

研究报告

抗菌药对鲍曼不动杆菌外膜囊泡产量及主要生物学特性的影响

李倩茹^{1,2}, 何涛², 吉星², 魏瑞成², 王冉², 于美玲^{*1}, 李俊^{*2}

1 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

2 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京), 江苏 南京 210014

李倩茹, 何涛, 吉星, 魏瑞成, 王冉, 于美玲, 李俊. 抗菌药对鲍曼不动杆菌外膜囊泡产量及主要生物学特性的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 295-305.

LI Qianru, HE Tao, JI Xing, WEI Ruicheng, WANG Ran, YU Meiling, LI Jun. Antimicrobials affect the production and characteristics of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii*[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 295-305.

摘要: 【背景】细菌耐药性已成为全球健康卫生和经济发展的巨大威胁。替加环素是治疗多重耐药肠杆菌所致严重感染的主要药物之一,但在2019年发现了可介导其高水平耐药的替加环素耐药基因 *tet(X3)*。外膜囊泡作为介导水平基因转移的新型方式,在介导 *tet(X3)*水平转移中的作用目前尚无报道。【目的】以 *tet(X3)*阳性替加环素耐药鲍曼不动杆菌 34AB 为对象,探究不同抗菌药物对其外膜囊泡产量及主要生物学特性的影响。【方法】采用微量肉汤稀释法测定细菌药物敏感性,超速离心法提取细菌外膜囊泡,BCA 法测定外膜囊泡产量,使用马尔文纳米粒度电位仪测定外膜囊泡的粒径与电位,PCR 法(定性)及 RT-qPCR 法(定量)检测外膜囊泡中携带的 *tet(X3)* 基因。【结果】相较于无抗生素对照组[(0.64±0.04) mg/mL],在不同抗菌药物亚抑菌浓度(1/2 MIC 和 1/4 MIC)处理后,34AB 外膜囊泡的产量均有所增加,以头孢他啶[1/2 MIC, (2.83±0.57) mg/mL; 1/4 MIC, (2.38±0.29) mg/mL]和美罗培南[1/2 MIC, (2.19±0.11) mg/mL; 1/4 MIC, (1.96±0.37) mg/mL]作用最为显著($P<0.01$)。同时抗菌药物作用后,各组外膜囊泡粒径和电位均有所降低,而携带的 *tet(X3)*基因拷贝数均有所上升(2.80×10^4 – 2.63×10^7 copies/ μ L)。【结论】抗菌药物的临床应用可能会导致耐药细菌外膜囊泡产量及携带的耐药基因丰度增加,进而增强其作为水平基因转移载体传播耐药基因的风险。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 外膜囊泡; 替加环素; 耐药性; *tet(X3)*

资助项目: 国家自然科学基金(32102728); 江苏省农业科学院探索性颠覆性创新项目[ZX(21)1224]

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32102728) and the Exploration and Disruptive Innovation Projects of Jiangsu Academy of Agricultural Sciences [ZX(21)1224].

*Corresponding authors. E-mail: YU Meiling, yumeiling@gxu.edu.cn; LI Jun, lijunjaas@126.com

Received: 2023-06-27; Accepted: 2023-07-19; Published online: 2023-08-29

Antimicrobials affect the production and characteristics of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii*

LI Qianru^{1,2}, HE Tao², JI Xing², WEI Ruicheng², WANG Ran², YU Meiling^{*1}, LI Jun^{*2}

1 School of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 Key Laboratory of Agro-product Safety Risk Evaluation (Nanjing) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base, Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Antimicrobial resistance poses a huge threat to global health and economic development. Tigecycline is one of the important drugs for treating severe infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. However, the mobile resistance gene *tet(X3)*, which could mediate high-level tigecycline resistance, was discovered in 2019. Outer membrane vesicles have been recognized as a new route for horizontal gene transfer, while little is known about the role of outer membrane vesicles in the disseminating of *tet(X3)*. [Objective] To investigate the effects of different antimicrobials on the production and characteristics of outer membrane vesicles of *tet(X3)*-positive tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* strain 34AB. [Methods] The antimicrobial susceptibility was determined by the broth micro-dilution method. The bacterial outer membrane vesicles were extracted by ultracentrifugation. The protein concentration of the outer membrane vesicles was determined by the BCA method, and the size and potential tested by Zeta-sizer nano-ZS. The copy number of *tet(X3)* within the outer membrane vesicles was determined by RT-qPCR. [Results] Compared with the control group without antibiotic treatment [(0.64±0.04) mg/mL], antimicrobials at 1/2 MIC or 1/4 MIC increased the production of outer membrane vesicles, with the effects of ceftazidime [1/2 MIC, (2.83±0.57) mg/mL; 1/4 MIC, (2.38±0.29) mg/mL] and meropenem [1/2 MIC, (2.19±0.11) mg/mL; 1/4 MIC, (1.96±0.37) mg/mL] being the most significant ($P<0.01$). Meanwhile, the antimicrobial treatments decreased the size and potential of outer membrane vesicles and increased the copy number of *tet(X3)* (2.80×10^4 – 2.63×10^7 copies/ μ L). [Conclusion] The clinical application of antimicrobials may increase the production and the antimicrobial resistance gene abundance of outer membrane vesicles, thereby increasing the risk of them as vectors for disseminating of antimicrobial resistance genes.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; outer membrane vesicle; tigecycline; antimicrobial resistance; *tet(X3)*

细菌耐药性已经成为全球性公共卫生问题之一,给人类社会带来巨大的经济损失和健康隐患。据统计,目前全球每年至少 70 万人死于耐药性细菌感染相关疾病,如不立即采取应对措施,抗生素耐药性导致的死亡将会迅速增加^[1]。

到 2050 年,耐药性细菌每年可能导致 1 000 万人死亡,对经济的破坏相当于 2008 年的全球金融危机^[1]。2016 年 G20 峰会公报将细菌耐药与英国脱欧、气候变化、难民和恐怖主义一起列为影响世界经济的 5 项深远因素,成为当前各国关

注的一个世界性公共卫生问题。

替加环素、多粘菌素和美罗培南被视为医学临床治疗多重耐药革兰氏阴性菌感染的主要药物。然而近年来针对上述3种药物的高水平可转移耐药机制陆续被报道:如质粒介导的高水平替加环素耐药基因 *tet(X)* 变异体^[2-3]、多粘菌素耐药基因 *mcr*^[4]、碳青霉烯类耐药基因 *bla_{NDM}*^[5]等。其中替加环素是治疗多重耐药肠杆菌所致严重感染的有限药物之一,被世界卫生组织列为极其重要的抗菌药物,通过可逆地结合16S rRNA 基因来抑制细菌蛋白质合成,阻止 tRNA 进入核糖体的 A 位点,从而阻止肽链的延伸^[6]。然而,2019 年研究人员从动物和人体内分离的鲍曼不动杆菌中发现高水平可转移的替加环素耐药基因 *tet(X3)*,其位于 p34AB 质粒上,可编码一种黄素依赖的单加氧酶,在 NADPH、Mg²⁺以及 O₂ 存在的条件下,降解四环素类药物^[2]。

细菌在与抗生素的对抗过程中进化出多种耐药机制^[7-8]。耐药菌可以通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)传播其抗性基因^[9],水平基因转移的传统方式主要有三种:转化、转导和接合^[10]。近年研究发现,外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMV)可以作为水平基因转移载体,是一种新型的水平基因转移方式^[11]。外膜囊泡是由细菌自然分泌的球形纳米级结构(50–500 nm),外膜主要由脂多糖、肽聚糖、磷脂和膜蛋白成分组成,囊泡内腔含有周质蛋白、胞质组分和核酸等^[12]。已有多项研究表明外膜囊泡可以介导耐药基因在同一菌种或不同菌种间发生水平转移^[13-15],并且抗菌药物会影响外膜囊泡的产生过程^[16]。Bauwens 等^[17]发现,环丙沙星和丝裂霉素 C 能够大幅度刺激大肠埃希菌 O104:H4 和 大肠埃希菌 O157:H7 外膜囊泡的产生,磷霉素、美罗培南和多粘菌素 B 对外膜囊泡产量影响相对较小,而庆大霉素、利福昔

明、替加环素和阿奇霉素对外膜囊泡的产生无显著影响。Yun 等^[18]用亚胺培南、四环素分别刺激鲍曼不动杆菌 DU202,发现亚胺培南刺激后鲍曼不动杆菌外膜囊泡产量增加 2.2 倍,而四环素对外膜囊泡的产生无显著影响。多项研究证明不同抗生素对外膜囊泡产量的作用效果与机制均不相同^[19-20]。

目前外膜囊泡介导耐药基因转移已有多项研究,但是其在 *tet(X3)* 传播中的作用未见相关研究报道,本文以替加环素耐药鲍曼不动杆菌 34AB 为对象,探究不同抗菌药物亚抑菌浓度作用对其外膜囊泡产量与主要生物学特性的影响,以期为后续深入探究抗菌药物对外膜囊泡介导耐药基因水平转移的影响提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

猪源替加环素耐药 *tet(X3)* 阳性鲍曼不动杆菌 34AB 菌株和 大肠埃希菌 ATCC 25922 均由江苏省农业科学院农产品质量与安全营养研究所保藏。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 肉汤和 MH 肉汤(Mueller-Hinton broth),青岛海博生物技术公司;PBS 缓冲液(pH 7.4)和真空过滤器,白鲨生物科技有限公司;2×*Taq* Master Mix (Dye Plus)和 SYBR Green qPCR Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;DNase I 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;庆大霉素,兰杰柯科技有限公司;替加环素,上海阿拉丁生化科技有限公司;多粘菌素,北京索莱宝科技有限公司;丝裂霉素 C, GlpBio 公司;氯霉素、环丙沙星、美罗培南、利福昔明和 头孢他啶,上海麦克林生化科技有限公司。

超速冷冻离心机, Beckman 公司; Magellan

多功能酶标仪, Tecan 公司; 电子天平, 梅特勒托利多科技有限公司; 纳米粒度电位仪, Malvern 公司; 梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 超微量紫外可见分光光度计, NanoPhotometer 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗菌药物对鲍曼不动杆菌 34AB 的最小抑菌浓度测定

首先采用微量肉汤稀释法测定利福昔明、替加环素、头孢他啶、环丙沙星、美罗培南、氯霉素、多粘菌素、庆大霉素和丝裂霉素 C 等药物对鲍曼不动杆菌 34AB 的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)^[21]推荐的方法测定最小抑菌浓度, 使用大肠埃希菌 ATCC 25922 作为质控菌株。使用生长法制备菌液接种物, 将待测细菌培养至对数生长期(10^8 – 10^9 CFU/mL), 使用麦氏比浊管调至 0.5 麦氏比浊度(约为 1×10^8 CFU/mL), 再倍比稀释至 1×10^5 CFU/mL。准备无菌的 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 用 MH 肉汤稀释后的药物, 共设 17 个浓度梯度, 终浓度分别为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25、0.015 6、0.007 8 和 0.003 9 μ g/mL, 每孔再加入 100 μ L 待测菌液(1×10^5 CFU/mL), 同时设置阳性对照孔(含有 200 μ L 待测菌液)和阴性对照孔(含有 200 μ L MH 肉汤), 37 $^{\circ}$ C 静置培养 16–18 h 后读取结果。

1.2.2 亚抑菌浓度抗菌药压力下鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡的提取制备

根据鲍曼不动杆菌 34AB 对利福昔明、替加环素、头孢他啶、环丙沙星、美罗培南、氯霉素、多粘菌素、庆大霉素和丝裂霉素 C 的药物敏感性结果, 选取 1/2 MIC 和 1/4 MIC 两个亚抑菌药物浓度, 对鲍曼不动杆菌 34AB 进行诱导, 通过

超速离心法提取外膜囊泡。

将鲍曼不动杆菌 34AB 菌液培养至 OD_{600} 为 0.5, 培养体积为 250 mL, 此时分别加入上述抗菌药物, 使得终浓度为 1/2 MIC 或 1/4 MIC, 以 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 继续振荡培养 24 h。将培养后的菌液在 4 $^{\circ}$ C 条件下 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清用 0.22 μ m 真空过滤器过滤, 再在 4 $^{\circ}$ C 条件下以 35 000 r/min 超速离心 2 h。用 1 mL PBS 缓冲液重悬沉淀, 即得到粗提的外膜囊泡。采用 DNase I (2U) 酶解消化外膜囊泡外的 DNA, 得到纯化后的外膜囊泡, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。同时提取无抗生素作用下鲍曼不动杆菌 34AB 分泌的外膜囊泡作为对照。

1.2.3 鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡的产量测定

以蛋白含量作为外膜囊泡产量的指标^[14]。采用 BCA 法对鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡蛋白含量进行定量测定, 具体方法参照碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书。将 BSA 蛋白标准品用 PBS 稀释至 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL。将 BCA 试剂 A 与 BCA 试剂 B 以 50:1 (体积比) 混合均匀, 配制 BCA 工作液。将外膜囊泡样品分别稀释 5、10 和 20 倍, 每个稀释度做 3 个重复, 按照说明书步骤依次加样测定, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30 min 后采用酶标仪测定 562 nm 波长下的吸光度。根据酶标仪测定结果, 以蛋白浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制蛋白标准曲线。根据蛋白标准曲线计算各外膜囊泡样品蛋白浓度(mg/mL), 获得其产量数据。

1.2.4 鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡的粒径与电位测定

取各外膜囊泡样品 20 μ L 分别加在 1 mL PBS 缓冲液中, 充分混匀后采用纳米粒度电位仪测定外膜囊泡的粒径与电位, 基于动态光散射原理测定外膜囊泡的粒径大小, 根据相位分析光散

射测定电位数据。

1.2.5 鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡携带的 *tet(X3)* 的 PCR 定性检测

根据 BCA 蛋白浓度结果取 20 μg 各外膜囊泡样品, 采用水煮法粗提其基因组, 以提取的外膜囊泡 DNA 为模板, 采用引物 *tet(X3)*-F (5'-TGAACCTGGTAAGAAGAAGTG-3') 和 *tet(X3)*-R (5'-CAGACAATATCAAAGCATCCA-3') 进行 PCR 扩增, 预计扩增片段大小为 650 bp, 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。PCR 反应体系 (20 μL): 2 \times Taq Master Mix (Dye Plus) 10 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 10–100 ng, ddH₂O 补足 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。PCR 反应完成后, 将产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确认 PCR 扩增片段大小, 鉴定鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡是否携带 *tet(X3)* 基因。

1.2.6 鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡携带的 *tet(X3)* 的 RT-qPCR 定量检测

采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 绝对定量法对外膜囊泡携带的 *tet(X3)* 基因进行定量检测。使用 Primer Premier 5 设计并委托北京擎科生物科技有限公司合成荧光定量 PCR 引物 qPCR-F (5'-TTCAATGCTTGCCCAACAAGG-3') 和 qPCR-R (5'-ATGAGCAGCATCGCCAATC-3')。

委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成 *tet(X3)* 基因, 并将其连接到 pUC18 质粒, 构建重组质粒。使用超微量紫外可见分光光度计测定重组质粒 pUC18-*tet(X3)* 的浓度和纯度。根据以下公式计算质粒拷贝数: 质粒拷贝数 (copies/ μL) = 6.02×10^{23} (copies/mol) \times 质粒浓度 (g/ μL) / 质粒分子量 (g/mol)。将重组质粒 pUC18-*tet(X3)* 用 ddH₂O 进行 10 倍稀释, 连续稀释 8 个浓度梯度。

采用 20 μL 反应体系: 2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL , qPCR-F 及 qPCR-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , 重组质粒 DNA 模板 1 μL , ddH₂O 8.2 μL 。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。融解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。反应完成后得出每个质粒稀释样品所对应的 C_t 值。根据质粒的 8 个浓度梯度样品作为模板得出的 C_t 值, 以 \lg (拷贝数) 为横坐标, C_t 值为纵坐标, 绘制标准曲线。

以提取的各外膜囊泡样品 DNA 作为模板进行 RT-qPCR 反应。根据测得的 C_t 值以及绘制的标准曲线计算外膜囊泡中携带的 *tet(X3)* 基因拷贝数。

1.2.7 数据处理与分析

利用 GraphPad Prism v4.3 统计软件对试验得到的数据进行 *t* test (unpaired) 差异显著性分析。当 $P < 0.05$ 时表示差异显著, 当 $P < 0.01$ 时表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 鲍曼不动杆菌 34AB 的药物敏感性结果

采用微量肉汤稀释法测定 8 种临床常用抗菌药物及丝裂霉素 C 对鲍曼不动杆菌 34AB 的 MIC。结果显示, 根据 CLSI M100-S25 标准判定^[21], 质控菌株 ATCC 25922 对替加环素、头孢他啶、环丙沙星、美罗培南、氯霉素、多粘菌素和庆大霉素的 MIC 均在质控范围内 (利福昔明和丝裂霉素 C 暂无相关标准), 表明试验操作正确, 测定结果可靠。鲍曼不动杆菌 34AB 对替加环素和庆大霉素耐药, 而对头孢他啶、环丙沙星、美罗培南和多粘菌素等药物较为敏感 (表 1)。

表 1 抗菌药物对鲍曼不动杆菌 34AB 的 MIC 值
Table 1 The MICs of antimicrobials against *Acinetobacter baumannii* strain 34AB

Antimicrobials	MICs of bacterial strains ($\mu\text{g/mL}$)	
	Strain 34AB	Strain ATCC 25922
Rifaximin	2.000 0	32.000 0
Tigecycline	32.000 0	0.250 0
Ceftazidime	4.000 0	0.125 0
Ciprofloxacin	0.250 0	0.007 8
Meropenem	0.125 0	0.062 5
Chloramphenicol	16.000 0	4.000 0
Polymyxin	0.500 0	2.000 0
Gentamicin	256.000 0	0.250 0
Mitomycin C	8.000 0	32.000 0

2.2 不同抗菌药对鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡产量的影响

根据 BCA 结果得出各抗菌药物在 1/2 MIC 和 1/4 MIC 浓度下对鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡产量的影响, 结果如图 1 所示。由图 1 可见, 在抗菌药物处理后, 34AB 外膜囊泡的产量 [(0.65 \pm 0.03)–(2.83 \pm 0.57) mg/mL] 相较无抗生素

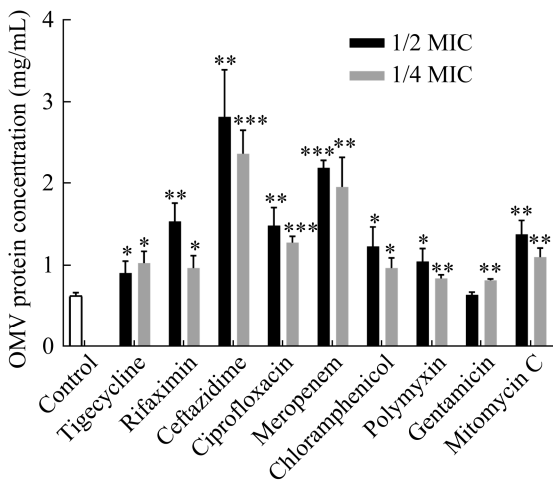


图 1 不同抗菌药物作用下鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡的产量

Figure 1 Effects of antimicrobials on the production of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii* strain 34AB. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

对照组 [(0.64 \pm 0.04) mg/mL] 均有所增加, 表明抗菌药物对鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡产量的影响可能与其耐药性无关。其中, 头孢他啶作用下 34AB 外膜囊泡产量最高, 1/2 MIC 浓度诱导条件下产量达到 (2.83 \pm 0.57) mg/mL, 1/4 MIC 浓度诱导条件下外膜囊泡产量达到 (2.38 \pm 0.29) mg/mL。其次为美罗培南, 外膜囊泡产量分别为 (2.19 \pm 0.11) mg/mL (1/2 MIC 条件) 和 (1.96 \pm 0.37) mg/mL (1/4 MIC 条件)。除替加环素和庆大霉素外, 其余抗菌药物 1/2 MIC 浓度作用下, 诱导外膜囊泡产量相比 1/4 MIC 条件下更高。

2.3 不同抗菌药对鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡粒径的影响

采用纳米粒度电位仪测定不同抗菌药作用下鲍曼不动杆菌 34AB 分泌的外膜囊泡的粒径 (图 2)。在无抗生素条件下, 鲍曼不动杆菌 34AB 自然分泌的 OMV 平均粒径为 (524.07 \pm 71.63) nm。在不同抗菌药作用下外膜囊泡粒径均减小 [(90.94 \pm 3.67)–(342.90 \pm 36.70) nm]。其中氯霉素作用最为显著, 氯霉素压力下产生的外膜囊泡平均

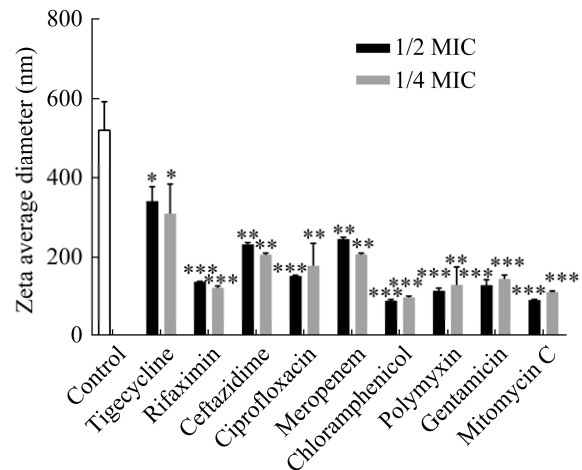


图 2 不同抗菌药物作用下鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡的粒径

Figure 2 Effects of antimicrobials on the size of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii* strain 34AB. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

粒径分别为(90.94±3.67) nm (1/2 MIC 条件)和(99.92±3.10) nm (1/4 MIC 条件)。对于替加环素、利福昔明、头孢他啶和美罗培南,上述药物 1/2 MIC 浓度作用下外膜囊泡粒径比 1/4 MIC 浓度作用下外膜囊泡粒径较大,而其他抗菌药则作用反之。

2.4 不同抗菌药对鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡电位的影响

采用纳米粒度电位仪测定不同抗菌药作用下鲍曼不动杆菌 34AB 分泌的外膜囊泡的电位(图 3)。在无抗菌药作用情况下,鲍曼不动杆菌 34AB 自然分泌的 OMV 平均电位为(-0.92±0.31) mV。在不同抗菌药作用下,外膜囊泡电位出现降低趋势。其中利福昔明作用后,外膜囊泡电位最低,分别为(-10.47±0.31) mV (1/2 MIC 条件)和(-10.72±1.71) mV (1/4 MIC 条件)。各药物相比,替加环素、利福昔明、头孢他啶、美罗培南和环丙沙星对外膜囊泡电位影响较大,氯霉素、多粘菌素、庆大霉素和丝裂霉

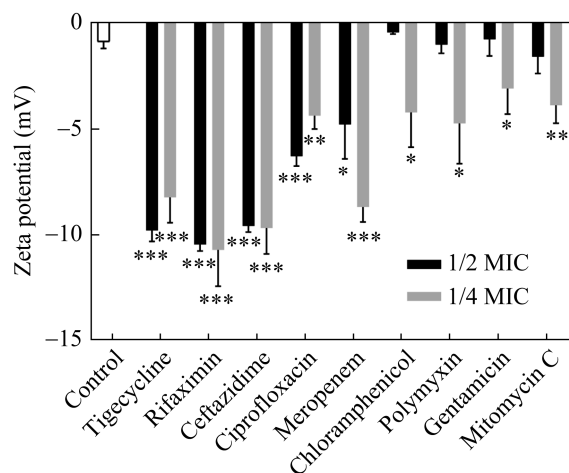


图 3 不同抗菌药物作用下鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡的电位

Figure 3 Effects of antimicrobials on the potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii* strain 34AB. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

素 C 在 1/2 MIC 浓度作用下对外膜囊泡电位影响相对较小。

2.5 鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡中携带 *tet(X3)* 基因

采用水煮法提取各外膜囊泡样品 DNA 后,采用 PCR 法鉴定是否携带 *tet(X3)* 基因。结果如图 4 所示,不同抗菌药亚抑菌浓度作用下,收集的鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡样品均扩增出阳性目的条带(650 bp),而阴性对照无条带,表明所有外膜囊泡样品均携带替加环素耐药基因 *tet(X3)*。

2.6 鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡中携带的 *tet(X3)* 基因拷贝数

通过公式计算得到重组质粒 pUC18-*tet(X3)* 拷贝数为 1.10×10^{10} copies/ μL , 将其倍比稀释,以不同浓度(1.10×10^{10} – 1.10×10^3 copies/ μL)的重组质粒作为模板进行 RT-qPCR 反应。以其 C_t 值为横坐标,拷贝数为纵坐标绘制标准曲线,计算得到标准曲线斜率公式为: $y = -3.3117x + 36.464$, $R^2 = 0.9922$, 说明扩增曲线各个稀释度相关性好,扩增效率达到要求,设计引物符合 RT-qPCR 要求。

以提取的外膜囊泡 DNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增,将测得的 C_t 值代入标准曲线公式,得到外膜囊泡中携带的 *tet(X3)* 拷贝数,结果如图 5 所示。无抗菌药物条件下,鲍曼不动杆菌 34AB 分泌的外膜囊泡中携带的 *tet(X3)* 基因丰度为 7.90×10^3 copies/ μL 。各抗菌药作用后,收集的鲍曼不动杆菌 34AB 外膜囊泡中携带的 *tet(X3)* 拷贝数均有所升高(2.80×10^4 – 2.63×10^7 copies/ μL)。其中美罗培南作用后,外膜囊泡中携带的 *tet(X3)* 拷贝数最高,分别为 6.30×10^8 copies/ μL (1/2 MIC 条件)和 2.50×10^8 copies/ μL (1/4 MIC 条件)。

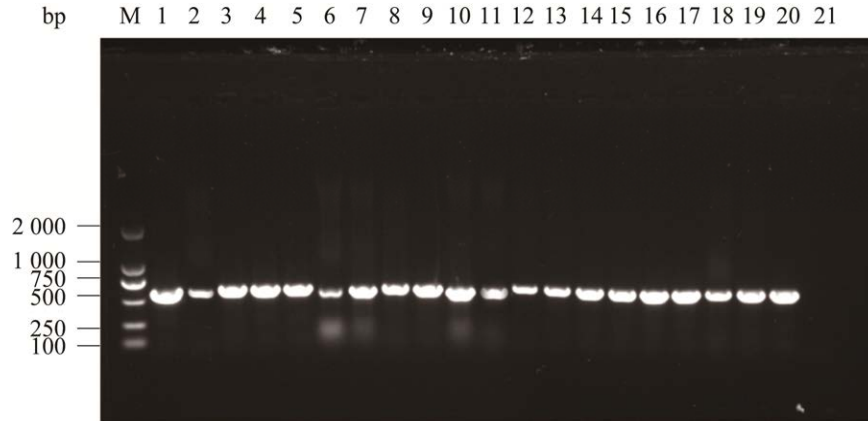


图4 PCR扩增鲍曼不动杆菌34AB外膜囊泡 $tet(X3)$ 基因的琼脂糖凝胶电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照p34AB质粒; 2: 不添加抗菌药物组外膜囊泡样品; 3: 利福昔明1/2 MIC; 4: 利福昔明1/4 MIC; 5: 替加环素1/2 MIC; 6: 替加环素1/4 MIC; 7: 头孢他啶1/2 MIC; 8: 头孢他啶1/4 MIC; 9: 环丙沙星1/2 MIC; 10: 环丙沙星1/4 MIC; 11: 美罗培南1/2 MIC; 12: 美罗培南1/4 MIC; 13: 氯霉素1/2 MIC; 14: 氯霉素1/4 MIC; 15: 多粘菌素1/2 MIC; 16: 多粘菌素1/4 MIC; 17: 庆大霉素1/2 MIC; 18: 庆大霉素1/4 MIC; 19: 丝裂霉素C 1/2 MIC; 20: 丝裂霉素C 1/4 MIC; 21: 阴性对照PBS

Figure 4 The agarose gel electrophoresis graph of PCR product of $tet(X3)$ carried by outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii* strain 34AB. M: DL2000 DNA Marker; 1: Positive control of p34AB; 2: The outer membrane vesicles without antimicrobials treatment; 3: 1/2 MIC of rifaximin; 4: 1/4 MIC of rifaximin; 5: 1/2 MIC of tigecycline; 6: 1/4 MIC of tigecycline; 7: 1/2 MIC of ceftazidime; 8: 1/4 MIC of ceftazidime; 9: 1/2 MIC of ciprofloxacin; 10: 1/4 MIC of ciprofloxacin; 11: 1/2 MIC of meropenem; 12: 1/4 MIC of meropenem; 13: 1/2 MIC of chloramphenicol; 14: 1/4 MIC of chloramphenicol; 15: 1/2 MIC of polymyxin; 16: 1/4 MIC of polymyxin; 17: 1/2 MIC of gentamicin; 18: 1/4 MIC of gentamicin; 19: 1/2 MIC of mitomycin C; 20: 1/4 MIC of mitomycin C; 21: Negative control of PBS.

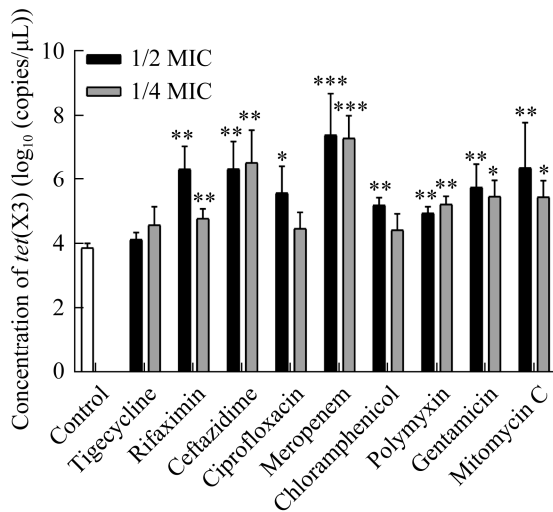


图5 不同抗菌药物作用下鲍曼不动杆菌34AB外膜囊泡携带的 $tet(X3)$ 基因拷贝数

Figure 5 Effects of antimicrobials on the copy number of $tet(X3)$ carried by outer membrane vesicles from *Acinetobacter baumannii* strain 34AB. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$.

3 讨论与结论

鲍曼不动杆菌是一种自然界广泛存在的条件致病菌,在医院环境中可长期存活,近年来多重耐药鲍曼不动杆菌检出率逐渐升高,是世界卫生组织确定的第一批亟待新抗生素的耐药细菌,危害极大^[22]。替加环素是目前用于治疗多重耐药鲍曼不动杆菌感染的重要药物,然而鲍曼不动杆菌的替加环素耐药株在世界范围内已有报道,并呈现上升趋势^[23]。

外膜囊泡是由细菌自然分泌产生的纳米级球形结构,已有多篇研究报道对鲍曼不动杆菌的外膜囊泡进行了分离纯化^[24-27]。例如, Rumbo等^[13]分离了两株鲍曼不动杆菌(pMMA2和pMMCU3)的外膜囊泡,产量分别为0.35 mg/mL与0.16 mg/mL,透射电镜显示外膜囊泡粒径大

小为 20–100 nm。Dhurve 等^[28]分离纯化了鲍曼不动杆菌 DS002 的外膜囊泡,透射电镜显示其直径大小为 74–160 nm。Yun 等^[18]对鲍曼不动杆菌 DU202 外膜囊泡进行分离纯化,产量为 300 mg/mL。由于菌株特性、培养条件、外膜囊泡提取制备方法,纯化方式,浓度与粒径测定方法的不同,不同文献报道的细菌外膜囊泡产量存在差异。

本研究发现鲍曼不动杆菌 34AB 在不同抗菌药亚抑菌浓度作用下产生的外膜囊泡产量存在显著差异,其中头孢他啶和美罗培南作用后外膜囊泡产量增加最为显著,其机制可能为 β -内酰胺类药物可直接干扰细菌肽聚糖层的合成,可能使细菌肽聚糖层与外膜层的交联减少,外膜相对过度延伸,进而形成外膜囊泡^[18]。庆大霉素(氨基糖苷类)与替加环素(四环素类)可与细菌 30S 亚基结合,抑制其蛋白质合成,还可结合到细菌外膜脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),改变 LPS 结构,破坏外膜稳定性,最终引起外膜囊泡释放^[29]。环丙沙星(喹诺酮类)可激活细菌的 SOS 应激反应,导致受损或折叠错误的蛋白质等代谢废物在胞质周围间隙中局部积累,并不断对外膜施加局部膨胀压力,最终外膜外凸形成外膜囊泡^[17,20]。多粘菌素(多肽类)可与多种革兰氏阴性菌表面 LPS 的脂质 A 结合,破坏细菌外膜结构的完整性,进而促进外膜囊泡释放^[30–31]。丝裂霉素 C 可激活细菌内前噬菌体,而前噬菌体编码的内溶素破坏细菌肽聚糖层,从而降低外膜稳定性,产生外膜囊泡^[32–34]。不同抗菌药物对细菌外膜囊泡产量的影响效果与作用机制均不相同。

外膜囊泡作为水平基因转移的载体的功能已经成为国内外的研究热点。近年来,多项研究表明外膜囊泡可携带并传播耐药基因^[11]。Li 等^[35]证明肺炎克雷伯菌外膜囊泡可同时携带毒力和耐药基因。Rumbo 等^[13]证明碳青霉烯类耐药基

因 bla_{OXA-24} 可通过外膜囊泡在鲍曼不动杆菌耐药菌与敏感菌之间转移。Chatterjee 等^[14]验证了外膜囊泡可介导 β -内酰胺类耐药基因 bla_{NDM-1} 同细菌种属与跨种属传播。Bielaszewska 等^[15]发现耐药基因 $bla_{CTX-M-15}$ 、 bla_{TEM-1} 可通过外膜囊泡由大肠埃希菌 O104:H4 传播到其他肠杆菌科成员。

本研究以替加环素耐药鲍曼不动杆菌 34AB 为研究对象,探究了不同抗菌药物对其外膜囊泡产量及主要生物学特性的影响。结果表明与无抗生素对照组相比,在不同抗菌药物处理后,34AB 外膜囊泡的产量均有所增加,粒径和电位均有所下降,而携带的高水平可转移替加环素耐药基因 $tet(X3)$ 拷贝数均有所上升,因此,极有可能增加了外膜囊泡作为水平基因转移载体传播耐药基因的风险。

REFERENCES

- [1] MCALLISTER TA, WANG YX, DIARRA MS, ALEXANDER T, STANFORD K. Challenges of a one-health approach to the development of alternatives to antibiotics[J]. *Animal Frontiers*, 2018, 8(2): 10-20.
- [2] HE T, WANG R, LIU DJ, WALSH TR, ZHANG R, LÜ Y, KE YB, JI QJ, WEI RC, LIU ZH, SHEN YB, WANG G, SUN LC, LEI L, LÜ ZQ, LI Y, PANG MD, WANG LY, SUN QL, FU YL, et al. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(9): 1450-1456.
- [3] SUN J, CHEN C, CUI CY, ZHANG Y, LIU X, CUI ZH, MA XY, FENG YJ, FANG LX, LIAN XL, ZHANG RM, TANG YZ, ZHANG KX, LIU HM, ZHUANG ZH, ZHOU SD, LÜ JN, DU H, HUANG B, YU FY, et al. Plasmid-encoded $tet(X)$ genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(9): 1457-1464.
- [4] LIU YY, WANG Y, WALSH TR, YI LX, ZHANG R, SPENCER J, DOI Y, TIAN GB, DONG BL, HUANG XH, YU LF, GU DX, REN HW, CHEN XJ, LÜ LC, HE DD, ZHOU HW, LIANG ZS, LIU JH, SHEN JZ. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance

- mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 161-168.
- [5] WALSH TR, WEEKS J, LIVERMORE DM, TOLEMAN MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11(5): 355-362.
- [6] YAGHOUBI S, ZEKIY AO, KRUTOVA M, GHOLAMI M, KOUHSARI E, SHOLEH M, GHAFOURI Z, MALEKI F. Tigecycline 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.
- [7] MUNITA JM, ARIAS CA. Mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(2): VMBF-0016-2015.
- [8] DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3): 417-433.
- [9] ARNOLD BJ, HUANG IT, HANAGE WP. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(4): 206-218.
- [10] SOUCY SM, HUANG JL, GOGARTEN JP. Horizontal gene transfer: building the web of life[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(8): 472-482.
- [11] DELL'ANNUNZIATA F, FOLLIERO V, GIUGLIANO R, de FILIPPIS A, SANTARCANGELO C, IZZO V, DAGLIA M, GALDIERO M, ARCIOLA CR, FRANCI G. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5985.
- [12] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(1): 13-24.
- [13] RUMBO C, FERNÁNDEZ-MOREIRA E, MERINO M, POZA M, MENDEZ JA, SOARES NC, MOSQUERA A, CHAVES F, BOU G. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(7): 3084-3090.
- [14] CHATTERJEE S, MONDAL A, MITRA S, BASU S. *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via outer membrane vesicles[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(8): 2201-2207.
- [15] BIELASZEWSKA M, DANIEL O, KARCH H, MELLMANN A. Dissemination of the bla_{CTX-M-15} gene among *Enterobacteriaceae* via outer membrane vesicles[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(9): 2442-2451.
- [16] 杨逸, 刘洋名, 魏亚鹿, 张正越, 秦金红, 蔡慕枫. 抗生素诱导革兰阴性菌外膜囊泡产生及发挥生理作用的机制[J]. *微生物与感染*, 2022, 17(2): 94-101.
- YANG Y, LIU YM, WEI YL, ZHANG ZY, QIN JH, CAI MF. Biogenesis and physiological functions of outer membrane vesicles triggered by antibiotics in gram-negative bacteria[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2022, 17(2): 94-101 (in Chinese).
- [17] BAUWENS A, KUNSMANN L, KARCH H, MELLMANN A, BIELASZEWSKA M. Antibiotic-mediated modulations of outer membrane vesicles in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(9): e00937-17.
- [18] YUN SH, PARK EC, LEE SY, LEE H, CHOI CW, YI YS, RO HJ, LEE JC, JUN SM, KIM HY, KIM GH, KIM SI. Antibiotic treatment modulates protein components of cytotoxic outer membrane vesicles of multidrug-resistant clinical strain, *Acinetobacter baumannii* DU202[J]. *Clinical Proteomics*, 2018, 15(1): 1-11.
- [19] KIM MH, KIM SY, SON JH, KIM SI, LEE H, KIM S, SHIN M, LEE JC. Production of membrane vesicles by *Enterococcus faecium* cultured with or without subinhibitory concentrations of antibiotics and their pathological effects on epithelial cells[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 295.
- [20] DEVOS S, van PUTTE W, VITSE J, van DRIESSCHE G, STREMERSCHE S, van den BROEK W, RAEMDONCK K, BRAECKMANS K, STAHLBERG H, KUDRYASHEV M, SAVVIDES SN, DEVREESE B. Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(10): 3930-3937.
- [21] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals[S]. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015.
- [22] LEE CR, LEE JH, PARK M, PARK KS, BAE IK, KIM YB, CHA CJ, JEONG BC, LEE SH. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic

- resistance mechanisms, and prospective treatment options[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 55.
- [23] SUN CL, YU YS, HUA XT. Resistance mechanisms of tigecycline in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1141490.
- [24] MOON DC, CHOI CH, LEE JH, CHOI CW, KIM HY, PARK JS, KIM SI, LEE JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein a modulates the biogenesis of outer membrane vesicles[J]. *The Journal of Microbiology*, 2012, 50(1): 155-160.
- [25] JHA C, GHOSH S, GAUTAM V, MALHOTRA P, RYA P. *In vitro* study of virulence potential of *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111: 218-224.
- [26] KWON SO, GHO YS, LEE JC, KIM SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 297(2): 150-156.
- [27] 张佳星, 何云燕, 孔春欢, 高睿. 鲍曼不动杆菌外膜囊泡的提取、纯化及活性检测[J]. *重庆医学*, 2017, 46(28): 3968-3970.
ZHANG JX, HE YY, KONG CH, GAO R. Extraction, purification and activity assay of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Chongqing Medicine*, 2017, 46(28): 3968-3970 (in Chinese).
- [28] DHURVE G, MADIKONDA AK, JAGANNADHAM MV, SIDDAVATTAM D. Outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii* DS002 are selectively enriched with TonB-dependent transporters and play a key role in iron acquisition[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0029322.
- [29] KADURUGAMUWA JL, BEVERIDGE TJ. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(14): 3998-4008.
- [30] JASIM R, HAN ML, ZHU Y, HU XH, HUSSEIN M, LIN YW, ZHOU QT, DONG C, LI J, VELKOV T. Lipidomic analysis of the outer membrane vesicles from paired polymyxin-susceptible and -resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(8): 2356.
- [31] HUSSEIN M, JASIM R, GOCOL H, BAKER M, THOMBARE VJ, ZIOGAS J, PUROHIT A, RAO GG, LI J, VELKOV T. Comparative proteomics of outer membrane vesicles from polymyxin-susceptible and extremely drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *mSphere*, 2023, 8(1): e0053722.
- [32] TOYOFUKU M, CÁRCAMO-OYARCE G, YAMAMOTO T, EISENSTEIN F, HSIAO CC, KUROSAWA M, GADEMANN K, PILHOFER M, NOMURA N, EBERL L. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 481.
- [33] KHARINA A, PODOLICH O, FAIDIUK I, ZAIKA S, HAIDAK A, KUKHARENKO O, ZAETS I, TOVKACH F, REVA O, KREMENSKOY M, KOZYROVSKA N. Temperate bacteriophages collected by outer membrane vesicles in *Komagataeibacter intermedius*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(4): 509-513.
- [34] CRISPIM JS, DIAS RS, LAGUARDIA CN, ARAÚJO LC, da SILVA JD, VIDIGAL PMP, de SOUSA MP, da SILVA CC, SANTANA MF, de PAULA SO. *Desulfovibrio alaskensis* prophages and their possible involvement in the horizontal transfer of genes by outer membrane vesicles[J]. *Gene*, 2019, 703: 50-57.
- [35] LI P, LUO WY, XIANG TX, JIANG YH, LIU P, WEI DD, FAN LP, HUANG SS, LIAO WJ, LIU Y, ZHANG W. Horizontal gene transfer via OMVs co-carrying virulence and antimicrobial-resistant genes is a novel way for the dissemination of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 945972.