCCGCTAT-3'	5'-GGTTGGTTTCGTGGTGCTT-3'
mexF	5'-CTGGTGC GG GAGAAGATG-3'	5'-GAAGATGGTCGGGTCGTAGA-3'
mexA	5'-TGAACGGCATCATCCTCAAGCG-3'	5'-GTAGGTGGCGGGGTCGATCTGG-3'
mexX	5'-CAGGCGATCACTGTCCCG-3'	5'-CCACGTCTTCCACCACTCC-3'
mexB	5'-AACGTGCAGATTTCCTCCG-3'	5'-TGACCTTGAGCAGGATGTTTC-3'
mexY	5'-CCGCTGTTCTTCTCGGTG-3'	5'-GCTCCGTGGGGTATTGG-3'
mexC	5'-CCTGAACCTCGGCTACGC-3'	5'-GCGGTCTGGGTGAAATCc-3'
16s rRNA	5'-AGTCCACGCCGTAAACGA-3'	5'-AATTAAACCATGCTCCACC-3'
mexD	5'-TGGTCAGCGGTATGTCCAA-3'	5'-CCCTGCTCCCAGAGTTCC-3'

1.3.4.2 mRNA 相对表达量（relative expression,RE）： $RE=2^{-\Delta\Delta Ct}$ ， $\Delta\Delta Ct=(Ct_{检测菌株目的基因}-Ct_{检测菌株 16s-rRNA})-(Ct_{对照菌株目的基因}-Ct_{对照菌株 16s-rRNA})$ 。

1.3.5 耐药表型分组：以头孢他啶 (CAZ)、头孢吡肟 (CFP)、亚胺培南 (IPM)、美罗培南 (MEM) 全敏感菌作为对照组（I 组）；全耐药菌为 II 组；亚胺培南、美罗培南耐药，头孢他啶及头孢吡肟均敏感为 III 组；亚胺培南耐药，美罗培南非耐药（敏感或中介）为 IV 组；亚胺培南、美罗培南耐药，头孢他啶和头孢吡肟非均敏感且非均耐药为 V 组。分析各组与对照组 RE 中位数情况。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。经正态性检验，数据非正态分布，以中位数（四分位距）[M(IQR)] 描述，不同耐药表型与对照组间比较采用两个独立样本 Mann-Whitney U 检验，不同医院来源间比较采用多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验，α=0.05，P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 碳青霉烯耐药组与对照组（I 组）膜蛋白 RE 差异 见表 2。I 组菌共 24 株，碳青霉烯耐药组 84 株。耐药组 mexD，E，F，X，Y 表达均高于对照组，差异具有统计学意义（均 P<0.05）。mexA，B，C，

oprD 和 oprM 与对照组比较差异无统计学意义（均 P>0.05）。

表 2 耐药组与敏感组 CRPA 膜蛋白基因 RE 中位数（四分位距）[M(IQR)]

基因	I 组	耐药组	H	P 值
mexA	2.23 (1.86)	2.39 (4.75)	1 004.5	0.979
mexB	1.68 (1.14)	1.48 (3.68)	954.5	0.693
mexC	0.17 (0.39)	0.12 (0.28)	927.0	0.549
mexD	0.20 (0.88)	2.85 (10.75)	481.0	< 0.001
mexE	0.28 (0.48)	1.62 (6.54)	409.5	< 0.001
mexF	0.30 (0.33)	0.70 (2.37)	661.0	0.012
mexX	1.33 (3.75)	8.37 (25.23)	530.0	0.003
mexY	0.48 (0.69)	0.97 (1.20)	488.5	0.001
oprD	1.59 (1 678.62)	1.04 (178.21)	767.0	0.101
oprM	0.93 (0.75)	1.05 (1.94)	882.5	0.354

2.2 不同医院来源菌株膜蛋白 RE 差异 见表 3。CRPA 膜蛋白编码基因 RE 在不同医院来源菌株间差异无统计学意义（均 P>0.05）。

表 3 不同医院 CRPA 膜蛋白基因 RE 中位数 (四分位距) [M(IQR)]

基因	市一北院	市一南院	附一院	附二院	H	P 值
mexA	2.06 (2.90)	3.59 (11.45)	2.35 (3.39)	3.50 (6.36)	1.554	0.670
mexB	1.32 (2.05)	1.96 (4.88)	2.06 (3.53)	3.44 (5.13)	2.404	0.493
mexC	0.10 (0.14)	0.12 (0.45)	0.25 (0.50)	0.16 (0.26)	4.544	0.208
mexD	2.91 (9.99)	1.09 (24.63)	3.99 (13.04)	1.17 (3.42)	2.094	0.553
mexE	1.62 (6.00)	1.77 (27.10)	3.18 (1131.48)	0.64 (1.44)	7.427	0.059
mexF	0.90 (2.60)	0.60 (1.18)	0.73 (2.23)	0.60 (1.01)	0.914	0.822
mexX	14.52 (39.14)	4.07 (53.89)	19.73 (36.81)	2.52 (33.54)	2.538	0.468
mexY	0.86 (0.98)	0.78 (1.13)	1.35 (1.34)	1.24 (1.69)	2.328	0.507
oprD	1.38 (3 678.61)	1.03 (694.09)	0.73 (1.92)	1.07 (128.21)	1.793	0.616
oprM	1.20 (1.46)	1.14 (6.56)	1.03 (1.62)	0.74 (2.27)	1.485	0.686

2.3 不同耐药表型组与对照组间膜蛋白 RE 差异 见表 4。四组不同耐药表型中, mexA 和 oprM RE 在各组无规律分布与对照组比较, 差异无统计学意义 ($U_{\text{mexA}}=345.5, 264.0, 95.0, 178.0, U_{\text{oprM}}=331.0, 217.0, 143.0, 165.5$, 均 $P>0.05$), 各组 mexC RE 均低于对照组, 但差异无统计学意义 ($U=344.5, 222.5, 134.0, 147.0$, 均 $P>0.05$); mexE 和 mexY RE 均高于对照组 ($U_{\text{mexE}}=230.0, 69.5, 48.0, 62.0, U_{\text{mexY}}=184.0, 134.0, 83.0, 87.5$), mexB 在 IV 组中低于对照组 ($U=72.0$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。mexD 和 mexF 表现一致, 在 III, IV, V 组表达高于对照组 ($U_{\text{mexD}}=102.0, 35.0, 34.0, U_{\text{mexF}}=113.0, 65.0, 113.0$); mexX 在 II, IV, V 组表达高于对照组 ($U=164.0, 58.0, 111.0$), oprD 仅在 III 组表达低于对照组 ($U=140.0$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$); 在 II, IV, V 组中表达虽低于对照组, 但差异无统计学意义 ($U=381.0, 102.0, 144.0$, 均 $P>0.05$)。其它膜蛋白编码基因 RE 在不同耐药表型与对照组间比较, 差异无统计学意义 ($U=95.0 \sim 345.5$, 均 $P>0.05$)。

表 4 不同耐药表型组与 I 组膜蛋白基因 RE 中位数 (四分位距) [M(IQR)]

基因	I 组	II 组	III 组	IV 组	V 组
mexA	2.23 (1.86)	2.81 (3.45)	2.32 (5.93)	1.40 (1.98)	3.29 (8.49)
mexB	1.68 (1.14)	2.09 (4.71)	1.75 (4.45)	0.94 (0.76)	1.26 (6.33)
mexC	0.17 (0.39)	0.114 (0.72)	0.11 (0.20)	0.13 (0.31)	0.12 (0.15)
mexD	0.20 (0.88)	0.25 (2.79)	3.57 (13.46)	6.82 (15.44)	5.27 (20.22)
mexE	0.28 (0.48)	0.79 (172.84)	1.69 (16.31)	1.56 (2.68)	1.91 (3.94)
mexF	0.30 (0.33)	0.25 (0.98)	1.23 (2.10)	1.69 (4.05)	0.78 (2.28)
mexX	1.33 (3.75)	26.35 (62.70)	5.15 (16.89)	4.07 (43.62)	12.38 (32.38)
mexY	0.48 (0.69)	0.97 (1.34)	1.13 (1.26)	0.88 (0.91)	0.98 (1.07)
oprD	1.59 (1 678.62)	1.41 (116.82)	0.35 (6.95)	0.55 (7 844.06)	0.94 (3 547.80)
oprM	0.93 (0.75)	1.08 (1.73)	1.19 (2.21)	0.83 (1.26)	1.07 (6.46)

3 讨论

RND 超家族是 PA 主要的外排系统, 由膜融合蛋白、内膜蛋白和外膜蛋白组成三联外排泵^[9], 主要与耐药相关的有 mexAB-oprM, mexCD-oprJ, mexEF-oprN, mexXY-oprM。膜蛋白编码基因为 PA 所固有^[10], 其表达受操纵基因突变影响^[11], 进而影响外排泵与膜通透功能。因此, 本研究通过检测膜蛋白编码基因 mRNA 相对表达量以反映细菌膜蛋白表达情况。

表 2 显示, CRPA 伴有 mexD, E, F, X, Y 表达的显著升高, 说明 CRPA 对碳青霉烯类外排增强与该 5 种膜蛋白表达上调密切相关。若将耐药基因表达量较对照株表达量 ≥ 2 倍定义为高表达^[12], 则 mexD, X 在 CRPA 菌株中属于高表达 (对照株 ATCC27853, RE=1)。mexA, B, C, oprD 和 oprM 表达与敏感组无差异, 提示 mexAB-oprM 非 PA 主要的外排泵。碳青霉烯耐药菌株 oprD 表达低于敏感组但差异无统计学意义, 说明膜通透性降低

非 CRPA 的主要机制,也说明本地区 CRPA 的主要机制为产碳青霉烯酶或外排增强。

不同医院、不同地域来源的同种细菌可能因不同的抗生素接触方式被诱导出不一样的耐药机制表达^[13]。表3显示,在84株CRPA中,各膜蛋白编码基因在不同医院来源菌株间的表达均无显著差异,提示本地区CRPA膜蛋白的表达未受抗生素的接触诱导而形成差异。

膜通透性障碍、外排增强及产生碳青霉烯酶是CRPA的主要且公认的机制^[14]。头孢他啶和头孢吡肟主要耐药机制为细菌产生 β -内酰胺酶,较少受膜通透性降低和外排增强的影响,该二药能耐受青霉素酶等水解活性较弱的 β -内酰胺酶,对超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)也具有一定耐受性,但不能耐受头孢菌素酶(AmpC)和碳青霉烯酶,亚胺培南和美罗培南能耐受除碳青霉烯酶外的所有 β -内酰胺酶,但在PA中,膜通透性改变和外排增强亦是重要且常见的耐药机制,因此根据该四种药物的耐药表型可推测细菌可能表达的耐药机制,本文根据四种药物不同耐药表型将耐药菌株分为4组。II组为产碳青霉烯酶或外排增强合并ESBL, AmpC等水解酶机制,该组mexE, X, Y表达显著高于敏感组,说明其中有部分菌株确定存在并发外排增强的机制。III组表型推测不产 β -内酰胺酶,为单纯的因外排或膜通透性降低所致的CRPA菌株,该组膜蛋白表现为mexD, E, F, Y表达增强, oprD表达降低。IV组为亚胺培南与美罗培南不一致组,该二药在不同菌谱的抗菌活性上有差别^[15],对碳青霉烯酶稳定性差异具有争议^[16-17],但本组头孢他啶和头孢吡肟敏感可排除产碳青霉烯酶,均为PA亦排除了抗菌活性差异性,因此本组亚胺培南和美罗培南敏感性不一致应为内膜蛋白对不同底物存在的选择或亲和性差异所致^[18]。该组亚胺培南耐药而美罗培南非耐药,三种内膜蛋白mexD, F, Y表达均显著高于敏感组,但mexB显著降低,可能提示高表达的膜蛋白与亚胺培南亲和性更高,而mexB则与美罗培南亲和性更高。V组中头孢他啶和头孢吡肟非均敏感且非均耐药,提示该组菌在由膜孔蛋白缺失或外排增强导致碳青霉烯类耐药的基础上,还存在产ESBL或AmpC的机制。该组膜蛋白与III组相比表现出mexX表达增强,而oprD与敏感组无明显差异。有报道mexB删除能明显提升细菌对碳青霉烯类敏感性^[19],表4中mexB仅在IV组显著低表达,且mexA和oprM在各组均无表达差异,说明mexAB-oprM不是本地区CRPA的主要外排泵,也进一步证明mexB与亚胺培南和美罗培南的亲和性存在差

异。mexCD-oprJ外排泵中mexD高表达而mexC无表达差异,包括本研究中其它外排泵的三种蛋白也未见一致的同时增强或减低,说明组成外排泵的各种蛋白分子数量不需固定的比例关系,已有研究显示不同转运蛋白具有部分重叠的功能位点^[20],mexB, D, F, Y四种转运蛋白有一种表达上调即可表现出抗生素最低抑菌浓度(MIC)升高^[21],mexCD中仅内膜转运蛋白mexD表达上调介导碳青霉烯类耐药符合上述结论。oprM与mexAB或mexXY组成三联外排泵,表4中mexX和Y均基本呈显著高表达表现,而mexA, B, oprM无明显表达差异,提示mexXY-oprM是CRPA主要的外排泵,mexAB-oprM则相反,且mexXY-oprM功能的发挥主要由mexX和mexY介导。oprD是碳青霉烯类抗生素进入细菌外膜的唯一通道,不同亚型对不同碳青霉烯类药物亲和性不同,如本文前述,oprD表达下调不是本地CRPA的主要机制,具体表现为仅在III组显著低表达,说明oprD表达下调在本地区不产 β -内酰胺酶的CRPA中,与外排机制共同主导对碳青霉烯类耐药,在产酶的菌株中,则不发挥主要作用。

综上,本研究显示本地区CRPA耐药机制复杂,常并发多种耐药机制共存,不同耐药机制菌株中各膜蛋白表达情况不同。mexCD, mexEF, mexXY是介导PA碳青霉烯耐药主要外排泵的膜蛋白组合,mexAB-oprM外排泵则与CRPA碳青霉烯耐药机制无关,oprD低表达在不产 β -内酰胺酶的菌株中与外排机制共同发挥作用,但在产酶菌株中则未见显著性的低表达差异。

(致谢: 本文的完成得到了西安述美生物科技有限公司卢晓昭博士的帮助。卢晓昭博士为本文设计了所有引物序列,并为实验方案的建立和改进提供了大量理论指导,在此致以衷心的感谢!)

参考文献:

- [1] KYLAT R I. *Pseudomonas aeruginosa* necrotizing bronchopneumonia [J]. Autopsy and Case Reports, 2021, 11: e2021271.
- [2] 全国细菌耐药监测网. 2021年全国细菌耐药监测报告[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(6): 566-581. China Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2021 national antimicrobial resistance surveillance report [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2023, 46(6): 566-581.
- [3] COSENTINO F, VIALE P, GIANNELLA M. MDR/XDR/PDR or DTR? which definition best fits the resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*? [J]. Current Opinion in Infectious Diseases, 2023, 36(6): 564-571.
- [4] 尚佳文, 徐文娜, 许南松, 等. mCIM和碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测CRE和CRPA产酶表型的方法学评价[J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(3): 165-169. SHANG Jiawen, XU Wenna, XU Nansong, et al.

- Methodological evaluation of mCIM and carbapenemase inhibitor-enhancing assays to detect CRE and CRPA enzyme producing phenotypes [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(3): 165-169.
- [5] LORUSSO A B, CARRARA J A, BARROSO C D N, et al. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(24): 15779.
- [6] CACCIOTTO P, BASCIU A, OLIVA F, et al. Molecular rationale for the impairment of the MexAB-OprM efflux pump by a single mutation in MexA [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2022, 20: 252-260.
- [7] ALCALDE-RICO M, OLIVARES-PACHECO J, HALLIDAY N, et al. The impaired quorum sensing response of *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux pump overexpressing mutants is not due to non-physiological efflux of 3-oxo-C12-HSL [J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(12): 5167-5188.
- [8] IVANOV M E, FURSOVA N K, POTAPOV V D. *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump superfamily (review of literature)[J]. Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika, 2022, 67(1): 53-58.
- [9] 王生成, 杨祚明, 蔡潇阳, 等. 海南某三甲医院多重耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM 表达及与耐药表型的关系研究 [J]. 实用药物与临床, 2020, 23(3): 247-252.
- WANG Shengcheng, YANG Zuoming, CAI Xiaoyang, et al. Expression of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN and MexXY-OprM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and their relationship with drug resistance phenotypes in a Third Class A Hospital in Hainan [J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2020, 23(3): 247-252.
- [10] NOLAN L M, ALLSOPP L P. Antimicrobial weapons of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2022, 1386: 223-256.
- [11] PÉREZ-VÁZQUEZ M, LÓPEZ-CAUSAPÉ C, CORRAL-LUGO A, et al. Mutation analysis in regulator DNA-binding regions for antimicrobial efflux pumps in 17 000 *Pseudomonas aeruginosa* genomes [J]. Microorganisms, 2023, 11(10): 2486.
- [12] 冯金鑫, 张瑞琴. 3 所综合性医院分离的多重耐药铜绿假单胞菌外排泵 MexAB-OprM 的表达分析 [J]. 西北药学杂志, 2021, 36 (5) : 833-837.
- FENG Jinxin, ZHANG Ruiqin. Expression analysis of MexAB-OprM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* effluent pump isolated from 3 general hospitals [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2021, 36(5): 833-837.
- [13] COSERIU R L, MARE A D, TOMA F, et al. Uncovering the resistance mechanisms in extended-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: insights from gene expression and phenotypic tests[J]. Microorganisms, 2023, 11(9): 2211.
- [14] YOON E J, JEONG S H. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 614058.
- [15] SALMON-ROUSSEAU A, MARTINS C, BLOT M, et al. Comparative review of imipenem/cilastatin versus meropenem[J]. Medecine et Maladies Infectieuses, 2020, 50(4): 316-322.
- [16] WAN Dapeng, JING Xiaopeng, ZHOU Huan, et al. Differences between meropenem and imipenem disk to detect carbapenemase in gram-negative bacilli using simplified carbapenem inactivation method[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 26(6): 636-639.
- [17] 谢国艳, 蔡枫, 梁斌, 等. mCIM 法与 PAE-MHT 法检测铜绿假单胞菌产金属 β -内酰胺酶的性能评价 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35 (1) : 57-59, 64.
- XIE Guoyan, CAI Feng, LIANG Bin, et al. Evaluation of modified carbapenem inactivation method and *Pseudomonas aeruginosa*-Modified Hodge test for detection of metallo-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(1): 57-59, 64.
- [18] DEY D, KAVANAUGH L G, CONN G L. Antibiotic substrate selectivity of *Pseudomonas aeruginosa* MexY and MexB efflux systems is determined by a Goldilocks affinity[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020, 64(8): e00496-20.
- [19] VANSCHOY B, CONDE H, COTRONEO N, et al. 1281. An evaluation of Tebipenem in vitro activity against a panel of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with efflux, AmpC, and OprD mutations[J]. Open Forum Infectious Diseases, 2021, 8(Supplement 1): S728-S730.
- [20] CATTE A, RAMASWAMY V K, VARGIU A V, et al. Common recognition topology of mex transporters of *Pseudomonas aeruginosa* revealed by molecular modelling [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1021916.
- [21] AL RASHED N, JOJI R M, SAEED N K, et al. Detection of overexpression of efflux pump expression in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates[J]. International Journal of Applied & Basic Medical Research, 2020, 10(1): 37-42.
- 收稿日期: 2024-03-28
修回日期: 2024-04-20
- (上接第 6 页)
- for early acute rejection after kidney transplantation[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150826.
- [20] JIA Zhenghu, REN Zhiyao, YE Dongmei, et al. Immune-ageing evaluation of peripheral T and NK lymphocyte subsets in chinese healthy adults[J]. Phenomics (Cham, Switzerland), 2023, 3(4): 360-374.
- [21] TANG Guoxing, YUAN Xu, LUO Ying, et al. Establishing immune scoring model based on combination of the number, function, and phenotype of lymphocytes[J]. Aging, 2020, 12(10): 9328-9343.
- [22] GLEICHER N, BARAD D H. Gender as risk factor for autoimmune diseases[J]. Journal of Autoimmunity, 2007, 28(1): 1-6.
- [23] TAKAHASHI T, IWASAKI A. Sex differences in immune responses[J]. Science (New York, N.Y.), 2021, 371(6527): 347-348.
- 收稿日期: 2023-12-04
修回日期: 2024-05-20