

红谷霉素对细菌耐药性质粒转移的抑制作用*

黎循航 薛秀园 张慧雯 武琳 倪国荣 涂国全**

(江西农业大学生物科学与工程学院 南昌 330045)

摘要 以*Shigella flexneri* D15 R-plasmid Cm^R 和*Escherichia coli* 1485 Rif^R 为试验菌株,研究红谷霉素对细菌耐药性质粒在细菌之间转移的抑制作用及对两种细菌R质粒的消除作用.将红谷霉素(30 $\mu\text{g/mL}$)与*S. flexneri* D15 R-plasmid Cm^R 和*E. coli* 1485 Rif^R 按实验设计混合并分别培养24 h和48 h,涂布在麦康凯琼脂平板上,计算相应菌落数.结果表明,当红谷霉素抑菌浓度为30 $\mu\text{g/mL}$ 时,对细菌耐氯霉素的R质粒的转移抑制率分别达到92.82%(24 h培养)和96.04%(48 h培养),但对R质粒的消除作用不显著.说明红谷霉素对R质粒转移抑制作用强烈但不具有R质粒的消除作用.图1 表1 参21

关键词 红谷霉素; R质粒; 细菌耐药性; 质粒转移

CLC Q933 : R96

Inhibition Effect of Honggumycin on Drug Resistance R Plasmid Transfer Between Bacteria*

LI Xunhang, XUE Xiuyuan, ZHANG Huiwen, WU Lin, NI Guorong & TU Guoquan**

(College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang, 330045, China)

Abstract *Shigella flexneri* D15 R-plasmid Cm^R and *Escherichia coli* 1485 Rif^R were used to investigate the possible inhibition influence of Honggumycin on conjugative drug resistance R plasmid transfer between bacteria and elimination of R plasmid from the objective bacteria. 30 $\mu\text{g/mL}$ of Honggumycin was mixed with *S. flexneri* D15 R-plasmid Cm^R or *E. coli* 1485 Rif^R , which were separately cultured for 24 h and 48 h on MacConkey agar with or without chloromycetin. The inhibition rate and elimination rate of R plasmid were calculated according to the number of colonies from test group and control group. The results indicated that the transfer rate of R plasmid reached 92.82% and 96.04% in the medium with 30 $\mu\text{g/mL}$ of Honggumycin for 24 h and 48 h, respectively. Besides, there was no significant effect of Honggumycin on elimination of R plasmid from *S. flexneri* D15 R-plasmid Cm^R . Therefore, Honggumycin could effectively inhibit conjugative R plasmid transfer from *S. flexneri* D15 R-plasmid Cm^R to *E. coli* 1485 Rif^R and was impossible to eliminate R plasmid. Fig 1, Tab 1, Ref 21

Keywords Honggumycin; R plasmid; drug resistance of bacterium; plasmid transfer

CLC Q933 : R96

细菌耐药性已成为21世纪全球关注的热点,临床上发现福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)具有大量的耐药和多耐药菌株,其中一些对95%以上的抗生素具有耐药性^[1~2].细菌耐药的机理十分复杂,大量研究表明耐药的机理从基因水平上主要分两类:细菌本身固有特性和后天获得^[3~4].前者是一种细菌的进化现象,耐药基因存在于其染色体上;后者是基因

突变或由R质粒引进新的基因.R质粒是细菌内染色体外具有独立复制能力的对细菌生存非必需的小型共价闭环状双链DNA分子,其上携带的耐药基因通过接合传递、转导和转化方式赋予其它细菌耐药性^[5~7].Mark A. Toleman等发现整合子I型中*orf513*基因能够调控抗生素抗性基因^[8].因此破坏R质粒、抑制和阻断R质粒的接合传递可以从根本上控制细菌耐药性的产生和蔓延.近几十年,国内外学者在这方面的研究主要集中于消除R质粒逆转细菌耐药性^[9~15].红谷霉素^[16]是本实验室发现的一种新型抗生素,试验表明细菌对红谷霉素的耐药性很低,而耐药性低的内在机制的探索尚未有报道.本研究即报道红谷霉素抑制*Shigella flexneri* D15 R-plasmid Cm^R

收稿日期: 2011-03-05 接受日期: 2011-03-29

*国家自然科学基金项目(No. 31071724)和江西省自然科学基金项目(No. 2010GZN0037)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31071724) and the Natural Science Foundation of Jiangxi, China (No. 2010GZN0037)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tuguoquan@263.net)

菌株和 *Escherichia coli* 1485 *Rif^R* 菌株R质粒转移的情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗生素 红谷霉素 (Honggumycin) 为链霉菌702 (*Streptomyces* 702) 所产抗细菌广谱抗生素, 由江西农业大学生物科学与工程学院应用微生物研究室提供。

1.1.2 菌株 福氏志贺菌 (*S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R*) 为含耐氯霉素的R质粒; 大肠杆菌 (*E. coli* 1485 *Rif^R*) 为氯霉素敏感的菌株, 由江西医学院病原生物学教研室惠赠。

1.1.3 培养基 ① 麦康凯琼脂平板培养基^[17]; ② 含氯霉素麦康凯琼脂平板培养基: 按①配制麦康凯培养基, 灭菌后冷却到45℃, 滴加氯霉素, 混匀, 倾注平板; ③ 营养肉汤培养基^[15]。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 将 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 分别接种于营养肉汤培养基中, 37℃恒温培养7~8 h。

1.2.2 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 菌R质粒自动丢失率试验 取 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 7~8 h培养物0.2 mL, 加入1.8 mL营养肉汤培养基中, 37℃恒温培养24 h、48 h后分别稀释 10^3 倍, 各取50 μ L接种麦康凯琼脂平板 (含氯霉素和不含氯霉素) 各4皿。涂布涂匀, 37℃恒温培养24 h后观看结果, 对麦康凯琼脂平板白色菌落 (*S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R*) 进行计数。

1.2.3 *E. coli* 1485 *Rif^R* 菌麦康凯琼脂平板培养试验 取 *E. coli* 1485 *Rif^R* 7 h~8 h培养物0.2 mL, 再按1.2.2法进行培养, 对麦康凯琼脂平板上的紫红色菌落 (*E. coli* 1485) 进行计数。

1.2.4 R质粒在 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 之间转移试验 各取 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 7 h~8 h培养物0.1 mL, 再按1.2.2法进行培养, 对麦康凯琼脂平板上的紫红色菌落 (*E. coli* 1485) 进行计数。

1.2.5 红谷霉素对R质粒接合传递的体外抑制试验 取红谷霉素10倍试验浓度 (30 μ g/mL) 0.2 mL, *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 7~8 h培养物各0.1 mL, 加入到1.6 mL肉汤培养基中, 按1.2.2法进行培养, 对麦康凯琼脂平板上的紫红色菌落 (*E. coli* 1485) 进行计数。

1.2.6 红谷霉素消除 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* R质粒试验 取红谷霉素10倍试验浓度 (30 μ g/mL) 0.2 mL, *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 7~8 h培养物0.2 mL, 加入到1.6 mL肉汤培养基中, 按1.2.2法进行培养, 对麦康凯琼脂平板上的白色菌落 (*S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R*) 进行计数。

1.2.7 红谷霉素消除 *E. coli* 1485 *Cm^R* R质粒试验 取红谷霉素10倍试验浓度 (30 μ g/mL) 0.2 mL, *E. coli* 1485 *Cm^R* 7~8 h培养物0.2 mL, 加入到1.6 mL肉汤培养基中, 按1.2.2法进行培养,

对麦康凯琼脂平板上的紫红色菌落 (*E. coli* 1485) 进行计数。

1.2.8 溴化乙锭 (EB) 对R质粒接合传递的体外抑制试验 取溴化乙锭 (30 μ g/mL、300 μ g/mL) 0.2 mL, *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 7~8 h培养物各0.1 mL, 加入到1.6 mL肉汤培养基中, 按1.2.2法进行培养, 对麦康凯琼脂平板上的紫红色菌落 (*E. coli* 1485) 进行计数。

1.2.9 溴化乙锭消除 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* R质粒试验 取溴化乙锭 (30 μ g/mL、300 μ g/mL) 0.2 mL, *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 7~8 h培养物0.2 mL, 加入到1.6 mL肉汤培养基中, 按1.2.2法进行培养, 对麦康凯琼脂平板上的白色菌落 (*S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R*) 进行计数。

1.2.10 R质粒转移率^[18]和R质粒转移抑制率^[19]计算 R质粒转移率(%) = 转移接合子菌落数/受体菌落数 $\times 100\%$; R质粒转移抑制率(%) = (1-药物作用后的转移接合子数/无药物作用的转移接合子数) $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 菌和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 菌适用性鉴定

S. flexneri D15 *R-plasmid Cm^R* 在麦康凯琼脂平板 (含氯霉素和不含氯霉素) 上均生长良好, 菌落数差异无统计学意义。该菌R质粒自动丢失率可忽略不计, 可用于本次实验。*E. coli* 1485 *Rif^R* 在麦康凯琼脂平板 (不含氯霉素) 上生长良好, 在麦康凯琼脂平板 (含氯霉素) 上未见菌落生长。该菌对氯霉素敏感, 可用于本次实验。

2.2 *S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 之间R质粒转移率及抑制率

S. flexneri D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 之间转移率及药物抑制率见图1和表1。红谷霉素和溴化乙锭的R质粒转移抑制率差异无统计学意义。

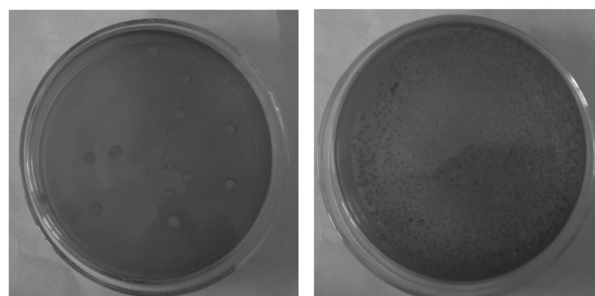


图1 含氯霉素麦康凯琼脂平板 (a, Honggumycin处理) 和对照 (b, 无Honggumycin处理) 的 *E. coli* 1485 *Rif^R* 菌落数 (*S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* 和 *E. coli* 1485 *Rif^R* 共育24 h)

Fig. 1 The colony number of *E. coli* 1485 *Rif^R* on MacConkey Agar containing chloromycetin with (a) and without (b) Honggumycin (*S. flexneri* D15 *R-plasmid Cm^R* and *E. coli* 1485 *Rif^R* cocultured for 24 h)

表1 培养不同时间后R质粒转移率和转移抑制率

Table 1 R plasmid transfer rate and inhibition rate of R plasmid transfer after different culture time

组别 Group	24 h		48 h	
	转移率 Transfer rate	抑制率 Inhibition rate	转移率 Transfer rate	抑制率 Inhibition rate
无药物作用对照组 Control group	46.51	0	55.92	0
红谷霉素作用组 Honggumycin group	3.34	92.82	0.9	97.04
溴化乙锭组 EB group (30 µg/mL)	0.5	99.11	0.2	99.64
溴化乙锭组 EB group (300 µg/mL)	0	100	0	100

2.3 红谷霉素对*S. flexneri* DI5 R-plasmid *Cm^r*和*E. coli* 1485 *Cm^r* R质粒消除率

S. flexneri DI5 R-plasmid *Cm^r*和*E. coli* 1485 *Rif^r*的R质粒的丢失率在红谷霉素作用组和无药物作用对照组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

红谷霉素与质粒消除剂溴化乙锭 (EB) 相比, 在药物作用24 h后红谷霉素的质粒转移抑制率为92.82%, EB的质粒转移抑制率在30 µg/mL时为99.11%, 在300 µg/mL时为100%; 48 h红谷霉素的质粒转移抑制率为97.04%, EB的质粒转移抑制率在30 µg/mL为99.64%, 在300 µg/mL为100%。红谷霉素和溴化乙锭对耐药性质粒的转移抑制率没有显著区别, 说明红谷霉素对耐药性质粒的转移表现出很强的抑制作用。R质粒的丢失率在有无红谷霉素作用条件下无差异显著性, 说明红谷霉素对R质粒无消除作用。

R质粒的传递需要性菌毛的接触, 这一过程非常复杂, 影响因素很多。红谷霉素属于大环内酯类抗生素^[20-21], 抗菌机制是抗生素与核糖体50 S亚单位的L27及L22蛋白质结合, 在肽链延长阶段能促使肽酰基-rRNA从核糖体解离, 从而抑制细菌蛋白质的合成起到抑菌或杀菌作用。本实验中红谷霉素可能起到阻碍细菌性菌毛的合成, 从而阻断性菌毛的结合, 但确切的机理还需研究。

细菌耐药性产生现象是临床医学必须面对的重要课题。细菌耐药性产生机制复杂, 而红谷霉素作为一种新型抗生素具有抑制R质粒结合转移的作用, 为寻找应对细菌耐药性的药物提供了有益的尝试。

References

- Sharma DR, Pradhan B, Mishra SK. Multiple drug resistance in bacterial isolates from liquid wastes generated in central hospitals of Nepal. *Kathmandu Univ Med J*, 2010, **8** (29): 40-44
- Ashkenazi S, Levy I, Kazaronovski V, Samra Z. Growing antimicrobial resistance of Shigella isolates. *J Antimicrob Chemother*, 2003, **51** (2): 427-429
- Conner CP, Heithoff DM, Hahan MJ. *In vivo* gene expression: Contributions to infection, virulence, and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immun*, 1998, **225**: 1-12
- Miller RV. Bacterial gene swapping in nature. *Sci Am*, 1998, **278** (1): 66-71
- Waters VL. Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat Genet*, 2001, **29**: 375-376
- Lee JH, Lee KL, Yeo WS, Park SJ, Roe JH. SoxRS-mediated lipopolysaccharide modification enhances resistance against multiple drugs in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2009, **191** (13): 4441-4450
- Aoki T, Takami K, Kitao T. Drug resistance in a non-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Organ*, 1990, **8**: 171-177
- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother*, 2006, **58** (1): 1-6
- Zhang XL (张晓莉). 关于细菌耐药的机理、监控及对策的研究进展. *Sect Clin Biochem & Lab Med Foreign Med Sci* (国外医学临床生物化学与检验学分册), 1997, **18** (1): 37-39
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 2000, **405** (6784): 299-304
- D Raghunath. Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India. *J Biosci*, 2008, **33** (4): 593-603
- Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67** (2): 277-301
- de Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: A paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol*, 2007, **10** (5): 428-35
- Jensen SO, Apisiridej S, Kwong SM, Yang YH, Skurray RA, Firth N. Analysis of the prototypical *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK1. *Plasmid*, 2010, **64** (3): 135-42
- Hrabák J, Zemanová A, Chudácková E. Mobile genetic elements in the epidemiology of bacterial resistance to antibiotics. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*, 2010, **59** (2): 55-66

- 16 Zhong M (钟敏), Tong XT (童孝田), Sun YH (孙宇辉), Tu GQ (涂国全). Identification of chemical structure of antibacterial fraction S2 produced by *Streptomyces* 702. *J Fujian Agric For Univ Nat Sci Ed* (福建农林大学学报自然科学版), 2007, **36** (3): 307~311
- 17 Chen TS (陈天寿) *et al.* 微生物培养基的制造与应用. Beijing, China: China Agricultural Press (北京: 中国农业出版社), 1995
- 18 Verma T, Ramteke PW, Garq SK. Effect of ecological factors on conjugal transfer of chromium-resistant plasmid in *Escherichia coli* isolated from tannery effluent. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, **102~103** (1~6): 5~20
- 19 Zhao WH, Hu ZQ, Hara Y, Shimamura T. Inhibition by epigallocatechin gallate (EGCg) of conjugative R plasmid transfer in *Escherichia coli*. *J Infect Chemother*, 2001, **7** (3): 195~7
- 20 Li XH (黎循航), Liu Z (刘姝), Tu GQ (涂国全). A preliminary study on the antibacterial action of the bioactive compound produced by *Streptomyces* 702. *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (江西农业大学学报自然科学版), 2002, **24** (6): 829~832
- 21 Wei SJ (魏赛金), Zhong M (钟敏), Huang L (黄林), Li XH (黎循航), Tu GQ (涂国全). Isolation and purification of the antibacterial substance produced by *Streptomyces* 702. *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 2006, **28** (3): 453~457