

## 基础研究·写作要求



**1 题名：**简明确切地反映论文的特定内容，鲜明而有特色，阿拉伯数字不宜开头，不用副题名，一般 20 个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

**2 作者：**作者署名的次序按贡献大小排列，多作者时姓名间用逗号。英文摘要中，先名后姓，首字母大写，如：Ying-Qiu Huang, Ming Li. 增加第一作者简介。

**3 单位：**作者后写单位的全称空 1 格后再写省市及邮政编码，不同作者单位分别写出。

**4 基金资助项目：**可以增加省市级以上基金资助项目，并加基金号。英文摘要中翻译为准确的英文。

**5 通讯作者：**本刊只设一位通讯作者，不设共同通讯作者，需增加职称。

**6 摘要：**应包括中英文摘要，结构式摘要，内容应包括：目的(一般用探讨，研究，观察，评价，比较等引领整个句子，25 字)，方法(一般包含四要素，即分组，造模，给药，指标检测，<225 字)，结果(根据方法中的检测指标得出结果，尽量将原始数据体现出来，如果原始数据过多检验值是一种很好的选择，<225 字)，结论(精练、尽量采用一句话式表达，25 字)。

**7 关键词：**应包括中英文关键词，作者应在关键词列表中提供 3-10 个关键词，来反映论文中的核心内容。请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版 *Index Medicus* 中医学主题词表 (MeSH) 内所列的词。必要时可采用惯用的自由词。每个关键词之间用“;”分隔。格式如：肠道菌群；急性胰腺炎；慢性胰腺炎；自身免疫性胰腺炎。每个英文关键词第一个字母大写。每个关键词之间用“;”分隔。

**8 正文：**文章层次为：0 引言；1 材料和方法，1.1 材料，1.2 方法；2 结果；3 讨论；4 参考文献。序号一律左顶格写，后空 1 格写标题；2 级标题后空 1 格接正文；3 级标题为 1.2.1 等；4 级标题为(1)，(2)，(3)；尽量不要出现更小的分级。

**9 图表：**图表的数量要精选。表应有表序和表题，并有足够具有自明性的信息，使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头，表内非公知通用缩写应在表注中说明，表格一律使用三线表(不用竖线)，在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注，以使其容易被读者理解，所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图，统一用一个注解分别叙述。如：图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用：<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注)。如同一表中另有一套 P 值，则<sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ 。

**10 参考文献：**本刊采用“顺序编码制”的著录方法，即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映，并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名，则需在“Pang 等”的右上角注角码号；若正文中仅引用某文献中的论述，则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生<sup>[1]</sup>报告……，潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……；PCR 方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时，用与正文同号的数字并排，如本实验方法见文献[8]。文献量达 35 条，可以参考本刊相关文章。

**11 名词术语：**应标准化，前后统一，如原词过长且多次出现者，可于首次出现时需要包含中英文全称，以后直接用简称。

## 写作格式实例

## ●基础研究●

### 主动外排泵外膜蛋白编码基因 *hefA* 在幽门螺杆菌多重耐药中的重要作用

刘志强, 郑鹏远

刘志强, 郑鹏远, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014

刘志强, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究.

**基金项目：**河南省杰出青年基金资助项目, No. 074100510017; 河南省高校创新人才基金计划资助项目, No. 2005.

**作者贡献分布：**刘志强与郑鹏远对此文所作贡献均等; 此课题由郑鹏远与刘志强设计; 研究过程由郑鹏远与刘志强操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑鹏远提供; 数据分析由刘志强完成; 本论文写作由刘志强与郑

鹏远完成.

**通讯作者:** 郑鹏远, 教授, 主任医师, 450014, 河南省郑州大学第二附属医院消化内科. medp7123@yahoo.com

**收稿日期:**

**修回日期:**

**接受日期:**

**在线出版日期:**

### **Important role of efflux pump gene *hefA* in multidrug resistance of *Helicobacter pylori***

Zhi-Qiang Liu, Peng-Yuan Zheng

Zhi-Qiang Liu, Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

**Supported by:** the Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Henan Province, No.074100510017; and Henan Province Innovation Research Foundation for Talents of Higher Education, No. 2005.

**Correspondence to:** Professor Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@yahoo.com

**Received:**

**Revised:**

**Accepted:**

**Published online:**

### **Abstract**

**AIM:** To determine whether efflux systems contribute to multidrug resistance(MDR) in *Helicobacter pylori* (*H.pylori*).

**METHODS:** A chloramphenicol-induced MDR model ex vivo was developed in six susceptible *H.pylori* strains (5 isolates and *H.pylori* NCTC11637). The minimal inhibitory concentrations (MICs) of erythromycin, metronidazole, penicillin G, tetracycline and ciprofloxacin were determined using agar dilution tests and MDR strains were selected accordingly. The mRNA expression level of *hefA* was estimated using fluorescence real-time quantitative PCR. A *H.pylori* LZ1026 knockout mutant ( $\Delta$ HpLZ1026) for (putative) efflux protein was constructed through insertion of the Kanamycin resistance cassette from pEGFP-N2 into *hefA*, and its susceptibility profiles to 10 antibiotics were estimated. Expressions of *hefA* and *hefC* genes were detected using PCR in 20 clinically isolated *H.pylori* strains.

**RESULTS:** There was similar multidrug-resistance in chloramphenicol-induced screened multidrug-resistant (MDR) strains. Expression level of *hefA* gene in the 6 MDR strains was significantly higher compared with drug-sensitive strains ( $5.8466 \pm 2.9370$  vs  $2.6356 \pm 1.7245$ ,  $P = 0.033$ ).  $\Delta$ HpLZ1026 was constructed successfully and its sensitivity to four of ten antibiotics was significantly increased. In all the 20 isolated strains, *hefA* and *hefC* genes were detected while strains of *hefABC* gene depletion were not found.

**CONCLUSION:** Efflux pump gene *hefA* plays an important role in multidrug resistance of *Helicobacter pylori* ex vivo. The *hefABC* gene exists universally in *H. pylori*, which plays an essential role in mechanism underlying multidrug resistance.

**Key Words:** *H.pylori*; Multidrug resistance; Efflux pump; Fluorescence real-time quantitative PCR; Knockout mutant

Liu ZQ, Zheng PY. Important role of efflux pump gene *hefA* in multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008

## 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌(*H.pylori*)分离株的多重耐药机制.

**方法:** 用氯霉素对临床分离株 *H.pylori* 和标准株 *H.pylori* 进行体外诱导, 琼脂稀释法测定诱导后菌株对甲硝唑、四环素、琥乙红霉素、环丙沙星和青霉素 G 的耐药性, 从而筛选出多重耐药株; 实时定量 PCR 检测多重耐药株和敏感株中编码主动外排泵外膜蛋白的结构基因 *hefA* 的 mRNA 水平. 通过构建 *hefA* 基因敲除株, 测定敲除前后菌株对 10 种抗生素的敏感性. PCR 扩增 20 株 *H.pylori* 临床分离株主动外排泵结构基因 *hefA* 和 *hefC*.

**结果:** 经氯霉素诱导后, 筛选出的耐药菌株均表现出相似的多重耐药性, 6 株多重耐药株 *hefA* 基因 mRNA 水平显著高于敏感株( $5.8466 \pm 2.9370$  vs  $2.6356 \pm 1.7245$ ,  $P = 0.033$ ); 成功构建了 *hefA* 基因敲除株( $\Delta$ HpLZ1026),  $\Delta$ HpLZ1026 对 4 种抗生素的敏感性明显增加; 所有 20 株临床分离株中均检测出 *hefA* 和 *hefC* 基因, 未发现 *hefABC* 基因缺失株.

**结论:** 主动外排系统 *hefA* 基因高表达导致体外人工诱导 *H.pylori* 多重耐药的产生; *hefABC* 基因在 *H.pylori* 中普遍存在, 且在 *H.pylori* 多药耐药机制中起重要作用.

**关键词:** 幽门螺杆菌; 多重耐药; 外排泵; 实时定量 PCR; 基因敲除

刘志强, 郑鹏远. 主动外排泵外膜蛋白编码基因 *hefA* 在幽门螺杆菌多重耐药的重要作用. 世界华人消化杂志 2008

## 0 引言

世界人口50%以上存在幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染<sup>[1-4]</sup>. 已经证实*H.pylori*感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的主要病因, 与胃癌的发生亦有密切关系<sup>[5-6]</sup>. 随着抗生素在根除*H.pylori*治疗中的广泛应用, *H.pylori*耐药的发生率不断上升, 而且, 已经出现同时对甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林耐药的三重耐药株<sup>[7]</sup>, 研究表明, 能将抗生素主动排出体外的外排泵在细菌的多重耐药机制中起重要作用<sup>[8-11]</sup>. 与细菌多重抗生素耐药性有关的主动外排泵系统主要归于5个家族/类<sup>[12-13]</sup>, 其中, 耐受-生节-分裂家族(Resistance-Nodulation-Division [RND] family, 在革兰氏阴性菌多重耐药中起重要作用, 能够排出底物相似性很小底物, 包括多类抗菌药物, 也包括用于消毒灭菌的抑菌剂、去污剂、表面活性剂、染料及有机溶剂等<sup>[8,10]</sup>. 杨海燕等<sup>[14]</sup>研究发现*acrAB*-RND泵的过度表达与志贺菌的多重耐药产生密切相关. Bina等<sup>[15]</sup>鉴定了*H.pylori*中存在*hefABC*, *hefDEF*, *hefGHI*三种RND类主动外排系统, 通过基因敲除技术分别使三种外排泵功能失活后, 用纸片扩散法对敲除前后菌株进行药敏试验, 结果显示RND类外排泵在*H.pylori*产生多重耐药中的作用仍未明了; 而van Amsterdam等<sup>[16]</sup>通过敲除*tolC*同源<sup>[17]</sup>的外膜通道蛋白编码基因, 显示外排泵在*H.pylori*对甲硝唑耐药机制中起重要作用, 然而外排泵的编码基因在*H.pylori*多重耐药株中的表达情况未精确定量. 由于亚洲*H.pylori*菌株在生物学性状与欧美地区*H.pylori*菌株存在诸多不同<sup>[18]</sup>, 本文以中国*H.pylori*菌株为研究对象, 研究主动外排系统*hefABC*在*H.pylori*临床分离株中的诱导表达情况, 采用更加精确的琼脂二倍稀释法测定*hefA*基因敲除株*H.pylori*对多种抗生素的耐药性, 为克服*H.pylori*的多重耐药产生提供理论基础. 结果报道如下.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

用于体外诱导耐药试验的 *H.pylori* 和 *H.pylori* LZ1026 株随机选取于消化性溃疡或慢性活动性胃炎患者胃黏膜活检标本(郑州大学第二附属医院消化内科胃镜室, 2006-03/2007-07), 采用含 70 mL/L 羊血的布氏培养基, 37℃微需氧(850 mL/L N<sub>2</sub>、100 mL/L CO<sub>2</sub>、50 mL/L O<sub>2</sub>)、相对湿度>98%的条件下培养 3 d, 菌株经生化反应(尿素酶、触酶、氧化酶)及 HE 染色、形态学鉴定, 获取临床分离株; HP NCTC11637、质粒 pBluescript II SK(-)和 pEGFP-N2 由河南分子医学重点实验室提供. 阿莫西林、头孢他定、萘啶酸、庆大霉素、多黏霉素 B、克拉霉素、氟哌酸、

四环素、氯霉素、环丙沙星、甲硝唑、头孢噻肟、琥乙红霉素、青霉素 G 均购自中国药品生物制品检验所; DNA 提取试剂盒、总 RNA 抽提试剂盒和 cDNA 第一链合成试剂盒购自北京赛百盛生物公司; pMD19-T vector 购自 TaKaRa 公司; RealMasterMix(SYBR Green) 试剂盒均购自宝赛公司; 荧光定量仪: Gene Amp 5700 Sequence Detector 定量 PCR 扩增仪及配套分析软件 Gene Amp 5700 SDS(美国 Perkin-Elmer 公司). PCR 引物设计, 参照 Bina 等<sup>[15]</sup>在 GenBank 上公布的 *H.pylori hefABC* 基因序列, 进行同源性序列分析, 在其保守区段内设计, 参照文献<sup>[19]</sup>, 内参选用 *gyrB* 基因(DNA 旋转酶 B 亚单位基因), 由上海生物工程技术服务公司合成.

## 1.2 方法

1.2.1 多重耐药 *H.pylori* 的体外诱导和筛选: (1)对临床分离敏感菌株进行单菌落传代培养, 测定诱导剂氯霉素对受试菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC); (2)在含  $1/2 \times \text{MIC}$  诱导剂的培养基接种  $3 \mu\text{L}$  培养物( $10^8 \text{ CFU/L}$ ),  $37^\circ\text{C}$  培养 48 h. 挑选生长良好的菌落, 接种于含  $1 \times \text{MIC}$  诱导剂的培养基,  $37^\circ\text{C}$  培养 48 h. 不断提高诱导剂在培养基中的浓度, 重复传代培养, 直至诱导剂浓度大于或等于  $128 \times \text{MIC}$ , (3)上一步最后得到的耐药株, 作 4 次无诱导剂传代培养后, 接种于含  $4 \times \text{MIC}$  诱导剂的培养基培养, 证实耐药菌株为非适应性耐药<sup>[20-21]</sup>. 将经诱导获得的菌株作琼脂平板培养, 分别接种于含四环素、青霉素 G、环丙沙星、甲硝唑、琥乙红霉素药物( $4 \times \text{MIC}$ ) 的琼脂平板,  $37^\circ\text{C}$  培养 48 h, 筛选出多重耐药菌株<sup>[22]</sup>.

1.2.2 抗菌药物最低抑菌浓度测定: 用琼脂平皿二倍稀释法测定 5 种抗菌药物对多重耐药株的最低抑菌浓度. 并确定其多重耐药谱及相应的 MIC.

1.2.3 *H.pylori hefA*、*hefC* 基因的检测: 采用 DNA 提取试剂盒提取 *H.pylori* 基因组 DNA. PCR 扩增体系  $50 \mu\text{L}$ , 三蒸水  $24.5 \mu\text{L}$ ,  $10 \times \text{PCR}$  反应缓冲液  $5 \mu\text{L}$ ,  $25 \text{ mmol/L MgCl}_2$   $3 \mu\text{L}$ ,  $1 \text{ mmol/L dNTP}$   $4 \mu\text{L}$ ,  $2.5 \mu\text{mol/L}$  引物各  $2.5 \mu\text{L}$ , 模板 DNA  $8 \mu\text{L}$ ,  $5 \text{ U Taq}$  酶  $0.5 \mu\text{L}$ ,  $94^\circ\text{C}$  变性 1 min, PCR 循环参数为:  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $55^\circ\text{C}$  45 s,  $72^\circ\text{C}$  120 s 共 30 个循环, 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 600 s. 用含  $0.5 \text{ mg/L}$  溴化乙啶的  $10 \text{ g/L}$  琼脂糖电泳分析 PCR 产物并拍照, 扩增用引物见表 1(*hefA*, *hefC*).

1.2.4 *H.pylori hefA* 基因表达水平的检测与分析: 取  $37^\circ\text{C}$  微需氧( $850 \text{ mL/L N}_2$ 、 $100 \text{ mL/L CO}_2$ 、 $50 \text{ mL/L O}_2$ )、相对湿度  $>98\%$  的条件下培养 3 d *H.pylori*, 从培养基上收集 *H.pylori* 重悬于磷酸盐缓冲液中, 紫外分光光度计测定浓度, 当  $A_{660\text{nm}} = 0.1$ , 取  $1 \text{ mL}$  提取其总 RNA. 幽门螺杆菌总 RNA 的提取按 TRIzol 试剂盒说明书步骤操作, 紫外分光光度计测定 RNA 含量. 反转录体系如下: M-MLV 酶  $200 \text{ U}$ ,  $5 \times$  缓冲液  $4 \mu\text{L}$ ,  $0.1 \text{ mol/L DTT}$   $2 \mu\text{L}$ , RNasin  $20 \text{ U}$ ,  $5 \text{ mmol/L dNTPs}$   $2 \mu\text{L}$ , RNA  $2 \mu\text{g}$ ,  $100 \text{ mg/L}$  随机引物  $1 \mu\text{L}$ , 加 DEPC 处理水至总体积  $20 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  1 h. 将上述反转录产物进行 PCR 扩增, 引物见表 1(*hefA*, *gyrB*), 反应体积及参数同 1.2.3

1.2.5 实时定量 PCR: 取 *hefA* 表达阳性菌株 Hp11032 的 *hefA*, *gyrB* 反转录 PCR 产物(cDNA), 纯化后连接于 pMD19-T 质粒, 重组质粒纯化后进行浓度测定, 梯度稀释作为标准曲线用标准品.  $25 \mu\text{L}$  PCR 反应体系中包括: 上下游引物各  $0.5 \mu\text{L}$  ( $10 \mu\text{mol}$ ),  $2 \times \text{Mix}$   $12.5 \mu\text{L}$  (包括反应缓冲液、dNTP、 $\text{MgCl}_2$ 、SYBRGreen I、Taq 酶), 双蒸水  $11 \mu\text{L}$ , cDNA

标本1  $\mu\text{L}$ . 将不同浓度的标准模板同时进行PCR, 扩增条件同1.2.4, 循环35次, 同时进行RNA为模板的阴性对照, 每个样本进行三次重复. 将检测的临界点设定在PCR扩增过程中, 荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的循环数(threshold cycle,  $C_T$ )作为模板初始浓度的间接指标, 将不同浓度的标准模板拷贝的对数和相应的 $C_T$ 值作图, 得到标准曲线. 将所扩增的PCR产物同时进行琼脂糖凝胶电泳和溶解曲线分析<sup>[23-26]</sup>.

1.2.6 *hefA*基因敲除株的构建: DNA扩增、转化、酶切鉴定参照文献<sup>[27-28]</sup>方法进行, 以临床分离株HpLZ1026(分离于胃溃疡患者)为模板, PCR扩增*hefA*基因编码区277-1574 bp, 1298 bp大小片段(*hefA<sup>M</sup>*) (参照GenBank上公布的Hp11637 *hefA*序列设计引物), 以质粒pEGFP-N2为模板, 扩增卡那霉素抗性基因( $km^R$ ), 引物设计及扩增片段大小见表1(*hefA<sup>M</sup>*,  $km^R$ ), DNA序列测定由上海生物工程技术服务公司完成. *hefA*, pBluescript II SK(-)经*Xba* I, *Xho* I双酶切后, 连接鉴定; 在*hefA*基因715 Bp位点处插入 $km^R$ 抗性基因, 提取重组质粒电转化经微需氧培养*H.pylori*: 自培养72 h的固体培养基上刮取*H.pylori*于1 mL 150 mL/L甘油-9%蔗糖溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$  5000 r/min离心10 min(重复3次), 沉淀重悬于50  $\mu\text{L}$  150 mL/L甘油-9%蔗糖溶液中, 应用U-2001紫外可见分光光度计, 测定 $A_{660\text{nm}}$ 吸光度值( $A_{660\text{nm}} = 1$ , 细菌浓度约 $10^{11}$  CFU/L), 调整细菌浓度为 $10^{13}$ CFU/L. 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置10 min, 加打靶载体pBSK-*hefA*-mutant 500 ng, 冰上静置5 min, 移入-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的0.1 cm电击池中, 冰浴5 min, 电击池置电穿孔架上, 设定电击条件: 25F, 1.8kV, 200 $\Omega$ , 4.92s, 电击后, 立即加SOC缓冲液100  $\mu\text{L}$ 与电击池中细菌混匀, 静置5 min, 将电转液均匀涂布于普通*H.pylori*培养平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 微需氧培养48 h后, 刮取平板上所有菌落于无菌生理盐水中混匀, 转涂于含25 mg/L卡那霉素的*H.pylori*平板上继续培养3-6 d, 挑取单个菌落培养鉴定. 用琼脂平皿二倍稀释法测定10种抗菌药物对*hefA*基因敲除前后菌株的最低抑菌浓度.

**统计学处理** 采用配对*t*检验分析在野生敏感株和多药耐药株之间mRNA表达水平的差异. 数据采用SPSS10.0统计软件包进行统计分析.

## 2 结果

### 2.1 临床分离*H.pylori*诱导耐药结果

在5株野生敏感株和1株标准株(NCTC11637)中, 经氯霉素诱导和筛选出的耐药菌株, 均表现出相似的多重耐药性. 5种受试的抗菌药中, 四环素、青霉素G、环丙沙星、甲硝唑的MIC都程度不同地明显提高, 其中4株菌未诱导出对琥乙红霉素较高浓度的耐药(表2).

### 2.2 临床分离*H.pylori hefA* 的表达水平

幽门螺杆菌RNA提取、反转录PCR结果如图1). 荧光实时定量PCR检测幽门螺杆菌*hefA*相对表达量: 本研究中将*hefA*基因mRNA的初始浓度与相对应的*gyrA*基因的初始浓度相除来进行标准化, 从而得出*hefA*基因产物的相对定量. 5株敏感野生株和Hp11637中均可检测出不同程度的*hefA* mRNA表达, 相对表达量为 $2.6356 \pm 1.7245$ ; 其相对应的氯霉素诱导后多药耐药株中亦可检测出*hefA* mRNA的表达, 其相对表达量为 $5.8466 \pm 2.9370$ (表3). MDR组

*hefA*基因表达水平显著高于敏感野生株( $P = 0.033$ ) (图2).

### 2.3 *hefA*基因敲除株的药敏试验

成功构建了*hefA*基因敲除株( $\Delta$ HpLZ1026), *hefA*基因编码区内1147 bp大小片段被测序并提交GenBank数据库(登录号EU271683). 与基因敲除前野生株HpLZ1026相比, 琼脂稀释法测定MIC显示, 10种抗生素(阿莫西林、头孢他定、萘啶酸、庆大霉素、多粘霉素B、克拉霉素、氟哌酸、环丙沙星、头孢噻肟、氯霉素)中, 有4种抗生素MIC比敲除前野生株下降了8倍, 分别为: 克拉霉素降低了8倍、头孢噻肟降低了32倍、氯霉素降低了16倍、庆大霉素降低了8倍.

### 2.4 *H.pylori hefABC* 基因检测结果

随机筛选20株临床分离幽门螺杆菌均检测出*hefA*, *hefC*基因, PCR扩增产物分别为140 bp、162 bp, 未发现*hefABC*基因缺失株.

## 3 讨论

研究表明, 能将抗生素主动排出体外的外排系统在细菌的多重耐药机制中起重要作用<sup>[8-11]</sup>, 主动外排系统(外排泵) 机制被认为是细菌产生多重耐药的主要机制<sup>[8, 10]</sup>. 革兰氏阴性菌多重耐药中起重要作用 RND 多重药物主动外排系统, 是由三个蛋白成份形成的蛋白复合体<sup>[9, 12]</sup>, 即质膜主动转运体位于细菌质膜(内膜), 并与系于质膜的膜融合蛋白, 及位于细菌外膜但延伸向质膜的外膜因子蛋白一起形成转运复合体, 以达到有效外排药物的功能. RND 主动外排系统中三个蛋白成分中任一蛋白的功能缺陷都会导致外排功能的失活. 随着抗生素在根除 *H.pylori* 治疗中的广泛应用, *H.pylori* 耐药的发生率不断上升, 而且, 已经出现多重耐药株<sup>[7]</sup>. RND 类外排系统介导的药物外排作用是其可能机制. *H.pylori* 中存在 *hefABC*, *hefDEF*, *hefGHI* 三种 RND 类主动外排系统, 其中 *hefA*, *hefD*, *hefG* 编码外膜因子蛋白, *hefB*, *hefE*, *hefH* 编码膜融合蛋白, *hefC*, *hefF*, *hefI* 编码质膜主动转运体; 经过反转录 PCR 扩增, 显示 *hefDEF*, *hefGHI* 在体外表达量很少或不表达<sup>[15]</sup>. Apweiler 等<sup>[29]</sup>报道, 在 *H.pylori* 26695 基因组中共有 27 个外排泵质膜主动转运体基因, 只存在 4 种编码外膜蛋白基因(*H.pylori* 0605, *H.pylori* 0971, *H.pylori* 1327 和 *H.pylori* 1489), 外膜蛋白的缺失将严重影响外排系统的功能<sup>[16]</sup>.

本文以 *H.pylori* 的外膜通道蛋白的编码基因 *hefA*(*H.pylori* 0605)为研究对象, 进行了 *H.pylori* 临床分离株在次抑菌浓度下的氯霉素耐药性诱导试验<sup>[19]</sup>, 首次建立了 *H.pylori* 的多药耐药性诱导试验模型, 因纸片扩散法敏感性差, 可能导致阴性的药敏结果的产生<sup>[15]</sup>, 我们采用琼脂二倍稀释法测定抗生素对菌株的 MIC, 经氯霉素诱导后的 6 株敏感株 *H.pylori*, 在对氯霉素产生耐药的同时, 也产生了对结构和作用机制不同的四环素、环丙沙星、甲硝唑、琥乙红霉素、青霉素 G 5 种抗生素不同程度的耐药, 诱导耐药株对 5 种抗生素的 MIC 值比诱导前敏感株增加了 4 倍以上, 提示外排泵的存在<sup>[30]</sup>. 本实验中 4 株菌未诱导出对琥乙红霉素较高浓度的耐药, 可能原因为, 与其他革兰氏阴性菌不同<sup>[31-33]</sup>, RND 类外排系统在 *H.pylori* 中有着不同的底物特异性. 对其外排泵 *hefABC* 结构基因中编码外膜通道蛋白基因 *hefA* 的 mRNA 表达量, 用实时定量 PCR 进行精确定量, 显示在多药耐药株中表



达量明显高于野生敏感株( $P=0.033$ ). 对中国临床分离株 *H.pylori* LZ1026 通过基因敲除技术, 敲除 *hefA* 基因, 使 *H.pylori* 中 *hefABC*-RND 外排系统功能失活, 并测定敲除前后对多种抗生素的 MIC, 显示敲除后  $\Delta H.pylori$  LZ1026 对 10 种抗生素中的 4 种敏感性明显增加, 进一步证实 *hefA* 基因在 *H.pylori* 多重耐药产生机制中起重要作用.  $\Delta H.pylori$  LZ1026 对其他 6 种抗生素敏感性与敲除前相比未显示增加, 可能因为 *H.pylori* 中除了 *hefABC* 外排系统, 还有其他外排机制的存在<sup>[12]</sup>.

外排泵在敏感菌株之间不表达或表达量很低, 在接触抗生素之后, 表达量明显增加, 从而对在一定抗生素浓度下的细菌起到保护作用, 为存活下来的细菌进一步获得特异性耐药(如药物靶位突变)提供机会, 产生具有临床意义的多重耐药株. 多重耐药性外排泵和其他耐药机制如基因位点的突变等机制协同作用, 共同提高 *H.pylori* 的耐药性, 可能导致高水平耐药株的产生. 本研究发现, 对 20 株临床分离 *H.pylori hefABC* 基因进行扩增显示, 未见 *hefA*, *hefC* 基因缺失株, 证明外排泵在 *H.pylori* 中普遍存在. 研究表明, 外排泵在 *H.pylori* 多重耐药中起重要作用, 介导了 *H.pylori* 多药耐药株的产生.

**致谢:** 感谢段广才、黄志刚及许庆党在本试验中给予的大力帮助.

#### 4 参考文献

- 1 Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: 33-39 [PMID: 8547526] doi:10.1111/j.1523-5378.2008.00586.x
- 2 Shi R, Xu S, Zhang H, Ding Y, Sun G, Huang X, Chen X, Li X, Yan Z, Zhang G. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. *Helicobacter* 2008; 13: 157-65 [PMID: 18321305]
- 3 Raymond J, Nguyen VB, Vidal-Trecañ G, Kalach N. *Helicobacter pylori* infection in children of developing countries. *Med Trop (Mars)*. 2005; 65: 383-8 [PMID: 16548496] doi:10.1016/j.bpg.2006.10.005
- 4 Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 205-14 [PMID: 17382273]
- 5 Axon AT. Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion. *Adv Med Sci* 2007; 52: 55-60 [PMID: 18217390]
- 6 Makola D, Peura DA, Crowe SE. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 548-58 [PMID: 17577110] doi:10.1097/MCG.0b013e318030e3c3
- 7 陈洁, 陈飞波, 余金丹, 陈学军, 李中跃, 章许平. 幽门螺杆菌对克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑体外耐药性和敏感性的初步分析. *中华儿科杂志* 2004; 42: 769
- 8 Borges-Walmsley M.I, AR Walmsley. The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol* 2001; 9: 71-79 [PMID: 11173246] doi:10.1016/S0966-842X(00)01920-X

- 9 Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis* 1998; 27: S32-S41 [PMID: 9710669]
- 10 Brown M H, Paulsen IT, Skurray I R A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype in a new family of transporters. *Mol Microbiol* 1999; 31: 393-395 [PMID: 9987140]
- 11 De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 36-52 [PMID: 16438679] doi:10.1111/j.1574-6976.2005.00002.x
- 12 Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 672-693 [PMID: 11104814] doi:10.1128/MMBR.64.4.672-693.2000
- 13 Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Tikhonova EB, Lau SY, Stratton KL. Mechanism of antibiotic efflux in Gram-negative bacteria. *Front Biosci* 2003; 8: s862-873 [PMID: 12957812] doi:10.2741/1134
- 14 杨海燕, 段广才, 郗园林. 主动外排系统acrAB在志贺菌中分布和表达. *中国公共卫生* 2005; 21: 685
- 15 Bina,JE, RA Alm, M Uria-Nickelsen, SR Thomas, TJ Trust, RE Hancock. Helicobacter pylori uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 248-254 [PMID: 10639345] doi:10.1128/AAC.44.2.248-254.2000
- 16 van Amsterdam K, Bart A, van der Ende A. A Helicobacter pylori TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1477-1482 [PMID: 15793129] doi:10.1128/AAC.49.4.1477-1482.2005
- 17 Koronakis V, Eswaran J, Hughes C. Structure and Function of TOLC: The bacterial exit duct for proteins and drugs. *Biochem* 2004; 73: 467-89 [PMID: 15189150]
- 18 Monteiro MA, Zheng P, Ho B, Yokota S, Amano K, Pan Z, Berg DE, Chan KH, Maclean LL, Perry MB. Expression of histo-blood group antigens by lipopolysaccharides of Helicobacter pylori strains from Asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group antigens. *Glycobiology* 2000; 10: 701-713 [PMID: 10910974] doi:10.1093/glycob/10.7.701
- 19 余菲菲, 丁惠, 林建银, 刘君炎, 陈月秀. 球形与螺旋形幽门螺杆菌基因表达差异的研究. *中国微生态学杂志* 2003; 15: 131
- 20 苏林光, 贾杰, 潘光华. 次抑菌浓度的药物诱导细菌耐药与交叉耐药. *中国抗生素杂志* 1997; 22: 301
- 21 张海旺, 邓旭明, 任晓慧, 唐峰, 褚秀玲. 主动外排系统介导的大肠杆菌多重耐药性的确证. *中国兽医学报*. 2005, 25: 173
- 22 梁晓, 刘文忠, 陆红, 徐蔚文, 萧树东. 幽门螺杆菌体外诱导耐药试验和耐药率监测. *中华消化杂志* 2003;

23: 146-148

23 Aellen S, Que YA, Guignard B, Haenni M, Moreillon P. Detection of live and antibiotic-killed bacteria by quantitative real-time PCR of specific fragments of rRNA. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2006; 50: 1913–1920 [PMID: 16723545] doi:10.1128/AAC.00869-05

24 Nygard AB, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Molecular Biology* 2007; 8: 67 [PMID: 17697375] doi:10.1186/1471-2199-8-67

25 Romanowski T, Markiewicz A, Bednarz N, Bielawski KP. Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61: 500-10 [PMID: 17909518]

26 Shamanina MIu, Vavilin VA, Mordvinov VA, Katokhin AV, Kuznetsova TN, Liakhovich VV. Real-time polymerase chain reaction and its potential clinical application]. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2007; 7: 37-46 [PMID: 17718077]

27 Yuan JP, Li T, Shi XD, Hu BY, Yang GZ, Tong SQ, Guo XK. Deletion of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2251-2257 [PMID: 14562387]

28 Burns BP, Hazell SL, Mendz GL, Kolesnikow T, Tillet D, Neilan BA. The *Helicobacter pylori* pyrB gene encoding aspartate carbamoyltransferase is essential for bacterial survival. *Arch Biochem Biophys* 2000; 380: 78-84 [PMID: 10900135] doi:10.1006/abbi.2000.1920

29 Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LS. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D115–D119 [PMID: 14681372] doi:10.1093/nar/gkh131

30 Wierzbowski AK, Boyd D, Mulvey M, Hoban DJ, Zhanel GG. Expression of the *mef(E)* gene encoding the macrolide efflux pump protein increases in *Streptococcus pneumoniae* with increasing resistance to macrolides. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2005; 49: 4635–4640 [PMID: 16251306] doi:10.1128/AAC.49.11.4635-4640.2005

31 Burse A, Weingart H, Ullrich MS. NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in in vitro competition with other epiphytic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 693–703 [PMID: 14766544] doi:10.1128/AEM.70.2.693-703.2004

32 Fehlner-Gardiner CC, Valvano MA. Cloning and characterization of the *Burkholderia vietnamiensis* norM gene encoding a multi-drug efflux protein. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215: 279–283 [PMID: 12399047]

doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11403.x

33 Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1778–1782 [PMID: 9661020]

表 1 PCR引物列表

引物名称	序列 <sup>a</sup>	扩增大小(bp)
<i>hefA</i>	F: 5'-ACGCCTCGAGTAAAAGCGCAAGGGAATTTG-3' R: 5'-ACGCTCTAGATTCGCTAATTGGCCTAGCAT-3'	142
<i>hefC</i>	F: 5'-TGGAAATCACAGAACTAAAAGC -3' R: 5'-TGGTTGAAGGGGCGAATTA -3'	162
<i>gyrB</i>	F: 5'-TTACTACGACTTATCCTGGGGCTAGCGCTG-3' R: 5'-CCCCATCAATTTCCACATTCTCCGC-3'	267
<i>hefA<sup>M</sup></i>	F: 5'- GCG <b>CTCG</b> AGGTGGGGCTACCACTAATCTC-3' R: 5'-CG <b>TCTAG</b> ACAATCCCTGTGCTGTCTA-3'	1298
<i>km<sup>R</sup></i>	F: 5'- GCA <b>AGCTT</b> AATGATTGAACAAGATGGATTG-3' R: 5'-GCA <b>AGCTTT</b> CAGAAGAAGACTCGTCAAGAAG-3'	800

<sup>1</sup>黑体部分为基因敲除用酶切位点, F: 上游引物, R: 下游引物.

表 2 氯霉素诱导株的多重耐药性比较 (mg/L)

菌株	处理	甲硝唑	琥乙红霉素	环丙沙星	四环素	青霉素G
----	----	-----	-------	------	-----	------

03154	诱导前MIC(mg/L)	0.125	0.125	0.25	0.25	0.125
	诱导后MIC 提高倍数	8×	4×	4×	8×	16×
12025	诱导前MIC(mg/L)	2.0	0.0625	0.125	0.03	0.0625
	诱导后MIC 提高倍数	16×	2×	8×	4×	16×
12021	诱导前MIC(mg/L)	4.0	0.125	0.25	0.125	0.0625
	诱导后MIC 提高倍数	16×	1×	16×	8×	8×
11032	诱导前MIC(mg/L)	1.0	0.0625	0.0625	0.0625	0.25
	诱导后MIC 提高倍数	8×	4×	4×	16×	16×
03174	诱导前MIC(mg/L)	0.5	0.125	0.25	0.125	0.125
	诱导后MIC 提高倍数	8×	1×	8×	4×	32×
11637	诱导前MIC(mg/L)	0.5	0.0625	0.125	0.03	0.25
	诱导后MIC 提高倍数	4×	2×	4×	8×	16×

表3 敏感野生株及MDR菌株实时定量PCR结果

菌株	WT( <i>gyrB</i> )	WT( <i>hefA</i> )	MDR( <i>gyrB</i> )	MDR( <i>hefA</i> )	WT( <i>hefA/gyrB</i> )	MDR( <i>hefA/gyrB</i> )
03154	0.379	0.71	0.33	0.86	1.87	2.67
12025	0.78	0.25	0.21	0.59	0.32	2.84
12021	0.80	0.98	0.02	0.17	1.22	8.94
11032	0.32	1.26	0.03	0.18	3.84	5.04
03174	0.13	0.54	0.02	0.11	4.16	6.03
11637	0.23	1.03	0.05	0.49	4.41	9.56

WT: 野生敏感株 MDR: 多重耐药株

M 1 2 3 4 5 6



图 1 *hefA*、*gyrB* 反转录PCR产物电泳图

M: 100 bp Marker, 1、2: *gyrB*, 4、5: *hefA*, 3、6: RNA模板阴性对照.

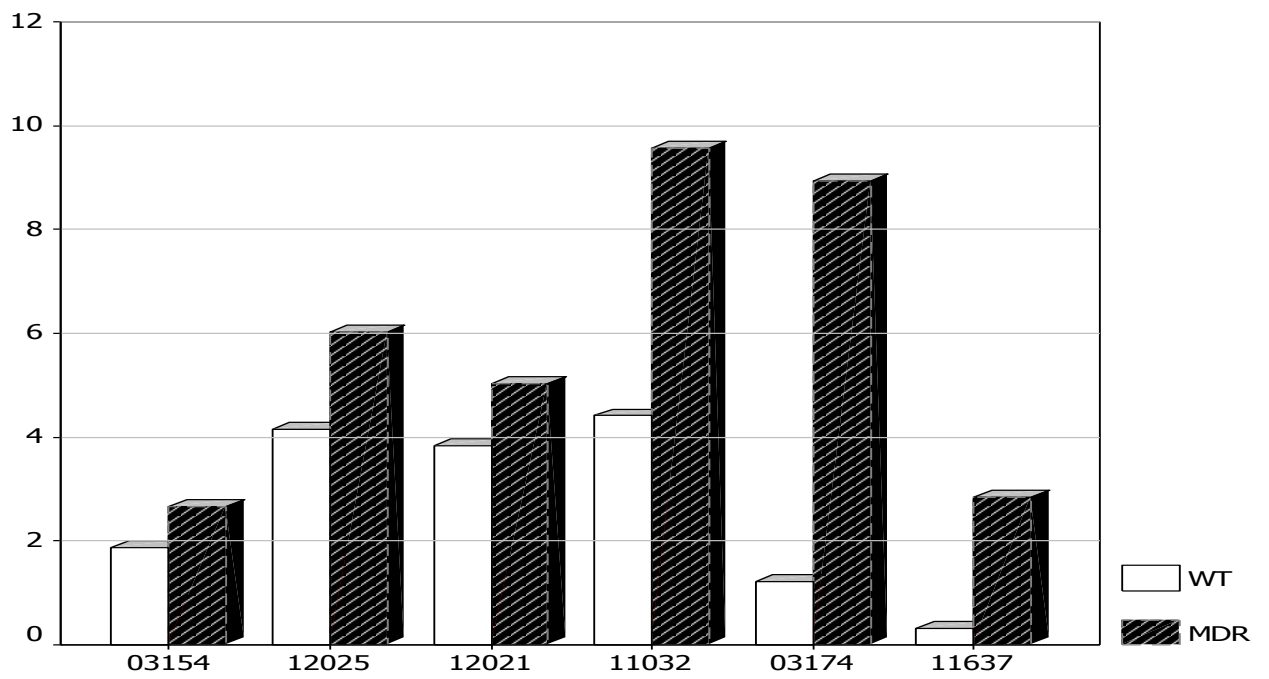


图 2 *hefA*在野生株和多药耐药株中的表达.