

# abaR 基因对鲍氏不动杆菌生物膜形成的影响

郭海娜 向军



**【摘要】** 目的 检测鲍氏不动杆菌的耐药表型及 abaR 基因并探讨该基因对鲍氏不动杆菌生物膜形成的影响。方法 2014 年 2—7 月,从上海交通大学医学院附属瑞金医院临床微生物科收集到 159 株鲍氏不动杆菌,按收集顺序从 1 开始进行编号。(1)通过检测鲍氏不动杆菌 16S 核糖体 DNA 序列对上述 159 株鲍氏不动杆菌进行菌种鉴定,根据药物敏感试验结果挑选出泛耐药菌株和敏感菌株,记录其菌株数及其标本来源。(2)取鲍氏不动杆菌泛耐药菌株和敏感菌株,培养 12、24、48、72 h,通过噻唑蓝法测定鲍氏不动杆菌生物膜形成情况(以吸光度值表示)。(3)通过美国国家生物技术信息中心基因数据库进行基因序列分析鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 中 abaR 基因序列,并将其与嗜油不动杆菌 DR1 菌株的 LuxR 型受体 AqsR 基因序列进行比对。以鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 abaR 为目的基因序列,PCR 扩增 87 和 96 号鲍氏不动杆菌菌株并测序。将测序结果与鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 abaR 基因序列进行比对。(4)取 87 号和 96 号鲍氏不动杆菌菌株,每株细菌均分为 0.1% 二甲亚砜(DMSO)组、10  $\mu\text{mol/L}$  N-庚酰-L-高丝氨酸内酯(C7-HSL)组、10  $\mu\text{mol/L}$  N-(3-氢氧化十二酰基)-DL-高丝氨酸内酯(OH-dDHL)组、1% DMSO 组、100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 组、100  $\mu\text{mol/L}$  OH-dDHL 组,每组 3 孔,分别用对应终体积分数的 DMSO 或对应终物质的量浓度的 C7-HSL 和 OH-dDHL 处理。通过噻唑蓝法检测培养 12、24、48 h,87 号菌株和 96 号菌株的生物膜形式情况(以吸光度值表示)。对数据行析因设计方差分析、单因素方差分析、LSD 检验及 Bonferroni 校正。结果 (1)共收集 18 株泛耐药菌株和 5 株敏感菌株,其中泛耐药菌株主要分布于本院急诊 ICU、烧伤整形科,标本以痰液、血液及创面分泌物为主;敏感菌株来源分散,标本以痰液为主。(2)鲍氏不动杆菌泛耐药菌株培养各时相点吸光度值与敏感菌株相近( $P$  值均大于 0.05)。鲍氏不动杆菌泛耐药菌株培养 24 h 吸光度值均显著高于该类菌株培养 12、48、72 h( $P$  值均小于 0.01);鲍氏不动杆菌敏感菌株培养 24 h 吸光度值显著高于该类菌培养 12 h( $P < 0.01$ )。 (3)鲍氏不动杆菌中存在 LuxR 型受体 abaR 基因序列,与嗜油不动杆菌 DR1 菌株中的 LuxR 型受体 AqsR 相似度为 87%。87 号菌株及 96 号菌株中的 abaR 基因序列与鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 的相似度分别为 98%、99%。 (4)87 号菌株 0.1% DMSO 组培养各时相点吸光度值和 1% DMSO 组相近( $P$  值均大于 0.05)。96 号菌株 0.1% DMSO 组培养 12 h 吸光度值显著低于 1% DMSO 组( $P < 0.01$ ),培养 24 h 吸光度值显著高于 1% DMSO 组( $P < 0.01$ )。87 号菌株及 96 号菌株 10  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 组培养 24 h 吸光度值均显著低于各自对应的 0.1% DMSO 组( $P$  值均小于 0.01)。87 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 组培养各时相点吸光度值与 1% DMSO 组相近( $P$  值均大于 0.05),96 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 组培养 12 h 吸光度值显著低于 1% DMSO 组( $P < 0.01$ )。87 号菌株和 96 号菌株 10  $\mu\text{mol/L}$  OH-dDHL 组培养各时相点吸光度值与 0.1% DMSO 组相近( $P$  值均大于 0.05)。87 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  OH-dDHL 组培养各时相点吸光度值与 1% DMSO 组相近( $P$  值均大于 0.05)。96 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  OH-dDHL 组培养 12 h 吸光度值显著高于 1% DMSO 组( $P < 0.01$ )。87 号菌株及 96 号菌株 0.1% DMSO 组和 1% DMSO 组培养 24 h 吸光度值均显著高于培养 12、48 h( $P$  值均小于 0.01)。结论 鲍氏不动杆菌泛耐药菌株普遍存在。鲍氏不动杆菌中存在 abaR 基因,与生物膜形成相关。

**【关键词】** 鲍氏不动杆菌; 生物膜; 群体感应; 信号分子化合物

**基金项目:**上海市科学技术委员会自然科学基金(16ZR1420800)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.04.003

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形科(郭海娜现在郑州市第一人民医院烧伤科,450004)

通信作者:向军,Email:13801789791@163.com

**Influences of abaR gene on biofilm formation of *Acinetobacter baumannii*** Guo Haina, Xiang Jun.

Department of Burns and Plastic Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Corresponding author: Xiang Jun, Email: 13801789791@163.com

**[Abstract] Objective** To detect drug-resistant phenotype and abaR gene of *Acinetobacter baumannii* (AB) and investigate influences of abaR gene on biofilm formation of AB. **Methods** From February to July 2014, 159 strains AB were collected from Department of Clinical Microbiology of Ruijin Hospital of School of Medicine of Shanghai JiaoTong University and numbered starting from 1 according time when they were collected. (1) The above-mentioned 159 strains of AB were identified by detecting gene sequence of 16S ribosomal DNA. According to results of drug sensitivity test, extensively drug-resistant strains and sensitive strains of AB were selected and counted, and their sources were recorded. (2) Extensively drug-resistant strains and sensitive strains of AB were collected to measure biofilm formation (denoted as absorbance value) by methyl thiazolyl tetrazolium method when strains at culture hour 12, 24, 48 and 72. (3) The abaR gene sequence of ATCC 17978 of AB was analyzed through Gene banks of National Center for Biotechnology Information and compared with AqsR gene sequence of LuxR type receptor of *Acinetobacter oleivorans* DR1. No. 87 and No. 96 AB strains were amplified and sequenced by polymerase chain reaction according to target gene sequence of abaR of ATCC 17978 of AB. The sequencing result was compared with abaR gene sequence of ATCC 17978. (4) No. 87 and No. 96 AB strains were collected and divided into 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) group, 10  $\mu\text{mol/L}$  N-heptanoyl-L-Homoserine lactone (C7-HSL) group, 10  $\mu\text{mol/L}$  N-(3-Hydroxydodecanoyl)-DL-homoserine lactone (OH-ddHL) group, 1% DMSO group, 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL group, and 100  $\mu\text{mol/L}$  OH-ddHL, with 3 wells of each group. AB strains in the above groups were respectively dealt with DMSO of corresponding final volume fraction, C7-HSL and OH-ddHL of corresponding final amount-of-substance concentration. Biofilm formation (denoted as absorbance value) of AB was measured by methyl thiazolyl tetrazolium method at culture hour 12, 24, 48 and 72. Data were processed with analysis of variance of factorial design, one-way analysis of variance, LSD test and Bonferroni correction. **Results** (1) There were 18 extensively drug-resistant strains and 5 sensitive strains of AB. Samples of extensively drug-resistant strains were mainly collected from Emergency ICU and Department of Burns and Plastic Surgery of our hospital and were mainly from sputum, blood, and wound exudate. Samples of sensitive strains were collected dispersedly and were mainly from sputum. (2) Absorbance values of extensively drug-resistant strains and sensitive strains of AB at all culture time points were similar (with  $P$  values above 0.05). Absorbance value of extensively drug-resistant strains of AB at culture hour 24 was obviously higher than that of these strains at culture hour 12, 48, or 72 (with  $P$  values below 0.01). Absorbance value of sensitive strains of AB at culture hour 24 was obviously higher than that of these strains at culture hour 12 ( $P < 0.01$ ). (3) ABA gene sequence of LuxR type receptor existed in AB. Similarity ratio between abaR gene sequence and LuxR type receptor AqsR gene sequence in *Acinetobacter oleivorans* DR1 was 87%. Similarity ratios between abaR gene sequence of No. 87 and No. 96 strains and ATCC 17978 of AB were 98% and 99%, respectively. (4) Absorbance values of 0.1% DMSO group of No. 87 strain at all culture time points were similar to those of 1% DMSO group (with  $P$  values above 0.05). Absorbance value of 0.1% DMSO group of No. 96 strain at culture hour 12 was obviously lower than that of 1% DMSO group ( $P < 0.01$ ), while that at culture hour 24 was obviously lower than that of 1% DMSO group ( $P < 0.01$ ). Absorbance values of 10  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL group of No. 87 and No. 96 strains at culture hour 24 were obviously lower than those of 0.1% DMSO group (with  $P$  values below 0.01). Absorbance values of 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL group of No. 87 strain at all culture time points were similar to those of 1% DMSO group, respectively (with  $P$  values above 0.05). Absorbance value of 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL group of No. 96 strain at culture hour 12 was lower than that of 1% DMSO group ( $P < 0.01$ ). Absorbance values of 10  $\mu\text{mol/L}$  OH-ddHL group of No. 87 and No. 96 strains were similar to those of 0.1% DMSO group (with  $P$  values above 0.05). Absorbance values of 100  $\mu\text{mol/L}$  OH-ddHL group of No. 87 strain at all culture time points were similar to those of 1% DMSO group (with  $P$  values above 0.05). Absorbance value of 100  $\mu\text{mol/L}$  OH-ddHL group of No. 96 strain at culture hour 12 was obviously higher than that of 1% DMSO group ( $P < 0.01$ ). Absorbance values of 0.1% DMSO group and 1% DMSO group of No. 87 and No. 96 strains at culture hour 24 were obviously higher than those at culture hour 12 and 48 (with  $P$  values below 0.01). **Conclusions** Extensively drug-resistant strains of AB exist commonly. ABA gene exists in AB has relation with biofilm formation of AB.

**[Key words]** *Acinetobacter baumannii*; Biofilm; Quorum sensing; Signal molecules

**Fund program:** Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (16ZR1420800)

生物膜是鲍氏不动杆菌致病与耐药的重要因素之一<sup>[1]</sup>。研究表明,生物膜的形成过程受细菌群体感应(QS)系统的调控,由信号分子 N-酰基高丝氨酸内酯(AHL)介导的 LuxI/LuxR 家族在革兰阴性菌种 QS 系统中普遍存在<sup>[2]</sup>,调控生物膜形成等细菌群体生物学行为。在嗜油不动杆菌 DR1 菌株中存在 LuxR 同源基因 AqsR 影响其自身代谢、生物膜形成及生物膜形成相关的表面黏附蛋白的表达。鲍氏不动杆菌中 LuxI/LuxR 的同源基因被命名为 abaI/abaR<sup>[3]</sup>,但目前对 abaI/abaR 调控系统及 abaR 的研究较少。本研究通过观察鲍氏不动杆菌临床菌株生物膜形成特点及信号分子化合物 N-庚酰-L-高丝氨酸内酯(C7-HSL)、N-(3-氢氧化十二酰基)-DL-高丝氨酸内酯(OH-dDHL)对其生物膜形成的影响,探讨 abaR 在鲍氏不动杆菌生物膜形成中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料来源

2014 年 2—7 月,从上海交通大学医学院附属瑞金医院临床微生物科收集到 159 株鲍氏不动杆菌,其标准菌株 ATCC 19606 购自上海三踏生物科技有限公司。信号分子化合物 C7-HSL 购自美国 Santa Cruz 公司,OH-dDHL 购自英国 Abcam 公司。ELX800 型全自动酶标仪购自美国 BioTek 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌株耐药表型及来源** 将上述收集到的 159 株鲍氏不动杆菌,按收集顺序从 1 开始编号,将其接种于麦康凯琼脂平板上,37 °C 孵育过夜。挑取单个菌落进行分离纯化并剔除重复菌株(1 周内同一患者同一部位检出的同种菌株)。通过检测鲍氏不动杆菌 16S 核糖体 DNA 序列对其进行菌种鉴定。根据药物敏感试验结果挑选出对除替加环素、多黏菌素外,对其他抗生素全部耐药的菌株,即泛耐药菌株;及对所有抗生素敏感或对 1 种抗生素显示中介/耐药的菌株,即敏感菌株。上述菌株保种后均于 -80 °C 冻存。记录泛耐药菌和敏感菌的菌株数及其标本来源。

**1.2.2 鲍氏不动杆菌生物膜形成情况** 将鲍氏不动杆菌泛耐药菌株和敏感菌株以 1:100 的比例接种于 LB 液体培养基中进行过夜复苏培养,并将其浓度调至  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL。将上述菌液依次加至 96 孔板中,每个菌株 3 孔,每孔 200  $\mu$ L,培养 12、24、48、72 h,每孔加入 200  $\mu$ L PBS 洗涤,共洗涤 3 次。每孔加入 10  $\mu$ L 质量浓度为 5 mg/mL 噻唑蓝溶液,

37 °C 避光培养 3 h,同前用 PBS 洗涤 3 次。加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min。检测鲍氏不动杆菌生物膜形成情况(以 490 nm 波长处的吸光度值表示)。

**1.2.3 鲍氏不动杆菌 abaR 基因检测** 根据文献报道的鲍氏不动杆菌 QS 系统 LuxI/LuxR 家族中 LuxR 型受体的基因序列信息,通过美国国家生物技术信息中心基因数据库的进行序列查询比对,分析鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 中 abaR 基因序列,并将 ATCC 17978 abaR 基因与嗜油不动杆菌 DR1 菌株的 LuxR 型受体 AqsR 进行比对。从 23 株临床菌株中选取对氨苄西林、卡那霉素、链霉素及四环素均敏感,生物膜形成较稳定,细菌游走表型明显,质粒转入后抗性标记基因表达阳性的 87 号菌株和 96 号菌株。以鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 中的 abaR 为目的的基因序列,通过 Primer Premier 5.0 软件(加拿大 Premier 公司)设计 abaR 基因引物,PCR 扩增 87 和 96 号菌株进行测序并与鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 abaR 基因序列进行比对。

**1.2.4 信号分子化合物 C7-HSL 和 OH-dDHL 对鲍氏不动杆菌生物膜形成的影响** 取 87 号菌株和 96 号菌株菌液于 96 孔板中,按随机数字表法将每株细菌均分为 0.1% DMSO 组、10  $\mu$ mol/L C7-HSL 组、10  $\mu$ mol/L OH-dDHL 组、1% DMSO 组、100  $\mu$ mol/L C7-HSL 组、100  $\mu$ mol/L OH-dDHL 组,每组各 3 孔,分别用对应终体积分数的 DMSO 或对应终物质的量浓度的 C7-HSL 和 OH-dDHL 进行处理,每组终体积均为 200  $\mu$ L。同 1.2.2 通过噻唑蓝法测定培养 12、24、48 h,87 号菌株和 96 号菌株的生物膜形成情况(以 490 nm 波长处的吸光度值表示)。

### 1.3 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 22.0 统计软件行析因设计方差分析、单因素方差分析、LSD 检验(软件自动略去该统计量值)并进行 Bonferroni 校正。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 鲍氏不动杆菌临床分离菌株耐药表型及来源

本研究共收集到 18 株泛耐药菌株及 5 株敏感菌株。其中,泛耐药菌株检出比例达 11.3%,主要分布于本院急诊 ICU、烧伤整形科,而敏感菌株分布较分散。本次收集到的泛耐药菌株以痰液、血液及创面分泌物来源为主,而敏感菌株则以痰液来源为主。见表 1。

**表 1** 鲍氏不动杆菌泛耐药菌株和敏感菌株来源分布情况

菌株耐药表型及编号	菌株数 (株)	来源科室	标本种类
泛耐药菌株	18		
3		烧伤整形科	创面分泌物
10		烧伤整形科	血液
12		烧伤整形科	创面分泌物
36		烧伤整形科	创面分泌物
23		外科 ICU	—
25		急诊 ICU	血液
26		急诊 ICU	引流液
27		外科 ICU	痰液
52		胸外科	痰液
58		移植一病区	血液
71		外科 ICU	深静脉导管附着物
73		急诊 ICU	—
106		急诊 ICU	引流液
115		外科 ICU	咽拭子
118		神经内科	痰液
139		神经内科	痰液
158		烧伤整形科	创面分泌物
159		烧伤整形科	血液
敏感菌株	5		
87		骨髓移植病区	痰液
96		感染科	痰液
125		神经内科	痰液
151		急诊 ICU	咽拭子
154		泌尿外科	中段尿

注：“—”表示标本标记为分泌物,但具体不明

### 2.2 鲍氏不动杆菌生物膜形成情况

鲍氏不动杆菌泛耐药菌株培养各时相点吸光度值与敏感菌株相近 ( $P$  值均大于 0.05)。鲍氏不动杆菌泛耐药菌株培养 24 h 吸光度值均显著高于该类菌培养 12、48、72 h ( $P$  值均小于 0.01);敏感菌株培养 24 h 吸光度值显著高于该类菌培养 12 h ( $P < 0.01$ ), 但与该类菌培养 48、72 h 相近 ( $P$  值均大于 0.05)。见表 2。

### 2.3 鲍氏不动杆菌 abaR 基因情况

鲍氏不动杆菌中存在 LuxR 型分子受体 abaR 基因序列。abaR (A1S\_0111) 位于 abaI (A1S\_0109) 基因下游 1 255 bp 处, 长约 717 bp, 与嗜油不动杆菌 DR1 菌株中的 LuxR 型受体 AqsR (716 bp) 相似度为

87%。鲍氏不动杆菌 87 号菌株及 96 号菌株中的 abaR 基因序列与鲍氏不动杆菌 ATCC 17978 的相似度分别为 98%、99%。

### 2.4 信号分子化合物 C7-HSL 和 OH-dDHL 对鲍氏不动杆菌生物膜形成的影响

87 号菌株 0.1% DMSO 组培养各时相点吸光度值和 1% DMSO 组相近 ( $P$  值均大于 0.05)。96 号菌株 0.1% DMSO 组培养 12 h 吸光度值显著低于 1% DMSO 组 ( $P < 0.01$ ), 培养 24 h 吸光度值显著高于 1% DMSO 组 ( $P < 0.01$ ), 培养 48 h 吸光度值与 1% DMSO 组相近 ( $P > 0.05$ )。87 号菌株及 96 号菌株 10  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 组培养 24 h 吸光度值均显著低于各自对应的 0.1% DMSO 组 ( $P$  值均小于 0.01), 其余各时相点吸光度值与各自对应的 0.1% DMSO 组相近 ( $P$  值均大于 0.05)。87 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 组培养各时相点吸光度值与 1% DMSO 组相近 ( $P$  值均大于 0.05); 96 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 组培养 12 h 吸光度值显著低于 1% DMSO 组 ( $P < 0.01$ ), 其余各时相点吸光度值与 1% DMSO 组相近 ( $P$  值均大于 0.05)。87 号菌株和 96 号菌株 10  $\mu\text{mol/L}$  OH-dDHL 组培养各时相点吸光度值与各自对应的 0.1% DMSO 组相近 ( $P$  值均大于 0.05)。87 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  OH-dDHL 组培养各时相点吸光度值与 1% DMSO 组相近 ( $P$  值均大于 0.05)。96 号菌株 100  $\mu\text{mol/L}$  OH-dDHL 组培养 12 h 吸光度值显著高于 1% DMSO 组 ( $P < 0.01$ ), 其余时相点吸光度值与 1% DMSO 组相近 ( $P$  值均大于 0.05)。87 号菌株及 96 号菌株 0.1% DMSO 组和 1% DMSO 组培养 24 h 吸光度值均显著高于培养 12、48 h ( $P$  值均小于 0.01)。见表 3。

### 3 讨论

鲍氏不动杆菌是近年来医院内感染的主要条件致病菌, 耐药现象比较普遍<sup>[4-5]</sup>。与此一致的是, 本次收集的泛耐药鲍氏不动杆菌检出比例达 11.3%。从菌株分布情况可知, 泛耐药菌株分布有明显倾向性, 可能与患者免疫力及病房环境等因素有关。

研究表明, 鲍氏不动杆菌生物膜在其致病、耐药

**表 2** 鲍氏不动杆菌泛耐药菌株及敏感菌株各时相点生物膜形成情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

菌株种类	菌株数 (株)	培养 12 h	培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h	F 值	P 值
泛耐药菌株	18	0.47 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.35	0.55 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	16.856	< 0.01
敏感菌株	5	0.36 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.21	0.72 $\pm$ 0.24	0.68 $\pm$ 0.25	7.470	< 0.01

注: F 值、P 值分别为泛耐药菌株和敏感菌株培养各时相点总体比较所得; 分组因素主效应,  $F = 0.108$ ,  $P > 0.05$ ; 时间因素主效应,  $F = 26.443$ ,  $P < 0.01$ ; 两者交互作用,  $F = 9.457$ ,  $P < 0.01$ ; 与菌株内培养 24 h 比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

表 3 鲍氏不动杆菌 87 号菌株和 96 号菌株各时相点生物膜形成情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

菌株及组别	样本数(孔)	培养 12 h	培养 24 h	培养 48 h	$F_3$ 值	$P_3$ 值
87 号菌株	18					
0.1% DMSO 组		0.240 ± 0.087 <sup>a</sup>	0.708 ± 0.158	0.383 ± 0.062 <sup>a</sup>	14.190	<0.01
10 μmol/L C7-HSL 组		0.249 ± 0.087	0.312 ± 0.036 <sup>b</sup>	0.290 ± 0.024	0.964	>0.05
10 μmol/L OH-dDHL 组		0.174 ± 0.037	0.621 ± 0.085	0.407 ± 0.006	51.527	<0.01
1% DMSO 组		0.169 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.578 ± 0.201	0.403 ± 0.089 <sup>a</sup>	7.840	<0.05
100 μmol/L C7-HSL 组		0.180 ± 0.038	0.475 ± 0.053	0.444 ± 0.103	16.134	<0.01
100 μmol/L OH-dDHL 组		0.388 ± 0.210	0.679 ± 0.048	0.442 ± 0.092	3.943	>0.05
96 号菌株	18					
0.1% DMSO 组		0.176 ± 0.003 <sup>a</sup>	1.506 ± 0.050	0.657 ± 0.169 <sup>a</sup>	131.170	<0.01
10 μmol/L C7-HSL 组		0.147 ± 0.010	0.578 ± 0.305 <sup>b</sup>	0.409 ± 0.069	4.324	>0.05
10 μmol/L OH-dDHL 组		0.271 ± 0.077	1.425 ± 0.356	0.552 ± 0.151	20.975	<0.01
1% DMSO 组		0.495 ± 0.076 <sup>ab</sup>	0.924 ± 0.232 <sup>b</sup>	0.488 ± 0.092 <sup>a</sup>	8.226	<0.05
100 μmol/L C7-HSL 组		0.142 ± 0.022 <sup>c</sup>	0.849 ± 0.337	0.361 ± 0.046	10.084	<0.05
100 μmol/L OH-dDHL 组		0.780 ± 0.231 <sup>c</sup>	1.333 ± 0.228	0.524 ± 0.076	13.821	<0.01
$F_1$ 值		2.013	4.963	1.836		
$P_1$ 值		>0.05	0.01	>0.05		
$F_2$ 值		17.790	5.620	2.770		
$P_2$ 值		<0.01	<0.01	>0.05		

注: DMSO 为二甲基亚砜, C7-HSL 为 N-庚酰-L-高丝氨酸内酯, OH-dDHL 为 N-(3-氢氧化十二酰基)-DL-高丝氨酸内酯;  $F_1$  值、 $P_1$  值、 $F_2$  值、 $P_2$  值分别为 87 号菌株和 96 号菌株组间各时相点总体比较所得;  $F_3$  值、 $P_3$  值分别为组内各时相点总体比较所得; 87 号菌株各组处理因素主效应,  $F = 5.148, P < 0.01$ ; 时间因素主效应,  $F = 50.865, P < 0.01$ ; 两者交互作用,  $F = 2.419, P = 0.02$ ; 96 号菌株各组处理因素主效应,  $F = 13.769, P < 0.01$ ; 时间因素主效应,  $F = 66.868, P < 0.01$ ; 两者交互作用,  $F = 2.820, P = 0.01$ ; 与组内培养 24 h 比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 2 株菌各自对应的 0.1% DMSO 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 2 株菌各自对应的 1% DMSO 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$

中发挥重要作用<sup>[1]</sup>, 噻唑蓝法可通过检测生物膜内活菌数量, 间接反映该细菌生物膜形成情况。本研究通过噻唑蓝法对临床收集的鲍氏不动杆菌菌株进行不同时相点生物膜形成分析。结果表明, 无论泛耐药菌株还是敏感菌株, 其在培养 24 h 生物膜形成均比 12 h 明显, 24 h 后由于耐药表型不同生物膜形成随时相点变化趋势不同。泛耐药菌株在培养 24 ~ 48 h, 生物膜形成逐渐达到稳定水平; 由于生物膜内微环境改变, 生物膜内细菌数量达到峰值后不再增加。随着生物膜裂解、播散, 部分生物膜内细菌重新成为游离细菌, 生物膜内细菌数量相对下降。敏感菌株微环境改变及生物膜形成达到稳态所需时间可能滞后于泛耐药菌株, 因此, 培养 24 h 后生物膜内细菌数量随时相点变化相差不大。本实验中泛耐药菌株与敏感菌株生物膜形成情况差异不明显, 但同一耐药表型不同菌株间生物膜形成情况可能不同。

QS 系统是细菌通过信号交流, 感应细菌群体密度, 进而协调包括生物膜形成在内的细菌群体生物学行为的重要方式, 而 LuxI/LuxR 家族是革兰阴性菌 QS 系统的重要调控基因<sup>[2]</sup>。细菌通过 LuxI 产生信号分子 AHL, AHL 与信号分子受体 LuxR 结合后调控细菌群体的生理功能及生物学行为<sup>[6]</sup>。相较其他革兰阴性菌<sup>[6]</sup>, 鲍氏不动杆菌 QS 系统的研究起

步较晚, 且目前的研究多集中于 LuxI 及其分泌的信号分子等方面, 针对集信号分子受体及转录调控因子于一身的 LuxR 的报道较少。本研究借助于 NCBI 基因数据库证实了鲍氏不动杆菌 QS 系统中存在 *abaR* 基因, 且 *abaR* 基因与已报道的嗜油不动杆菌 DR1 菌株中的 LuxR 型受体 AqsR 基因序列 (716 bp) 相似度为 87%<sup>[7]</sup>。*abaR* 基因究竟在 QS 系统中发挥什么作用, 对鲍氏不动杆菌生物膜形成又有什么影响尚不清楚。因此, 笔者通过信号分子化合物 C7-HSL、OH-dDHL 初步探究鲍氏不动杆菌 *abaR* 基因对生物膜形成的影响。

信号分子构型可以影响受体蛋白活性, 针对鲍氏不动杆菌的研究表明, AHL 酰基侧链含有芳香基团时可以对信号分子受体活性表现出明显的拮抗作用, 侧链无环的短链信号分子对受体活性也具有一定的抑制作用<sup>[8-9]</sup>。C7-HSL 是 Zhu 等<sup>[10]</sup>最早报道的对根癌农杆菌信号受体 TraR 蛋白具有拮抗作用的信号分子化合物, 其对鲍氏不动杆菌 *abaR* 基因也具有拮抗作用, 是目前已知的对革兰阴性菌 AHL 信号分子受体 LuxR 活性具有拮抗作用的信号分子。而 OH-dDHL 是已报道的鲍氏不动杆菌自身分泌的正反馈信号分子, 通过激活 *abaR* 基因的表达, 启动 *abaR* 基因下游的转录调控功能<sup>[11]</sup>。但上述研究都

是在 *abaI* 基因敲除菌株的基础上进行的,对临床菌株是否具有相同的作用尚不清楚<sup>[12]</sup>。为此,本研究设置了不同物质的量浓度的 C7-HSL 和 OH-dDHL,观察其对鲍氏不动杆菌临床分离菌株生物膜形成的影响。

研究结果显示,87 号菌株 0.1% DMSO 组和 1% DMSO 组培养各时相点吸光度值相近,可初步认为 DMSO 的体积分数不影响细菌生长;但 96 号菌株 0.1% DMSO 组和 1% DMSO 组部分时相点吸光度值差异较大,可能是实验操作误差所致。此外,加入 10  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 可以降低 87 号菌株和 96 号菌株培养 24 h 的吸光度值,而 100  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 加入后使得 96 号菌株在培养 12 h 的吸光度值降低,同样物质的量浓度的 OH-dDHL 使其在培养 12 h 的吸光度值升高。上述结果表明,10  $\mu\text{mol/L}$  C7-HSL 对鲍氏不动杆菌临床菌株生物膜形成具有明显抑制作用,100  $\mu\text{mol/L}$  的 C7-HSL 刺激可能改变了鲍氏不动杆菌临床菌株生物膜的形成特性,12 h 时即可抑制生物膜形成,但存在菌株个体差异。结合已有研究结果<sup>[9-11]</sup>推测,C7-HSL 表现出的抑制作用可能是 C7-HSL 和自身分泌的信号分子竞争性结合 *abaR* 蛋白 N-末端 AHL 调控结合域后引起的构象改变,影响 *abaR* 蛋白活性。在 100  $\mu\text{mol/L}$  的 OH-dDHL 刺激下,与各自对应的 DMSO 组比,96 号菌株在培养 12 h 生物膜形成能力增强,87 号菌株生物膜形成无明显变化,此现象提示不同菌株对 AHL 敏感性识别有差异,也可能与实验设计的浓度梯度范围较局限有关,也可能是外源性 OH-dDHL 的量不足以干扰 87 号菌株细菌信号系统表达。下一步可进一步扩大浓度范围,明确 OH-dDHL 的优势效价浓度。

笔者课题组正在进行鲍氏不动杆菌 *abaR* 基因敲除系统的构建工作,从而进一步探究 *abaR* 的转录调控功能,明确 *abaR* 基因的下游靶向调控基因。本次实验选取的 2 种浓度的 C7-HSL 可以考虑作为鲍氏不动杆菌临床菌株信号分子受体拮抗剂,应用于后期对信号分子受体 *abaR* 的功能研究中。同时,本研究结果提示,合适的信号分子拮抗剂通过抑制生物膜形成,使得原本应处于生物膜保护下的生物膜内菌变成了游离状态的细菌,而这种微环境的改变将有利于提升抗生素的杀菌效应,本课题组将在后续研究中进一步验证这一现象。

## 参考文献

- [1] Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78(3): 510-543. DOI:10.1128/MMBR.00013-14.
- [2] Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2008, 10:145-167. DOI:10.1146/annurev.bieng.10.061807.160536.
- [3] Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2010, 36(4): 349-360. DOI: 10.3109/1040841X.2010.512269.
- [4] Guo H, Qin J, Xiang J. Surveillance for and susceptibility of *Acinetobacter baumannii* in a large hospital and burn center in Shanghai, China, 2007-2013 [J]. *Am J Infect Control*, 2016, 44(12):1718-1719. DOI: 10.1016/j.ajic.2016.06.014.
- [5] Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections [J]. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8(12): 751-762. DOI: 10.1016/S1473-3099(08)70279-2.
- [6] 陈征, 向军. 革兰阴性菌群群体感应系统中 LuxR 家族蛋白的研究进展 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(9): 536-538. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.09.005.
- [7] Kim J, Park W. Identification and characterization of genes regulated by AqsR, a LuxR-type regulator in *Acinetobacter oleivorans* DR1 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(15): 6967-6978. DOI: 10.1007/s00253-013-5006-7.
- [8] Stacy DM, Welsh MA, Rather PN, et al. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native N-Acyl homoserine lactones [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(10): 1719-1728. DOI: 10.1021/cb300351x.
- [9] Stacy DM, Le Quement ST, Hansen CL, et al. Synthesis and biological evaluation of triazole-containing N-acyl homoserine lactones as quorum sensing modulators [J]. *Org Biomol Chem*, 2013, 11(6): 938-954. DOI: 10.1039/c2ob27155a.
- [10] Zhu J, Beaver JW, Moré MI, et al. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(20):5398-5405.
- [11] Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, et al. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(9): 3386-3392. DOI: 10.1128/JB.01929-07.
- [12] Geske GD, O'Neill JC, Miller DM, et al. Comparative analyses of N-acylated homoserine lactones reveal unique structural features that dictate their ability to activate or inhibit quorum sensing [J]. *ChemBiochem*, 2008, 9(3): 389-400. DOI: 10.1002/cbic.200700551.

(收稿日期:2017-02-05)

(本文编辑:牟乾静)

## 本文引用格式

郭海娜, 向军. *abaR* 基因对鲍氏不动杆菌生物膜形成的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33(4): 200-205. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.04.003.

Guo HN, Xiang J. Influences of *abaR* gene on biofilm formation of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Chin J Burns*, 2017, 33(4): 200-205. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.04.003.