

中药苦参协同增强对替加环素耐药CRKP的体外抑菌作用及机制研究

周桓宇^{1,2}, 伍慧妍^{1,2}, 关艺琳^{1,2} (1.广州医科大学附属第五医院, 广州 510700; 2.广州医科大学金域检验学院, 广州 510180)

摘要: **目的** 探究苦参对替加环素耐药的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的体外抑菌作用, 阐明苦参如何通过外排泵途径恢复CRKP对替加环素的敏感度。**方法** 采用微量肉汤稀释法体外诱导CRKP标准菌株BAA1705对替加环素耐药建立模型, 并通过外排泵抑制剂验证其外排泵表达情况; 微量棋盘稀释法测定两药联用的最低抑菌浓度(MIC)并计算部分抑菌浓度(FIC)指数; 荧光实时定量PCR(qRT-PCR)分析苦参处理前后外排泵基因AcrB的表达量; 罗丹明6G外排试验验证外排泵活性。**结果** 人工造模T-BAA1705外排泵抑制试验结果显示其外排泵过度表达。联合抑菌试验结果计算FIC值为0.375 2, 提示苦参与替加环素联合使用具有协同作用。qRT-PCR结果显示, 苦参单药组AcrB水平低于无药物处理组(0.018 ± 0.002 vs 0.040 ± 0.001), 联合用药组的AcrB水平(0.009 ± 0.001), RamA水平(0.184 ± 0.003)以及MarA水平(0.013 ± 0.001)均低于无药物处理组(0.040 ± 0.001 , 0.387 ± 0.016 , 0.125 ± 0.007), 而AcrR水平高于无药物处理组(0.388 ± 0.001 vs 0.288 ± 0.001), 差异具有统计学意义($t=12.28 \sim 47.12$, 均 $P < 0.05$); 苦参的单药组外排泵活性和联合用药组外排泵活性均低于未经过药物处理的T-BAA1705(60.667 ± 0.448 , 60.267 ± 0.376 vs 65.133 ± 0.296), 差异具有统计学意义($t=8.31$, 10.17 , 均 $P < 0.05$)。 **结论** 苦参能恢复耐替加环素的CRKP对替加环素的敏感性, 同时与替加环素联合使用能有效抑制细菌的生长。其中的机制可能是苦参抑制AcrAB-TolC外排泵的表达。

关键词: 苦参; 替加环素; 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌; AcrAB-TolC外排泵

中图分类号: R285; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2025)06-176-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2025.06.032

Research on the Synergistic Enhancement of the In Vitro Bactericidal Effect of Tigecycline-resistant CRKP by Traditional Chinese Medicine Radix Sophorae Flavescentis and Its Mechanism

ZHOU Huanyu^{1,2}, WU Huiyan^{1,2}, GUAN Yilin^{1,2} (1.the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700, China; 2. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China)

Abstract: Objective To investigate the in vitro antibacterial effect of Radix Sophorae Flavescentis on tigecycline-resistant carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*(CRKP) and elucidate how Radix Sophorae Flavescentis restores the sensitivity of CRKP to tigecycline through the efflux pump pathway. **Methods** The CRKP standard strain BAA1705 was induced to be tigecycline-resistant using the microdilution broth method, and the expression of efflux pumps was verified by efflux pump inhibitors. The fractional inhibitory concentration index (FIC) was calculated using the microdilution checkerboard method to determine the minimum inhibitory concentration(MIC) of the two drugs in combination. Fluorescent real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to analyze the expression of the AcrB gene before and after Radix Sophorae Flavescentis treatment, and the efflux pump activity was validated by the Rhodamine 6G efflux assay. **Results** The efflux pump inhibition experiment on the artificially induced T-BAA1705 strain showed overexpression of efflux pumps. The combined antibacterial test results indicated synergy between Radix Sophorae Flavescentis and tigecycline (FIC=0.375 2). The qRT-PCR results showed that the AcrB levels in the Radix Sophorae Flavescentis monotherapy group were lower than in the untreated group(0.018 ± 0.002 vs 0.040 ± 0.001), and the AcrB levels(0.009 ± 0.001), RamA levels(0.184 ± 0.003) and MarA(0.013 ± 0.001) levels in the combination therapy group were all lower than in the untreated group(0.040 ± 0.001 , 0.387 ± 0.016 , 0.125 ± 0.007), while the AcrR level was higher than in the untreated group(0.388 ± 0.001 vs 0.288 ± 0.001), and the differences were statistical significance ($t=12.28 \sim 47.12$, all $P < 0.05$); the efflux pump activity in the Radix Sophorae Flavescentis monotherapy group and the combination therapy group

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目 (B2021440); 广州市中医药和中西医结合科技项目 (202324011017)。

作者简介: 周桓宇 (2001-), 男, 在读研究生, 研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: 17322833487@163.com。

通讯作者: 关艺琳 (1992-), 女, 本科, 检验技师, 研究方向: 细菌耐药和异质性耐药机制, E-mail: colin.kwan@163.com。

was lower than in the untreated T-BAA1705(60.667 ± 0.448 , 60.267 ± 0.376 , 65.133 ± 0.296), and the differences were statistical significance ($t=8.31, 10.17$, all $P < 0.05$). **Conclusion** Radix Sophorae Flavescentis can restore the sensitivity of tigecycline-resistant CRKP to tigecycline and effectively inhibit bacterial growth when used in combination with tigecycline. The mechanism may involve Radix Sophorae Flavescentis inhibiting the expression of the AcrAB-TolC efflux pump.

Keywords: Radix Sophorae Flavescentis; tigecycline; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; AcrAB-TolC efflux pump

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant-*Klebsiella pneumoniae*, CRKP)是一种常见的医院感染病原菌,它具有广泛的抗药性,包括对目前一线使用的 β -内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类和磺胺类等抗生素均产生抗药性。近年来CRKP在全球范围内的检出率不断上升,尚未得到有效控制^[1-3]。其多耐药性、有效治疗药物少以及高致死率给临床抗感染治疗带来巨大挑战^[4]。《2021年全国细菌耐药检测报告》结果显示,我国CRKP的全国耐药率为11.3%,较2020年上升了0.4%^[2]。目前,我们在治疗CRKP时通常会优先选择替加环素(tigecycline, TGC)^[5-7]。然而,由于TGC的过度使用,对其耐药的CRKP菌株不断被检出^[7-8]。根据中国细菌耐药检测研究2019~2020年革兰氏阴性菌检测报告显示,中国CRKP对TGC的耐药检出率为8.9%,且呈现逐渐增加的趋势^[9]。因此,如何恢复CRKP对TGC的敏感度,已成为一项刻不容缓的任务。近年,细菌AcrAB-TolC外排泵的过度表达与CRKP对TGC耐药的关系已被证实^[10-11]。AcrB作为AcrAB-TolC外排泵转运子,可参与外排泵工作。中药苦参,是国内外中药研究的热门对象之一。有研究报道,其单体成分具有杀菌抑菌甚至可以逆转细菌对抗生素的耐药性^[12],但复合药物苦参的治疗研究相对较少。因此,本研究观察分析了中药苦参单药以及联用TGC对CRKP体外抑菌作用,并测定了AcrAB-TolC外排泵转运子AcrB以及相关表达基因AcrR, RamA, MarA的mRNA基因表达情况,分析苦参对外排泵系统表达情况的影响,旨在为临床CRKP抗感染治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 CRKP标准菌株BAA-1705购自美国模式细胞/菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC),菌种保存于 -80°C 。

1.2 仪器与试剂 超微量核酸蛋白测定仪(上海嘉鹏科技有限公司);基因扩增仪Cobas Z480(瑞士Roche);中药苦参(广州医科大学附属第五医院中药房);TGC,外排泵抑制剂PA β N(上海吉至生化科技有限公司);二甲基亚砜DMSO(北京冬歌博业生物科技有限公司);RNA提取试剂盒;反转录试剂盒及Talent荧光定量检测试剂盒(广州百胜科创生物科技有限公司);AcrB相关基因引物(广州艾基生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 测定最小抑菌浓度(MIC):将保存在 -80°C 冰箱

中的BAA-1705菌株接种于血琼脂平板,于 35°C 恒温培养箱中培养18~20h后从平板中挑取单个菌落,分纯培养。采用微量肉汤稀释法测定TGC对BAA-1705的MIC。TGC浓度设置0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (共11个浓度)。在96孔培养板中,每行最后一孔作为生长对照。根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)的判读标准:MIC ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为耐药, ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为敏感。

1.3.2 体外诱导CRKP替加环素耐药:方法参考文献[13],以 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的TGC为起点,在体外诱导BAA-1705,获得TGC耐药性稳固的BAA-1705菌株(T-BAA1705)。随后,测定TGC对诱导前后细菌的MIC,以及在外排泵抑制剂加入前后细菌的MIC。

1.3.3 外排泵抑制试验:方法参考文献[14],外排泵抑制剂浓度使用 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,通过微量肉汤稀释法测定外排泵抑制剂PA β N加入前后细菌的MIC。外排泵AcrAB-TolC高表达表型阳性菌株的判断标准为:添加泵抑制剂后,TGC的MIC下降为未添加前的 $1/4$ 或更小,则判定为外排泵高表达。

1.3.4 联合药敏试验:购自广州医科大学附属第五医院中药房苦参60g,并煎成药液,最终浓度为 50 mg/ml ,备用。测定苦参对T-BAA1705的MIC。参照文献[15],取96孔板,每孔中加入MH肉汤 100 μl ;第2列从A排到G排起,加入 100 μl 苦参倍数稀释至第11列;从第2列到第12列A排起,每个孔加入 10 μl TGC并倍数稀释至G排。最终苦参水提物浓度为25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05 mg/ml ,共10个梯度浓度;TGC浓度为128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在H排设置以上浓度梯度的苦参单药对照组,第12列设置以上浓度梯度的TGC单药对照组。在第1列A~D孔加入试验菌液作为阳性对照,第1列E~H孔只加入MH肉汤作为阴性对照。取 10 μl 菌液接种于96孔板中,然后培养18~20h;观察并记录苦参单药MIC, TGC单药MIC, 苦参联合用药MIC, TGC联合用药MIC结果。计算部分抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数。计算公式:FIC=MIC_{联合用药}/MIC_{苦参单药}+MIC_{TGC联合用药}/MIC_{TGC单药}。FIC指数判读标准:FIC指数 < 0.5 时,两种药为协同作用;当FIC指数为 $0.5 \sim 1$ 时,两种药为相加作用;当FIC指数大于1且小于2时,两种药为无关作用;当FIC指数 > 2 时,两种药为拮抗作用。

1.3.5 药物处理前后菌株外排泵转运子AcrB相关基

因的mRNA表达量变化:将细菌培养18~20h后,接种于MH肉汤中,培养至生长对数期($A_{600nm}=0.7\sim 0.8$)。接着以T-BAA1705为对照组,苦参单药处理,TGC单药处理以及联合用药处理后的菌株为试验组,荧光实时定量PCR(qRT-PCR)检测外排泵转运子AcrB相关基因表达水平,其中包括AcrB, RamA, MarA, AcrR。操作按试剂盒说明书,用细菌基因组RNA提取试剂盒提取细菌总RNA,合成互补DNA(cDNA)。

表1

引物名称	正向序列	产物长度 (bp)	反向序列	产物长度 (bp)
16sRNA	5'-TGAAGAAGCCTTCGGGTTG-3'	20	5'-TTACTAGCGATTCCGACTT-3'	20
AcrB	5'-CAATACGGAAGAGTTTGGC-3'	18	5'-CAGACGAACCTGGGAACC-3'	20
RamA	5'-GCCGATAAGACGCAATCA-3'	18	5'-CGACGATAGTATCAATCACCT-3'	18
MarA	5'-CCTGTCGCTGGAAAAAGTGT-3'	20	5'-CCTGTCGCTGGAAAAAGTGT-3'	20
AcrR	5'-CCTGGCGAGTTATGAGCGTAT-3'	20	5'-GGTAGCTGCGCATTAAACACG-3'	21

1.3.6 菌株外排活性测定:方法参考文献[16],试验菌株经离心、预冷,重悬于磷酸盐缓冲液(PBS)使葡萄糖耗尽,然后PBS洗涤3次;菌株细胞重悬于罗丹明6G/PBS溶液(罗丹明6G的最终浓度为0.5 μ mol/L),37 $^{\circ}$ C振荡孵育30min, PBS洗涤3次,除去细胞外的罗丹明6G;洗涤后的菌液细胞重悬于含1g/dl葡萄糖的PBS中,37 $^{\circ}$ C振荡孵育15min,立即置于冰浴中;离心沉淀菌株细胞,收集1.8 μ l上清液,使用荧光分光光度计测定其荧光强度(激发波长为529nm,发射波长为553nm),以含1g/dl葡萄糖的PBS溶液作为空白对照。为了标准化样本的罗丹明6G外排活性,弃去余下的上清液,将细胞重悬于2 μ l预冷的PBS中,并测定其 A_{600nm} 。计算公式为:罗丹明6G外排活性ES=(样本的荧光强度-空白管的荧光强度)/ A_{600nm} 。

1.4 统计学分析 使用SPSS24.0软件进行统计学分析。对于连续变量且满足正态分布数据使用均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用两独立样本t检验比较两组间差异,采用单因素方差分析比较多组间差异。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGC对CRKP标准菌株BAA1705的单药诱导 对CRKP标准菌株BAA1705进行了TGC单药

表2 苦参单药组、TGC处理组、联合用药组和无药处理组AcrB, AcrR, MarA, RamA水平比较($\bar{x}\pm s$)

基因	无药物处理组 (n=3)	苦参单药组 (n=3)	TGC处理组 (n=3)	联合用药组 (n=3)
AcrB	0.040 \pm 0.001	0.018 \pm 0.002	0.064 \pm 0.003	0.009 \pm 0.001
AcrR	0.288 \pm 0.001	0.293 \pm 0.001	0.016 \pm 0.004	0.388 \pm 0.001
MarA	0.125 \pm 0.007	0.016 \pm 0.001	0.021 \pm 0.002	0.013 \pm 0.001
RamA	0.387 \pm 0.016	0.505 \pm 0.004	0.505 \pm 0.007	0.184 \pm 0.003

2.4 罗丹明6G的外排情况 苦参的单药组外排泵活性(60.667 \pm 0.448)和联合用药组外排泵活性(60.267 \pm 0.376)均低于未经过药物处理的T-BAA1705(65.133 \pm 0.296),差异具有统计学意义($t=8.31, 10.17$, 均 $P<0.05$)。

qRT-PCR反应在罗氏Cobas Z480实时PCR扩增仪上进行测量,采用的Real SYBR Mix由广州百胜科创生物科技有限公司生产。qRT-PCR所用引物序列见表1。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性3min,循环数为1;95 $^{\circ}$ C变性5s,60 $^{\circ}$ C退火10s,循环数为40;最后75 $^{\circ}$ C延伸15s。使用16sRNA作为内参基因,以分析AcrB, MarA, RamA和AcrR基因的相对表达丰度。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

引物序列表

诱导处理,经过4周后, MIC值上升至8 μ g/ml,达到耐药标准($\geq 8\mu$ g/ml)。使用外排泵抑制剂PA β N后,诱导菌株的替加环素MIC均从8 μ g/ml下降至2 μ g/ml,替加环素恢复敏感。

2.2 联合抑菌试验 通过微量肉汤二倍稀释法测得苦参对T-BAA1705的MIC > 25 mg/ml, TGC对T-BAA1705的MIC为8 μ g/ml。苦参与TGC联合作用下, T-BAA1705对TGC的MIC下降为原来的1/4,恢复至敏感(2 μ g/ml), FIC值=0.375 $2 < 0.5$,具有协同作用。

2.3 药物处理前后AcrB, AcrR, MarA, RamA的mRNA表达量变化 见表2。qRT-PCR结果显示,苦参单药组与无药物处理组相比较, AcrB水平下调($t=17.04$);联合用药组与无药物处理组相比较, AcrB水平下调幅度更大($t=37.97$)。但TGC处理组与无药物处理组相比较, AcrB水平上调($t=14.70$),差异具有统计学意义(均 $P<0.001$)。另外,联合用药组与无药物处理组相比较, RamA以及MarA水平均明显下调($t=12.28, 16.11$),而AcrR水平明显上调($t=47.12$);联合用药组与TGC处理组比较, RamA水平下调($t=76.05$),而AcrR水平上调($t=152.6$),差异具有统计学意义(均 $P<0.001$)。

3 讨论

中药与抗生素联用不仅能做到杀菌抑菌,甚至可以逆转细菌对抗生素的耐药性,此外中药也具有许多优势,包括成本低廉、获取途径广泛、对人体几

乎没有毒副作用等等^[17]。中药苦参是豆科槐属植物,苦参的干燥根具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗过敏等多种药理活性作用^[18]。不仅如此,其单体成分多种多样,主要分为生物碱类和黄酮类化合物。根据文献调查,发现苦参生物碱中的苦参碱、氧化苦参碱以及槐黄烷酮G在抗菌作用方面进行了系统比较研究。研究包括体外实验测定MIC/最小杀菌浓度(minimal bacteriocidal concentration, MBC)值,以及与氨苄西林、庆大霉素、阿米卡星等抗生素的联合作用效果评价^[12],而关于其他异戊烯基黄酮类成分如苦参啶、苦参醇、苦参黄酮的抗菌作用机制评价报道相对较少,后续可以深入研究苦参单体的作用。

本研究发现苦参与TGC联合使用后对耐替加环素CRKP有着显著的抗菌作用,具有协同效果,还可以恢复CRKP对TGC的敏感度。基于临床感染治疗对替加环素耐药用药需要的增加以及药物使用频次的上升,临床CRKP抗感染治疗方案的选择压力日渐增加,以上结果提示苦参与TGC的联合使用,能为临床TGC使用延长寿命,为治疗方案选择提供更多可能性。

TGC作为临床CRKP抗感染治疗常用药物,其耐药问题应该得到重视。然而CRKP对TGC的耐药机制复杂,最常见的是非特异性RND型外排泵的过度表达,其中AcrAB-TolC外排泵系统起着主导作用^[10-11]。本研究中,使用CRKP标准菌株BAA-1705并人工诱导TGC耐药,建立标准型的耐药模型,后经外排泵抑制剂处理,经诱导耐药的BAA-1705恢复对TGC敏感度,再次证实AcrAB-TolC外排泵的过度表达与CRKP耐TGC的关联作用。

AcrAB-TolC系统是细菌耐药的关键机制之一,包括TolC, AcrB和AcrA三种蛋白。AcrB作为核心泵蛋白,负责将药物排出细胞外^[19]。如果AcrB的外排机制受到刺激,将会增强外排泵作用,主动将细菌体内药物不断泵出体外。从而导致细菌多药耐药表型的产生^[19-21]。T-BAA1705是由TGC诱导耐药所产生,本研究发现在继续保持高浓度TGC单药作用下,AcrB表达水平与无药物作用下有差异性增高。TGC对CRKP的选择性压力,可能是通过TGC不断使用,驱动AcrB上调,从而增加AcrAB-TolC外排泵活动的结果。说明AcrB是CRKP对TGC耐药的一个关键靶点。此外有研究表明,下调AcrB表达可以恢复鼠伤寒沙门菌对盐酸四环素、多西环素、加替沙星和恩诺沙星的敏感度^[22]。本研究中经过苦参处理后得到相似的效果,即AcrB水平下调,T-BAA1705对TGC的敏感度增加。而且本研究中发现苦参单药和其与TGC联合作用能够下调AcrB基因表达,提示着中药苦参有着独立调控AcrB的潜力,我们将可以通过对AcrB水平的调控来恢复细菌对抗生素的敏感度。另

外有研究表明,AcrB的表达受到MarA, RamA等正向调控因子以及AcrR负向调控因子的影响^[21]。本研究中单药组除了AcrB水平下调以外,AcrB调控因子MarA水平也出现了下调以及AcrR水平上调,而联合用药组基因表达情况在单药组的基础上还出现了RamA水平的下调,并且AcrR水平上调幅度更大,表明苦参和TGC的联合处理具有协同作用,能进一步抑制AcrB的表达。同时本研究通过罗丹明6G实验更进一步验证外排泵活性是否受到苦参的影响,发现苦参处理后外排泵活性明显下降。

综上所述,本研究发现苦参与TGC联用对耐TGC-CRKP表现出协同作用,提高了抗生素的抗菌作用。进一步研究发现苦参能下调AcrB, MarA的基因表达,抑制外排泵AcrAB-TolC系统的表达。为后续研究中药逆转多重耐药菌对抗生素耐药性的分子机制以及给临床CRKP感染治疗方案选择提供更多的理论基础。然而,本研究涉及的分子机制尚不深入,苦参与AcrB相关基因结合靶点位置,以及苦参对如何调控AcrB, MarA的深层分子机制等问题,均需要进行更深入的研究与探讨。

参考文献:

- [1] WANG N, ZHAN M H, LIU J H, et al. Prevalence of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in a northern province in China: clinical characteristics, drug resistance, and geographic distribution[J]. Infection and Drug Resistance, 2022, 15: 569-579.
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2021年CHINET中国细菌耐药监测[J].中国感染与化疗杂志,2022,22(5):521-530.
HU F P, GUO Y, ZHU D M, et al. CHINET surveillance of antimicrobial resistance among the bacterial isolates in 2021[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2022, 22(5): 521-530.
- [3] 李阳昱,杨旭,陈孝红,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制和治疗策略研究进展[J].现代检验医学杂志,2023,38(6):191-199.
LI Y Y, YANG X, CHEN X H, et al. Research progress on resistance mechanisms and therapy strategies of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(6): 191-199.
- [4] 张甜甜,刘志武,黄喜凤,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染临床特征及危险因素分析[J].中国抗生素杂志,2024,49(2):208-214.
ZHANG T T, LIU Z W, HUANG X F, et al. Analysis of clinical characteristics and risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2024, 49(2): 208-214.
- [5] 王辉,俞云松,王明贵,等.替加环素体外药敏试验操作规程专家共识[J].中华检验医学杂志,2013,36(7): 584-587.
WANG H, YU Y S, WANG M G, et al. Expert consensus on the operating procedures for in vitro drug susceptibility testing of tigecycline[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2013, 36(7): 584-587.
- [6] 朱瑞奇,吴韩,曾杨梅,等.肠杆菌科细菌替加环素耐药机制的研究进展[J].江西畜牧兽医杂志,2020(5):7-12.

- ZHU R Q, WU H, ZENG Y M, et al. Research progress on the mechanism of tigeicycline resistance in *Enterobacteriaceae bacteria*[J]. Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020(5): 7-12.
- [7] YAGHOUBI S, ZEKIY A O, KRUTOVA M, et al. Tigeicycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2022, 41(7): 1003-1022.
- [8] PARK Y, CHOI Q, KWON G C, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of tigeicycline resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2020, 34(12): e23506.
- [9] 李耘, 郑波, 吕媛, 等. 中国细菌耐药监测(CARST)研究2019-2020革兰氏阴性菌监测报告[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(5): 432-452.
- LI Y, ZHENG B, LÜ Y, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms: results from China antimicrobial resistance surveillance trial(CARST) program, 2019-2020[J]. the Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2022, 38(5): 432-452.
- [10] CHIRABHUNDHU N, LUK-IN S, PHUADRAKSA T, et al. Occurrence and mechanisms of tigeicycline resistance in carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Thailand[J]. Scientific Reports. 2024, 14(1): 5215.
- [11] YOON E J, OH Y, JEONG S H. Development of tigeicycline resistance in Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 147 via AcrAB overproduction mediated by replacement of the ramA promoter[J]. Annals of Laboratory Medicine, 2020, 40(1): 15-20.
- [12] 李凡, 杨远贵, 谷丽华, 等. 苦参的化学成分及生物活性研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(10): 84-100.
- LI F, YANG Y G, GU L H, et al. Advances in chemical constituents and bioactivities of Sophorae Flavescens Radix[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 55(10): 84-100.
- [13] 刘婉莹. 肺炎克雷伯菌感染因素的研究及其临床应用方案的推荐[D]. 江西宜春: 宜春学院, 2021.
- LIU W Y. Study on infection factors of *Klebsiella Pneumoniae* and recommendation of clinical medication scheme[D]. Jiangxi Yichun: Yichun University, 2021.
- [14] 王志盛. 黄连素对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌外排泵 MexAB-OprM的作用研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2020.
- WANG Z S. The effect of berberine on the efflux pump mexab-oprm of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2020.
- [15] 甘露, 李耘, 桥本重阳, 等. 大肠埃希菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(18): 2896-2900.
- GAN L, LI Y, HASHIMOTO S, et al. Resistance mechanism of *Escherichia coli* to carbapenems[J]. the Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2020, 36(18): 2896-2900.
- [16] 封小川. 延安地区白色念珠菌流行病学及其对氟康唑耐药机制的研究[D]. 陕西延安: 延安大学, 2022.
- FENG X C. Epidemiology of *Candida Albicans* and its resistance to fluconazole in Yan'an area[D]. Shannxi Yan'an: Yan'an University, 2022.
- [17] 唐金蓉, 张碟, 李盛. 四种中药单体联合亚胺培南对耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌体外抑菌作用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(6): 162-165, 197.
- TANG J R, ZHANG D, LI S. Antibacterial activity of four traditional Chinese medicine monomers combined with imipenem against carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* in vitro[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(6): 162-165, 197.
- [18] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典(2015年版): 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 211.
- National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015 edition): Part I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 211.
- [19] ALENAZY R. Drug efflux pump inhibitors: a promising approach to counter multidrug resistance in Gram-negative pathogens by targeting AcrB protein from AcrAB-TolC multidrug efflux pump from *escherichia coli*[J]. Biology, 2022, 11(9): 1328.
- [20] JANG S. AcrAB-TolC, a major efflux pump in Gram negative bacteria: toward understanding its operation mechanism[J]. BMB Reports, 2023, 56(6): 326-334.
- [21] KOBYLKA J, KUTH M S, MÜLLER R T, et al. AcrB: a mean, keen, drug efflux machine[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2020, 1459(1): 38-68.
- [22] 李小军, 李胜利, 樊帅奇, 等. AcrR突变介导鼠伤寒沙门菌耐药的调控[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(10): 44-52.
- LI X J, LI S L, FAN S Q, et al. Drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium regulated by mutated AcrR[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(10): 44-52.
- 收稿日期: 2024-09-02
修回日期: 2024-12-01
- (上接第158页)
- [19] WASNIK M, LAHARE S, CHANDRAKAR R, et al. A study of A₁ and A₂ subtypes among whole-blood donors with blood groups A and AB at the blood center of a tertiary care institute in chhattisgarh[J]. Cureus, 2024, 16(3): e57013.
- [20] SABOOR M, ZEHR A, HAMALI H A, et al. Prevalence of A₂ and A₂B subgroups and anti-A₁ antibody in blood donors in jazan, Saudi Arabia[J]. International Journal of General Medicine, 2020, 13: 787-790.
- [21] KHANUM A, FARHAN S, SAQLAIN N, et al. Prevalence of A₂ and A₂B subgroups among blood groups a and AB in healthy donors[J]. Pakistan Journal of Medical Sciences, 2024, 40(1Part/I): 156-158.
- [22] 雷航, 王学锋, 程晓文, 等. ABO血型变异的分子基础研究[J]. 中国输血杂志, 2024, 37(4): 385-391.
- LEI H, WANG X F, CHENG X W, et al. Molecular mechanism of ABO blood group variation[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2024, 37(4): 385-391.
- [23] YING Y L, HONG X Z, XU X G, et al. Serological characteristic and molecular basis of A₂ subgroup in the Chinese population[J]. Transfusion and Apheresis Science, 2013, 48(1): 67-74.
- [24] 佚名. PROCLIN系列防腐剂[J]. 生命科学仪器, 2004, 2(1): 23-24.
- Anonymous. PROCLIN Series Preservatives[J]. Life Science Instruments, 2004, 2(1): 23-24.
- 收稿日期: 2025-03-11
修回日期: 2025-04-25