



绿脓杆菌对鲎素耐受性特点及耐受性机制的研究

洪军^{#*}, 胡建业[#], 刘坤, 王超华, 周春云, 闫坤敏, 高双双

河南城建学院生命科学与工程学院, 河南 平顶山 467036

摘要:【目的】为了探讨鲎素作为抗菌药物在临床使用中的安全性问题,通过鲎素连续增高浓度法对绿脓杆菌进行耐受性诱导,并对其耐受性机制进行初步研究,以期鲎素的广泛应用提供理论依据。【方法】绿脓杆菌 ATCC27853 为试验菌株,通过连续增高浓度诱导法筛选抗药菌株,并通过抗药稳定性、交叉抗药性、抗药性代偿测定来探究其耐受性特点,通过对其胞外蛋白酶活性、生物膜形成、胞外多糖含量的变化来探讨其抗药性机制。【结果】通过连续增高鲎素浓度法对原始菌株进行 30 多代诱导后,绿脓杆菌 ATCC27853 对鲎素的 MIC 值逐渐增高,80 多代时产生了明显抗药性。抗药菌株对丁胺卡那以及 pexiganan、鲎素同源肽 tachypleisin III、polyphemusin I 均能产生不同程度的抗药性。在无药培养基中抗药菌株以更长的延滞期作为抗药性代偿,但在有药培养基中具有更短的延滞期和更大的生长速率。抗药菌株较原始菌株分泌的胞外蛋白酶活性增高,并能降低鲎素的抗菌活性。在同样条件下抗药菌株较原始菌株胞外多糖含量增高,更易形成生物膜。【结论】在长期选择压力下绿脓杆菌 ATCC27853 对鲎素能产生抗药性,其抗药性机制可能与生物膜形成、胞外蛋白酶失活鲎素有关。关于细菌对鲎素的抗药性机制,有待进一步研究。

关键词: 鲎素, 绿脓杆菌 ATCC27853, 耐受性, 胞外蛋白酶, 生物膜形成

致病菌的抗生素抗药性问题日益严重以及抗药性超强的“超级细菌”的出现,引起了全世界医疗工作者的极大关注。作为有望替代抗生素的候选抗菌药物之一的抗菌肽,有研究报道表明一些细菌(尤其人类病原体)已对部分抗菌肽产生了抗

药性^[1-4],细菌一旦对抗菌肽产生抗药性,将极大地缩短和限制抗菌肽的使用,因此了解细菌对抗菌肽产生抗药性的潜在机制为设计更有效的药物和减少细菌抗药性的发生具有重要意义。

鲎素(tachypleisin I)是 1988 年由 Nakamura 等

基金项目: 国家自然科学基金(31540060); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A180001); 河南城建学院科研能力提升工程(2016QY016)

[#]共同第一作者。

*通信作者。E-mail: hongjun@hncj.edu.cn

收稿日期: 2017-11-06; 修回日期: 2017-12-26; 网络出版日期: 2018-01-18

从中国鲎血细胞的酸性提取物中分离出来的一种具有典型环状 β -折叠结构的抗菌肽。自从鲎素被发现以来,国内外学者从结构、抗菌活性、作用机制、基因工程表达量以及应用等方面进行了研究,结果表明鲎素可以开发成抗感染、抗肿瘤、抗病毒药物以及饲料添加剂等^[5-8]。伴随着基因工程鲎素工业化生产^[9-10],鲎素已能够广泛应用于医药行业、畜牧业、食品工业和转基因育种等领域。

鲎素具有广谱抗菌活性,随着鲎素作为抗菌药物的大量使用,关于细菌对鲎素抗药性及其机制研究报道较少。作者在前期通过鲎素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行间断性和短期连续性增高药物浓度(≤ 20 代)的诱导对其未产生抗药性^[11],但在实验室条件下通过长期连续增高鲎素浓度法诱导(超过 69 代,部分超过 80 代)后,大肠杆菌 ATCC25922、F41、嗜水气单胞菌 XS91-4-1 和绿脓杆菌 CGMCC1.260 菌株均对鲎素能产生抗药性,但是不同菌株之间对鲎素产生抗药性的快慢不同。通过紫外诱变处理绿脓杆菌 CGMCC1.260 也对其产生了抗药性^[12]。也有报道表明金黄色葡萄球菌存在着感应抗菌肽的三元感应系统,此系统控制着革兰氏阳性菌抗抗菌肽基因(Dlt 和 MprF),此系统也能被鲎素等抗菌肽激活^[13]。虽然尚未发现鲎素在应用中有抗药性出现,但为了防止重蹈与抗生素一样的覆辙,避免和延缓细菌对其抗药性的产生,了解细菌在长期鲎素选择压力下能否对其产生抗药性及抗药性的机制势在必行。

尽管前期通过鲎素对一些细菌包括绿脓杆菌 CGMCC1.260 进行了抗药性诱导,并产生了抗药性,但是不同来源的绿脓杆菌菌株之间存在一定的差异。本研究选择了药物敏感性测定的质控菌

株绿脓杆菌 ATCC27853 作为研究对象,通过鲎素连续增高浓度法对其进行抗药性诱导,观察能否对其产生抗药性;然后通过抗药稳定性和交叉抗药性试验来探讨其抗药性特点;以及通过胞外分泌物和生物膜形成等探讨绿脓杆菌 ATCC27853 对鲎素抵抗的作用机制。通过本研究能为鲎素的大规模临床应用提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试菌株:绿脓杆菌 ATCC27853 由河南城建学院生命科学与工程学院实验室保存。

抗菌肽:鲎素(tachyplesin I, 含有 2 个二硫键的环行肽)、鲎素 III (tachyplesin III, 线性肽)、polyphemusin I (线性肽)和 pexiganan (培加南)均由吉尔生化(上海)有限公司合成,纯度为 95%以上。抗菌药物药敏纸片由杭州微生物试剂有限公司提供。

1.2 最小抑菌浓度(MIC)测定

MIC 测定采用临床和实验室标准协会(CLSI)的微量肉汤稀释法进行。MIC 测定以肉眼观察不到细菌生长为最低的药物浓度。在无菌的 96 孔细胞培养板中制备好菌液与抗菌肽的混合物后,在 37 °C 恒温摇床上 90 r/min 培养 20 h 后观察结果,每个样品 3 个重复。

1.3 抗鲎素菌株的筛选及判断折点

选取绿脓杆菌 ATCC27853,对其活化后进行 MIC 测定。然后菌液在含有 1/2 MIC 鲎素浓度的培养基中进行连续传代,每次转接培养 20 h,同一药物连续进行 N 次转接传代后,测定其 MIC 值,根据 MIC 值确定随后转接的药物浓度,直到获得

抗药菌株为止。与此同时,在相同条件下每代设不加鲎素培养基连续传代菌株作为对照选择菌株,把添加鲎素诱导的菌株作为阳性选择菌株,每个试验设2组平行。在诱导过程中,每隔3代对诱导菌株进行生理生化鉴定以及根据已报道的绿脓杆菌外毒素A基因序列设计的绿脓杆菌特异性的PCR扩增引物(上游:5'-GACACGCCCTCAGCATCATC-3',下游:5'-CGCTGGCCATACGCTCGAGC-3')进行菌落PCR对其进行鉴定,并观察其是否污染,如无污染对其诱导菌株以15%甘油-80℃进行保存。在本研究中,如果诱导菌株与相应对照组菌株的MIC值相比提高3倍或3倍以上,则判断为诱导出抗药性,否则表明在此实验条件下鲎素不能诱导细菌产生抗药性。

1.4 耐药稳定性测定

将获得的抗鲎素抗药菌株,在不含鲎素的MH肉汤培养基中按1:100比例继续传代,每20h转接1次,连续转接15次后,将每次转接形成的各子代菌株以15%甘油-80℃保存,分别测定其MIC值,以观察其抗药表型的稳定性。

1.5 交叉抗药性的试验

1.5.1 抗菌药物的药敏试验:药敏试验方案参照CLSI推荐的体外药敏试验方法进行,并根据CLSI所公布的最新判断标准进行结果判断。药敏试验按照K-B纸片扩散法进行测定。简单方案如下:首先把待测菌株按照1:100的接种量对其进行过夜培养,随后将菌液浓度调至 10^7 个/mL后,取100μL菌液对其进行涂布,涂布后在平板上均匀添加含有药物的纸片,每种菌做3个平行对照。

1.5.2 抗菌肽对抗药菌株的MIC测定:选取人工合成的抗菌肽pexiganan、鲎素III和polyphemusin,通过对绿脓杆菌抗药菌株和对照菌株进行MIC测

定,观察这些抗药菌株对鲎素和其他抗菌肽是否存在交叉抗药性,判断标准参考1.3。

1.6 抗药性代偿

为了评估抗药菌株的生长特性,我们测定了抗药菌株与对照菌株在不加鲎素的MHB和包含5μg/mL或2.5μg/mL鲎素培养基中每隔1h在600nm下连续40h测量其吸光值,计算出最大吸光值 K 、最大生长速率 V_{max} 和延迟期 $lag^{[3]}$ 。

1.7 胞外蛋白酶测定

胞外酶样品制备:分别取培养12、18、24h的发酵液10mL,在4℃下4000r/min离心2次,每次10min,收集上清液,然后用考马斯亮蓝G-250染色法调整蛋白质浓度一致后,用无菌的0.22μm孔径的过滤器将上清液过滤除菌,分装后-20℃保存备用。

细菌胞外蛋白酶活性测定根据前人报道的1%脱脂牛奶平板法略作修改后进行。将调整蛋白浓度一致后的胞外酶样品60μL加入供试脱脂牛奶平板孔中,在37℃培养20-24h,观察并测定透明圈大小,其中透明圈直径包含0.3cm的孔径。

1.8 胞外蛋白酶聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

1.8.1 酶活性的测定:根据前人报道的方法略作修改后进行^[14]。取适量蛋白酶样品20μL、标准蛋白10μL加在浓缩胶的孔里,加入适量的SDS电泳缓冲液,80V电压,直到溴酚蓝到分离胶前沿时,调成120V电压直至电泳结束,整个电泳过程在4℃条件下进行,大约2-3h。12% SDS-PAGE分离胶包含0.3mg/mL的终浓度脱质奶粉。电泳后,将胶放在50mmol/L Tris-HCl (pH 7.8)+2.5% TritonX-100 (V/V)中洗2次,每次30min,用来除

去 SDS, 以备胞外蛋白酶复性; 然后, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 洗 2 次, 每次 20 min。洗涤完成后, 将胶放在包含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 0.15 mol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 0.1% TritonX-100 (V/V) 的孵育溶液中, 放置于 37 °C 恒温培养箱静止孵育过夜。将过夜孵育的分离胶, 用含 0.2% 考马斯亮蓝 R-250 染色液在 10% 的醋酸中室温染色 50 min, 然后用 10% 醋酸进行脱色, 洗脱至清晰的条带在黑暗的背景下观察到即可。

1.8.2 12% SDS-PAGE 分析: 分离胶制备时不添加脱质奶粉, 跑胶后直接染色和脱色。

1.9 绿脓杆菌发酵上清液对鲨素抗菌活性的影响

以不同菌株发酵上清液与鲨素按 1:1 的比例混合后加入 96 孔板, 在 37 °C 生化恒温培养箱共温育 5 h, 作为实验组。在同样条件下, 以空白培养基与鲨素混合, 使其终浓度一致作为对照组。上清过滤液的制备方法与前面一致。温育 5 h 后, 以 2×10^5 个/mL 的绿脓杆菌 ATCC27853 为指示菌, 37 °C 培养 20–22 h, 用酶标仪在 490 nm 处测定吸光值并肉眼观察 MIC 值。以菌液和鲨素为加药处理、空白培养基与菌液为阳性对照、空白培养基为空白对照, 通过公式(1)测定抑制率。

$$P = (OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{加药处理}}) / (OD_{\text{阳性对照}} - OD_{\text{空白对照}}) \% \quad \text{公式(1)}$$

1.10 生物膜形成测定

为了观察原始菌株和抗药菌株在自然条件下形成生物膜的能力, 通过结晶紫染色法定性测定原始菌株和抗药菌株生物膜预形成能力以及加药处理对生物膜预形成的影响。绿脓杆菌原始菌株和抗药菌株过夜培养 12 h, 稀释至 10^5 个/mL 后分别加入 96 孔板, 然后加入鲨素使其终浓度为 2.5 μg/mL (1/2 MIC) 或 5 μg/mL (MIC), 每组做 3

个平行对照, 对照组不加药物。37 °C 静止培养 36 h 后, 缓慢吸出孔中菌液, 用 PBS 清洗 3 次, 风干, 依次每孔加入 200 μL 99% 甲醇, 固定 15 min, 吸出甲醇, 风干; 加入 200 μL 1% 结晶紫染色 5 min, 用自来水冲洗, 风干。最后加入 160 μL 的 33% 冰醋酸溶解结晶紫, 在 570 nm 测量 OD 值^[15]。

1.11 胞外多糖的测定

由于细菌生物膜中含有胞外多糖, 我们使用苯酚硫酸法定量测定生物膜中主要成分胞外多糖含量来进一步探讨鲨素对绿脓杆菌生物膜的影响^[16]。

绘制葡萄糖溶液的标准曲线: 以葡萄糖浓度 (mg/mL) 为横坐标, 以 OD 值作为纵坐标绘制标准曲线。

绿脓杆菌胞外多糖的提取: 将活化好的菌株稀释到 2×10^5 个/mL, 然后按照菌液与培养液 1:100 的比例接种到 2 mL 培养基中, 37 °C 在恒温水平摇床上过夜培养, 次日按照 4% 的比例转接于 5 mL 的 MH(B) 培养基中培养 8 h。将培养好的菌液 4500 r/min 离心 8 min 后洗涤, 然后再重复一次离心, 将细菌沉淀在 2 mL 的蒸馏水中重新溶解, 用细胞超声破碎仪破碎菌体以 7000 r/min 再次离心; 将上清液逐滴加入冷乙醇放在 4 °C 冰箱里沉淀过夜, 次日离心得到絮状沉淀(含多糖), 用灭菌的蒸馏水重新溶解多糖沉淀。

苯酚硫酸法测定胞外多糖: 根据葡萄糖溶液的标准曲线方法测定菌液中胞外多糖的含量。

2 结果和分析

2.1 抗鲨素菌株的筛选

在传代过程中, 定期对诱导的菌株进行生理

生化鉴定, 且根据设计的特定引物进行诱导菌株菌落 PCR 鉴定(图 1), 在 400 bp 处是绿脓杆菌特异性条带, 表明诱导的抗药菌株无污染, 正确, 随后进行后续试验。

通过连续增高鲎素浓度诱导法对绿脓杆菌 ATCC27853 进行传代 30 代后, 绿脓杆菌 ATCC27853 对鲎素的 MIC 逐渐开始增高, 直至 80 代后产生稳定的抗药菌株(表 1)。通过此结果表明, 经过长期连续药物压力选择后, 绿脓杆菌 ATCC27853 在体外也能对鲎素进化出抗药性。

2.2 抗药稳定性测定

对连续药物诱导获得的绿脓杆菌 ATCC27853-88-2 抗药菌株, 在无药 MH 肉汤培养基中连续传代 10 次后对鲎素的 MIC 值无明显变化, 此结果表明抗鲎素绿脓杆菌 ATCC27853-88-2 抗药性较稳定; 但超过 10 次传代之后, MIC 值有降低的趋势。

2.3 交叉抗药性实验

2.3.1 抗菌药物的药敏实验: 从表 2 可以看出, 与原始菌株相比, 丁胺卡那对绿脓杆菌 ATCC27853 鲎素抗性菌株具有抗药性, 即鲎素和丁胺卡那之间存在交叉抗药性, 与氧氟沙星、头孢哌酮和多粘菌素 B 之间均无交叉抗药性。

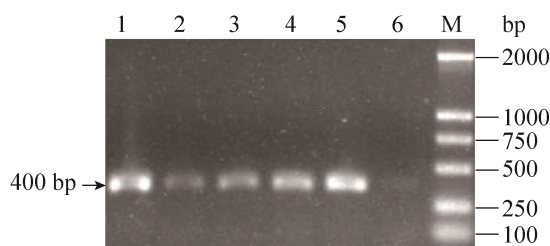


图 1. 绿脓杆菌 ATCC27853 诱导前后的菌落 PCR 图
Figure 1. Colony PCR of *P. aeruginosa* ATCC27853 before and after induction. M: DL 2000 DNA marker; 1: *P. aeruginosa* original strain; 2,3: *P. aeruginosa* 82-1; 4,5: *P. aeruginosa* 88-2; 6: Control group (sterile water).

表 1. 鲎素对绿脓杆菌诱导前后 MIC 值比较

Table 1. MIC comparison of tachyplesin-I for strains ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Strains	Trial treatment	Generations	MIC range of tachyplesin I/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	Tachyplesin I concentration during induction/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	Original strain	0	5	0
	Trial induction group1	31-1	20-30	10
		42-1	20	15
		60-1	20	20
		77-1	30-40	25
		82-1	40	30
	Trial induction group2	31-2	20-30	10
		41-2	20	15
		71-2	40	20
	Control group	88-2	>80	30
		33	10	0
		43	10	0
		59	10	0
	88	15	0	

The resistant strain naming was based on the strain name and the transfer generation, for example 88 serial transfers *P. aeruginosa* ATCC27853 resistant strains was named for *P. aeruginosa* ATCC27853-88-2 resistant strain, which strain was as the following trial strain.

表 2. 绿脓杆菌诱导前后对几种抗菌药物的药敏测定

Table 2. Antimicrobial susceptibility determination of *P. aeruginosa* before and after induction

Antimicrobial agents	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853-88-2 resistant strain		<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 original strain	
	Inhibitory zone diameter/mm	Judgement result	Inhibitory zone diameter/mm	Judgement result
Cefoperazone	28.5±0.5	Susceptible	28.2±0.2	Susceptible
Polymyxin B	16.0±0.3	Susceptible	12.8±0.2	Susceptible
Ofloxacin	29.25±1.20	Susceptible	31.1±0.6	Susceptible
Amikacin	12.75±0.60	Resistant	23.2±0.2	Susceptible

2.3.2 抗菌肽对抗药菌株的 MIC 测定

由表 3 可知, 这 4 种化学合成抗菌肽对绿脓杆菌 ATCC27853 原始菌株的敏感性差别较大, 与鲎素的 MIC 值相比, 它的同源线性肽 tachyplesin III 和 polyphemusin I 对绿脓杆菌的敏感性较低。与原始菌株相比, 绿脓杆菌 ATCC27853-88-2 鲎素抗药菌株对 pexiganan、tachyplesin III 和 polyphemusin I 的敏感性均明显降低, 尤其是对 pexiganan 抗菌肽。此结果表明, 鲎素与 pexiganan、tachyplesin III 和 polyphemusin I 之间存在不同程度的交叉抗药性。

2.4 抗药性代偿

为了探讨绿脓杆菌 ATCC27853 对鲎素抗药

性的获得是否以影响生长为代偿, 我们对其进行生长情况的测定。从表 4 中可以看出, 绿脓杆菌 ATCC27853 抗药菌株在无药培养基中的生长情况较原始菌株的延滞期长, 但最大生长速率较原始菌株大; 而在含鲎素的培养基中, 抗药菌株的生长要明显优于对照菌株。此结果表明绿脓杆菌 ATCC27853-88 鲎素抗药菌株在无药环境下是以延长延滞期为生长代价的。但在有药情况下, 抗药菌株的生长速率明显增高和延滞期明显缩短, 说明绿脓杆菌 ATCC27853 抗药菌株能适应一定鲎素浓度的环境。

2.5 绿脓杆菌抗药前后胞外蛋白酶活性变化

由图 2 可知, 绿脓杆菌 ATCC2785388-2 抗鲎

表 3. Pexiganan 等抗菌肽对绿脓菌株 ATCC27853 诱导前后 MIC 比较

Table 3. MICs of other antibacterial peptides for induction strains ($\mu\text{g/mL}$)

Strains	MIC			
	Tachyplesin I	Pexiganan	Tachyplesin III	Polyphemusin I
<i>P. aeruginosa</i> original strain	5	15	50	45
<i>P. aeruginosa</i> -88-2 resistant strain	100	120	> 165	> 165

表 4. 绿脓杆菌抗药菌株和对照菌株在有无鲎素培养基中的生长测定

Table 4. Growth of control and resistant strains in unsupplemented or containing tachyplesin I medium

Growth parameter	MH(B) medium		2.5 $\mu\text{g/mL}$ tachyplesin I		5.0 $\mu\text{g/mL}$ tachyplesin I	
	<i>P. aeruginosa</i> -88-2 resistant strain	<i>P. aeruginosa</i> control strain	<i>P. aeruginosa</i> -88-2 resistant strain	<i>P. aeruginosa</i> control strain	<i>P. aeruginosa</i> -88-2 resistant strain	<i>P. aeruginosa</i> control strain
K	1.3925	1.4755	1.4065	1.1760	1.3380	0.1140
V_{max}	0.4775	0.2270	0.4470	0.4520	0.3600	0.0350
lag(h)	13	6	13	22	14	37

K : maximum absorbance; V_{max} : Maximum rate of increase in absorbance (h^{-1}); lag: lag phase (h).

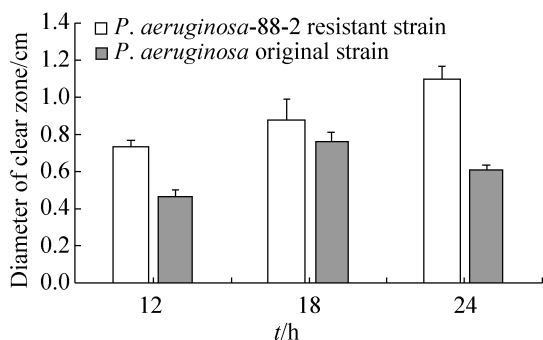


图 2. 绿脓杆菌原始菌株和抗药菌株不同培养时间的胞外蛋白酶活性

Figure 2. Extracellular protease activities of *P. aeruginosa* resistant and original strains at different time incubation (M±SD).

素突变株分泌的胞外蛋白酶活性较原始菌株增高, 随着培养时间的延长, 尤其在 24 h 时胞外蛋白酶活性差异更大。此结果表明绿脓杆菌对噬素产生抗药性之后能导致胞外蛋白酶活性增高, 但

是否影响噬素的抗菌活性需要进一步验证。

2.6 绿脓杆菌抗药前后发酵上清液对噬素抗菌活性的影响

由表 5 可知, 与绿脓杆菌原始菌株分泌的上清液相比, 绿脓杆菌 ATCC27853 88-2 上清液对噬素抗菌活性影响较大, 能明显降低噬素的抑菌活性。此结果表明抗噬素绿脓杆菌突变株分泌的胞外产物降低了噬素的抗菌活性。

2.7 绿脓杆菌抗药前后发酵上清液 SDS-PAGE

为了探讨噬素诱导绿脓杆菌对其产生抗药前后分泌的蛋白类产物有无差异, 我们对其抗药前后的发酵上清液进行了 SDS-PAGE。由上清液蛋白图谱图 3-A 可知, 绿脓杆菌 ATCC27853 原始菌株和 ATCC27853 88-2 诱导抗药菌株产生的蛋白分泌物条带有差异, 绿脓杆菌 88-2 抗药突变株的

表 5. 发酵上清液与噬素温育 5 h 的抗菌活性检测

Table 5. Effects of tachyplesin I treatment with culture filtrates of *P. aeruginosa* strain for 5 h on antibacterial activity

Treatment	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Inhibition rate/%
Culture filtrates of <i>P. aeruginosa</i> original strain+tachyplesin I	10<MIC<20	53.2%<P<69.8%
Culture filtrates of <i>P. aeruginosa</i> -88-2 resistant strain+tachyplesin I	MIC>40	–
Medium+tachyplesin I	5<MIC<10	41%<P<92%

– shows no inhibition rate.

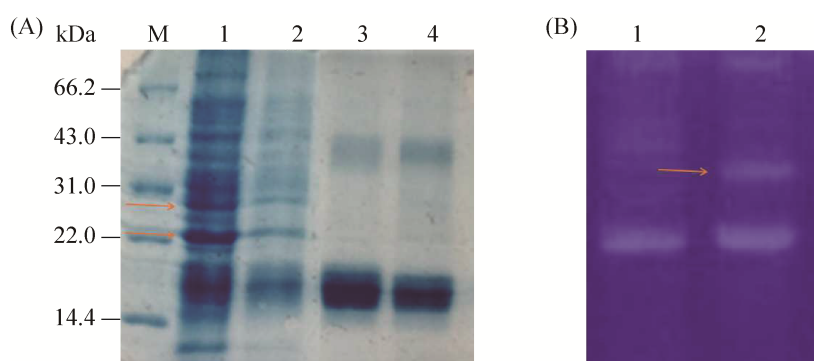


图 3. 绿脓杆菌抗药前后的 SDS-PAGE 图

Figure 3. SDS-PAGE analysis of *P. aeruginosa* before and after induction. A: Analysis of culture filtrates protein in *P. aeruginosa* resistant and control strains. M: Low molecular weight protein marker (14.4–97.4 kDa); lanes 1,2: *P. aeruginosa* ATCC27853 88-2; lanes 3,4: *P. aeruginosa* ATCC27853. B: Analysis of extracellular proteases in *P. aeruginosa* induction strains. Lane 1: *P. aeruginosa* ATCC27853; lane 2: *P. aeruginosa* ATCC27853 88-2.

蛋白条带明显多于绿脓杆菌 ATCC27853 原始菌株。由胞外蛋白酶谱图 3-B 可知, 绿脓杆菌 ATCC27853-88 抗药菌株较原始菌株分泌的胞外蛋白酶活性明显比原始菌株增强。通过图 3 和表 5 结果推测胞外蛋白活性增强可能是绿脓杆菌产生抗药性的原因之一。

2.8 生物膜预形成的测定

如图 4 所示, 在相同的条件下, 绿脓杆菌抗药菌株 ATCC27853 88-2 较原始菌株生物膜产量增高, 说明抗药菌株更易形成生物膜。用不同浓度鲎素处理两种菌株 36 h 后, 对于生物膜含量均有不同程度的减少且呈浓度依赖方式, 但绿脓杆菌原始菌株在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲎素处理时含量显著降低而抗药菌株 ATCC27853 88-2 降低不明显。此结果表明 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度(MIC)的鲎素能抑制绿脓杆菌原始菌株生物膜的形成, 但对抗药菌株 88-2 生物膜的形成抑制较弱。

2.9 绿脓杆菌胞外多糖的变化

如图 5 所示, 通过苯酚硫酸法测定绿脓杆菌

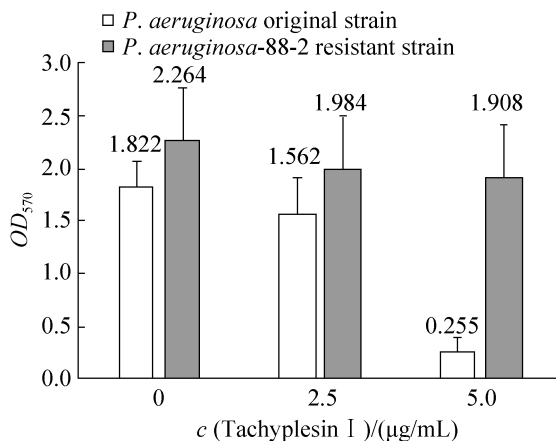


图 4. 鲎素对绿脓杆菌原始菌株和抗药菌株 88-2 生物膜形成的影响

Figure 4. Effect of tachyplesin on biofilm formation of *P. aeruginosa* original and resistant strains ($M \pm SD$).

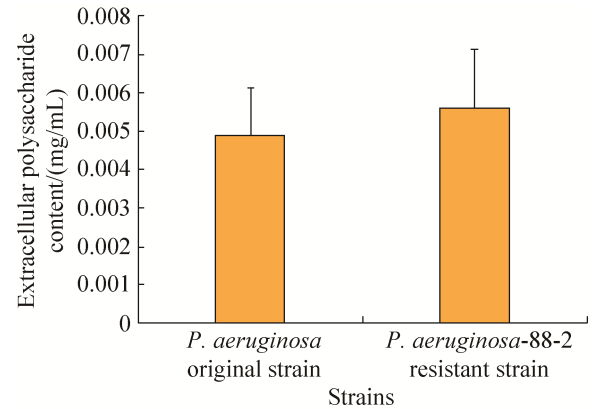


图 5. 绿脓杆菌 ATCC27853 原始和抗药菌株的胞外多糖含量

Figure 5. Extracellular polysaccharide content of *P. aeruginosa* original and resistant strains ($M \pm SD$).

胞外粗多糖含量, 由获得的葡萄糖标准曲线 $y = 45.366x - 0.0413$ ($R^2 = 0.999$) 计算绿脓杆菌抗药菌株和原始菌株的胞外多糖含量。在相同的条件下, 抗药菌株 88-2 比原始菌株的胞外多糖含量高。此结果说明生物膜产物中多糖含量发生了变化。

3 讨论

在本研究中, 绿脓杆菌作为一种人-畜共患条件性病原菌, 已成为医院和养殖厂等感染的主要病原菌之一, 由于对抗生素的多重抗药性, 在临床抗感染治疗中有着特殊重要的地位。该菌极易形成生物膜, 是造成严重难治性感染的主要致病菌之一, 单独使用抗生素的治疗效果并不理想。有报道表明一些抗菌肽对绿脓杆菌有很好的抑制作用如 LL-37、鲎素和从金环蛇中提取的螺旋结构的肽(BF)等。

在本研究中, 证实了经过连续增高药物压力选择(大于 30 代)后, 绿脓杆菌 ATCC27853 在体外也能对鲎素进化出抗药性。在同样条件下较绿

脓杆菌 CGMCC1.260 (大于 60 代)更易进化出对鲎素抗药性。有学者对抗药突变株的交叉抗药性进行研究, 结果发现, 有些抗抗菌肽病原菌对来源相同作用机制相似的^[17]或来源不同作用机制不同的抗菌肽均能产生抗药性^[18-19]。在本研究中, 我们的结果也证明了绿脓杆菌鲎素抗药突变株亦能降低对其他同源或不同来源的抗菌肽和抗菌药物的敏感性。然而, 关于鲎素与丁胺卡那的交叉抗药性机制仍不清楚。根据前人的研究, 我们推测可能鲎素诱导的抗药菌株产生了灭活酶或生物膜形成或膜通透性改变等导致了丁胺卡那的失活或无法透过细胞膜, 具体的机制有待进一步确认。

Habets 等^[6]首次发现细菌对抗菌肽产生抗药性将有可能降低机体自身的固有免疫作用, 并对其应用前景构成极大威胁。鉴于以上研究提示, 我们推测在本研究中进化出的绿脓杆菌抗鲎素突变株对人源抗菌肽以及鲎源其他抗菌肽或者某些抗生素产生抗药性将成为可能, 此结果有待进一步确认。

在诱导抗药性过程中发现, 随着诱导传代次数的增多, 与无药对照菌株相比, 诱导加药菌株在 CN 琼脂平板上生长更快, 明胶液化时间延长, 产生绿脓菌素快慢也有差异, 此结果表明诱导菌株在绿脓菌素、明胶酶的分泌量方面发生了一定的变化。在本研究中还发现绿脓杆菌抗药菌株在无药培养基中有更长的延滞期作为抗药性代偿。此结果与前人报道的在无药培养基中与对照菌株相比, 抗药菌株需要花费更长的时间开始增殖, 但一旦复制开始复制率不受影响相一致^[3]。简言之, 抗菌肽抗药性可能通过其他途径代偿如生长率的降低或产生一个更长的延滞期。

已研究证实绿脓杆菌主要通过以下几种策略抵抗抗菌肽的作用: 细胞表面修饰减少抗菌肽的结合或进入, 释放肽酶、蛋白酶降解和水解抗菌肽, 外排泵有效泵出进入体内的肽, 生物膜的形成等^[20-21]。有些细菌通过蛋白酶介导的降解来逃避宿主防御肽。如绿脓杆菌、粪肠球菌和金黄色葡萄球菌表达的胞外蛋白酶能够降解和钝化 II-37^[14,22]。我们研究表明绿脓杆菌 ATCC27853 对鲎素的抗药性机制可能与胞外蛋白酶有关。此结果不同于我们前期研究的绿脓杆菌 CGMCC1.260-80 对鲎素抵抗不完全依赖于胞外蛋白酶活性增高^[12]。

一般而言, 传统的抗生素一般不能透过生物膜。到目前为止, 抗菌肽被认为是对抗多重抗药细菌生物膜感染最有潜力的药物, 因为许多天然的或人工合成抗菌肽已经被证明可以阻止生物膜的形成。小分子人工合成肽 1037 能抑制绿脓杆菌生物膜形成和群集运动, 以及调控生物膜形成基因^[23]。在众多绿脓杆菌感染的抗药机制中, 形成生物膜的抗药机制占有重要地位。从本实验结果可知, 抗鲎素绿脓杆菌 ATCC27853-88-2 较绿脓杆菌原始菌株更易形成生物膜, 且当鲎素终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对抗药菌株 88-2 生物膜的形成仅有部分抑制作用, 对原始菌株几乎全部抑制生物膜形成, 且胞外多糖含量也较原始菌株增高。当胞外多糖的含量达到一定的浓度时可以促进生物膜的形成, 它可以增加细菌之间的粘附作用, 更容易形成生物膜, 使抗菌药物不易进入。本研究通过对生物膜形成和多糖含量的探讨, 也仅仅推测出绿脓杆菌 ATCC27853-88-2 对鲎素的抗药性可能与生物膜相关, 但具体的是哪些基因或蛋白引起

这些变化有待进一步研究, 尤其与生物膜形成有密切相关的群体感应(QS)系统。

综上所述, 绿脓杆菌 ATCC27853 在经过长期的增高药物浓度压力选择之后, 可对鲨素产生明显的抗药性及对其他部分抗菌肽产生抗药性, 以及胞外蛋白酶和生物膜形成可能介导绿脓杆菌 ATCC27853 对鲨素的抵抗。但是关于调控生物膜形成和胞外蛋白酶的基因需要进一步研究。我们的研究结果提示, 鲨素的开发和长期临床使用将存在较大风险。考虑到鲨素将来广泛地在临床上应用, 我们需要对鲨素的结构进行改造以及注意正确的使用和开发, 防止重蹈抗生素的覆辙。

参考文献

- [1] Anaya-López JL, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013, 39(2): 180–195, doi: 10.3109/1040841X.2012.699025.
- [2] Cai Y, Chai D, Wang R, Liang BB, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(7): 1607–1615.
- [3] Perron GG, Zasloff M, Bell G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, 273(1583): 251–256.
- [4] Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(7): 529–536.
- [5] Hong J, Guan WT, Jin G, Zhao HY, Jiang XH, Dai JG. Mechanism of tachyplesin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry. *Microbiological Research*, 2015, 170: 69–77.
- [6] Dai JG, Xie HW, Jin G, Wang WG, Zhang Y, Guo Y. Preliminary study on high-level expression of tandem-arranged tachyplesin-encoding gene in *Bacillus subtilis* Wb800 and its antibacterial activity. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(1): 109–117.
- [7] 田颖. 鲨素抗菌肽对海兰褐蛋鸡产蛋后期蛋品质及子宫 CaBP-D28k mRNA 表达量影响的研究. 吉林大学硕士学位论文, 2016.
- [8] Zhang Y, Feng X, Han D, Tie KY, Zhang QY, Yu X, Han WY. Therapeutic effect of genetic engineering tachyplesin I on *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(4): 682–685, 691. (in Chinese) 张洋, 冯新, 韩东, 铁鲲鹏, 张楸杨, 于曦, 韩文瑜. 基因工程鲨素对金黄色葡萄球菌小鼠感染模型治疗效果. *中国兽医学报*, 2017, 37(4): 682–685, 691.
- [9] Gao Y, Zhao HL, Feng X, Zhai RD, Zhu S, Du CT, Sun CJ, Lei LC. Expression of recombinant human lysozyme-tachyplesin I (hLYZ-TP I) in *Pichia pastoris* and analysis of antibacterial activity. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2013, 26(4): 319–322.
- [10] 曹原. 基因工程鲨素 Tachyplesin I 的工业化生产及其皮肤抗菌凝胶的研制. 吉林大学硕士学位论文, 2017.
- [11] Hong J, Dai JG, Guan WT, Jin G, Huang ZL, Zhang LJ, Zhang Y. Tachyplesin I induce drug resistance in bacteria *in vitro*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(7): 939–945.
- [12] Hong J, Hu JY, Ke F. Experimental induction of bacterial resistance to the antimicrobial peptide tachyplesin I and investigation of the resistance mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(10): 6067–6075.
- [13] Li M, Lai YP, Villaruz AE, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M. Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(22): 9469–9474.
- [14] Lai YP, Villaruz AE, Li M, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(2): 497–506.

- [15] Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 128.
- [16] 曾祥萍. AL-1 单用及联合用药对铜绿假单胞菌生物膜形成的抑制作用及其作用机理研究. 暨南大学硕士学位论文, 2011.
- [17] Mehla J, Sood SK. Substantiation in *Enterococcus faecalis* of dose-dependent resistance and cross-resistance to pore-forming antimicrobial peptides by use of a polydiacetylene-based colorimetric assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(3): 786–793.
- [18] Habets MGJL, Brockhurst MA. Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity. *Biology Letters*, 2012, 8(3): 416–418.
- [19] Lofton H, Pranting M, Thulin E, Andersson DI. Mechanisms and fitness costs of resistance to antimicrobial peptides LL-37, CNY100HL and wheat germ histones. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68875.
- [20] Gruenheid S, Le Moual H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 330(2): 81–89.
- [21] Nuri R, Shprung T, Shai Y. Defensive remodeling: How bacterial surface properties and biofilm formation promote resistance to antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2015, 1848(11): 3089–3100.
- [22] Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wójcik K, Puklo M, Lupa B, Suder P, Silberring J, Reed M, Pohl J, Shafer W, McAleese F, Foster T, Travis J, Potempa J. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(12): 4673–4679.
- [23] Fuente-Núñez CDL, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EBM, Horsman S, Lewenza S, Burrows L, Hancock REW. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(5): 2696–2704.

Characteristics and resistance of tachyplesin-I resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

Jun Hong^{#*}, Jianye Hu[#], Kun Liu, Chaohua Wang, Chunyun Zhou, Kunmin Yan, Shuangshuang Gao

College of Life Science and Engineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467036, Henan Province, China

Abstract: [Objective] To explore the safety of tachyplesin I as an antibacterial drug for wide clinical application, we induced *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tachyplesin I and studied the preliminary resistance mechanisms, which may provide theoretical basis for the widely application of tachyplesin-I. [Methods] First, we induced *P. aeruginosa* resistance to tachyplesin I using continuously increasing concentration selection pressure and monitored bacterial resistance. Second, we studied the stability, cross-resistance and cost of resistance of resistant strain. Last, we investigated the potential role of extracellular proteases, extracellular polysaccharide content and biofilm formation in the resistance mechanism. [Results] After more than 30 serial transfers in *P. aeruginosa* ATCC27853 under increasing concentrations of tachyplesin I selection, the MIC values for *P. aeruginosa* was gradually increased, whereas high resistance to tachyplesin I was produced until 80 serial transfers. *P. aeruginosa* ATCC27853 showed resistance to tachyplesin I under long-term, continuously increasing concentration selection pressure. Cross-resistances between tachyplesin I, amikacin and other antimicrobial peptides (pexiganan, tachyplesin III, and polyphemusin I) were observed in resistant mutant. Our resistant strain displayed a substantial cost of resistance mainly in the form of a much longer lag phase in the absence of tachyplesin I in *P. aeruginosa*, whereas in the presence of tachyplesin I, resistant strain had a shorter lag phase and greater growth rate. The resistant strain *P. aeruginosa* ATCC27853-88-2 exhibited increased levels of extracellular proteolytic activity and reduced the antimicrobial activity of tachyplesin I. Under the same conditions, extracellular polysaccharide content of the resistant strain was higher, more easily to form biofilm than the original strain. [Conclusion] We demonstrate that long-term continuous exposure to high concentrations of tachyplesin I can induce resistance in *P. aeruginosa* ATCC27853 and the potential involvement of extracellular protease and biofilm formation in mediating this resistance.

Keywords: tachyplesin I, *P. aeruginosa* ATCC27853, resistance, extracellular proteases, biofilm formation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31540060), by the Key Scientific Research Project from Henan Provincial Higher School of China (12A180001) and by the Research Ability to Enhance Engineering Projects of Henan University of Urban Construction (2016QY016)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: hongjun@hncj.edu.cn

Received: 6 November 2017; Revised: 26 December 2017; Published online: 18 January 2018