

[文章编号] 1671-587X(2025)04-0921-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250408

多重耐药铜绿假单胞菌群体感应相关基因表达及其对生物膜形成和耐药性的影响

刘 岩¹, 潘蓓珍¹, 杨继飞¹, 张先宇¹, 丁文博¹, 宋伶俐², 赵云冬¹

(1. 北华大学医学技术学院临床生化及分子生物学检验教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学附属医院检验科微生物室, 吉林 吉林 132001)

[摘要] **目的:** 探讨临床多重耐药铜绿假单胞菌群体感应相关基因表达对生物膜形成和耐药性的影响, 阐明耐药性增加的机制。**方法:** 收集77株铜绿假单胞菌, 根据其耐药性将菌株分为多重耐药组和敏感组, 微孔板法构建生物膜筛选最佳形成条件, 采用光学显微镜观察2组铜绿假单胞菌生物膜形成情况, 结晶紫染色半定量法检测2组铜绿假单胞菌生物膜形成能力, 微量肉汤稀释法检测2组铜绿假单胞菌对群体感应抑制剂呋喃酮(C-30)的最低抑菌浓度(MIC)值, 试剂盒法提取2组铜绿假单胞菌的RNA, 改良TRIzol法提取2组铜绿假单胞菌中多重耐药组浮游态和生物膜态RNA, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测2组以及加入C-30抑制剂前后铜绿假单胞菌中*lasR/I*、*RhlR/I*和*PqsR/A* mRNA表达水平。**结果:** 77株铜绿假单胞菌标本中有56株多重耐药株(多重耐药组), 21株全敏感株(敏感组)。构建生物膜最佳条件, 当铜绿假单胞菌浓度为 1.5×10^8 CFU·mL⁻¹、培养时间为48 h时生物膜形成量最多; 77株铜绿假单胞菌标本的生物膜阳性率为91%, 其中生物膜强阳性、中等阳性、弱阳性和阴性分别占16%、34%、41%及9%, 多重耐药株的生物膜阳性率为96%, 且多重耐药组的生物膜形成能力高于敏感组($P < 0.05$)。当群体感应抑制剂C-30的浓度为8 mg·L⁻¹时, 可抑制多数铜绿假单胞菌生物膜的形成, 且浓度越高, 抑制作用越明显; 浮游态RNA和生物膜态RNA的吸光度(A)值在1.8~2.0。RT-qPCR法, 与浮游态比较, 生物膜态的铜绿假单胞菌重群体感应相关基因*lasR/I*、*RhlR/I*和*PqsR/A* mRNA表达水平升高($P < 0.01$); 与未加抑制剂组比较, 加入抑制剂组铜绿假单胞菌中生物膜态的群体感应相关基因*lasR/I*、*RhlR/I*和*PqsR/A* mRNA表达水平降低($P < 0.01$)。**结论:** 多重耐药铜绿假单胞菌的群体感应相关基因高表达会促进生物膜的形成, 从而导致耐药性增加。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 生物膜; 群体感应系统; 实时荧光定量PCR; 耐药性

[中图分类号] R378.99 **[文献标志码]** A

Expression of quorum sensing related genes in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and its effects on biofilm formation and drug resistance

LIU Yan¹, PAN Beizhen¹, YANG Jifei¹, ZHANG Xianyu¹, DING Wenbo¹, SONG Lingli², ZHAO Yundong¹

(1. Department of Clinical Biochemistry and Molecular Biology, School of Medical Technology, Beihua

[收稿日期] 2024-09-20 **[录用日期]** 2024-11-19

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20230202059NC, 20230204085YY); 北华大学研究生创新计划项目(研创合字[2023] 022)

[作者简介] 刘 岩(1999—), 女, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事细菌耐药性方面的研究。

[通信作者] 赵云冬, 教授, 硕士研究生导师(E-mail: 18604498530@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

University, Jilin 132013, China; 2. Microbiology Room, Laboratory of Laboratory, Affiliated Hospital, North China University, Jilin 132001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of quorum sensing-related gene expression on biofilm formation and drug resistance in clinically multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, and to clarify the mechanism of enhancing drug resistance. **Methods:** A total of 77 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were collected. Based on drug resistance, the strains were divided into multidrug-resistant group and sensitive group. The optimal biofilm formation conditions were determined using the microtiter plate method; biofilm formations of the strains in both groups was observed under an optical microscope; crystal violet staining was used to semiquantitatively detect biofilm formation ability of *P. aeruginosa* in both groups; microbroth dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) values of the quorum sensing inhibitor (C-30) against *Pseudomonas aeruginosa* in both groups; RNA was extracted from two groups using a commercial kit, while RNA from planktonic state and biofilm state of multidrug-resistant strains was extracted using modified TRIzol method; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the mRNA expression levels of quorum sensing-related genes (*lasR/I*, *RhlR/I*, *PqsR/A*) of the strains in multidrug-resistant group and sensitive group, as well as before and after adding the quorum sensing inhibitor C-30. **Results:** Among 77 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, 56 were multidrug-resistant (multidrug-resistant group) and 21 were fully sensitive (sensitive group). Optimal biofilm formation occurred at a bacterial concentration of 1.5×10^8 CFU·mL⁻¹ with 48 h incubation. The biofilm positivity rate was 91%, with strongly positive, moderately positive, weakly positive, and negative biofilms accounting for 16%, 34%, 41%, and 9%, respectively. The biofilm positivity rate in multidrug-resistant strains was 96%, and biofilm formation ability in multidrug-resistant group was higher than that in sensitive group ($P < 0.05$). When the concentration of C-30 was 8 mg·L⁻¹ the biofilm formation in most *Pseudomonas aeruginosa* was inhibited, with enhanced suppression at higher concentrations. The absorbance (A) value of both planktonic-state and biofilm-state RNA ranged from 1.8 to 2.0. The RT-qPCR results showed that compared with planktonic state, the expression levels of *lasR/I*, *RhlR/I*, and *PqsR/A* mRNA of the strains in biofilm state were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with non-inhibitor group, the expression levels of *lasR/I*, *RhlR/I*, and *PqsR/A* mRNA in biofilm state of inhibitor-treated group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** High expression of quorum sensing-related genes in multidrug-resistant *P. aeruginosa* promotes biofilm formation, thereby enhancing drug resistance.

KEYWORDS *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilms; Quorum sensing system; Real-time fluorescence quantitative PCR; Drug resistance

铜绿假单胞菌是一种常见的非发酵革兰阴性杆菌,在自然界中广泛存在,常因污染医疗器械并定植于医疗器械表面通过插管和导管等介入性治疗引起呼吸道、尿路、手术切口及烧伤组织感染^[1],是引起院内感染的重要条件致病菌。抗生素治疗是目前应用于临床微生物感染的主要手段,因其高效、广谱和毒性低而被广泛使用,然而因临床使用频率和强度的增加,出现多重耐药铜绿假单胞菌甚至泛耐药铜绿假单胞菌,且多重耐药铜绿假单胞菌呈现上升趋势^[2-3]。研究^[4]显示:陕西省西安市医院铜绿假单胞菌对绝大多数抗菌药物的耐药率均高于同

时期的中国细菌耐药监测网的报道,细菌耐药形势严峻,甚至被美国疾病控制与预防中心列为“严重威胁”。引起铜绿假单胞菌的耐药机制包括^[5]:产生β-内酰胺酶、外排泵的过度表达、外膜蛋白的改变、药物作用靶位的改变和生物膜的形成等,尤其是生物膜形成后,抗生素难以进入到细菌内部导致其抗菌效果降低或失败^[6],从而引起慢性持续性感染。铜绿假单胞菌形成生物膜过程受群体感应(quorum sensing, QS)系统的调控^[7],QS系统是细菌细胞间的通信系统,主要通过信号分子密度识别信号,调控基因表达,主要包括Las系统、Rhl

系统和 PQS 系统。本研究基于生物膜耐药机制的维度, 深入探讨 QS 系统对生物膜的影响, 从而作用于铜绿假单胞菌多重耐药性, 为临床治疗铜绿假单胞菌感染提供新方向。

1 材料与方法

1.1 菌株、主要试剂和仪器

铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC15442 购于广东环凯微生物科技有限公司, 77 株铜绿假单胞菌均为北华大学附属医院临床标本分离菌株。Müller-Honto 琼脂培养基平板、LB 平板和焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) (上海碧云天生物技术有限公司), BIOG 细菌 RNA 提取试剂盒 (常州百代生物科技有限公司), cDNA 第一链合成试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司), 呋喃酮 (furanone C-30, C-30) 和 0.1% 结晶紫溶液由本实验室自行配制。全自动快速微生物质谱检测系统 (型号: VITEKMS, 梅里埃诊断产品上海有限公司), 生物安全柜 (型号: BSC-1600 II B2, 上海苏净实业有限公司), 微量核酸蛋白测定仪 (型号: DS-11FxP 美国 Denovix 公司), 酶标仪 (型号: SPARK10M, 美国 TECAN 公司), 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: TCR0024, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 菌株复苏、分离培养和药敏试验

将铜绿假单胞菌标准菌株和临床分离冻存株于 LB 平板上复苏、传代, 37 °C 培养 18~24 h, 观察菌落生长情况。取单菌落配制菌悬液, 调至 0.5 麦氏比浊, 涂布于 Mueller-Hinton 琼脂培养基平板, 37 °C 培养 18~24 h, 观察药敏结果。判定标准参考美国临床和实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2023 年制定的标准^[8]。

1.3 生物膜的形成条件

取 LB 固体培养基上单个菌落于 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r·min⁻¹ 振荡 18~24 h。取 100 μL 菌液接种于 10 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r·min⁻¹ 振荡 2 h, 测定吸光度 (A) 值为 0.2 时, 取 100 μL 混合菌液, 采用 LB 液体培养基依次稀释, 使其浓度分别为 1.5×10⁶、1.5×10⁷ 和 1.5×10⁸ CFU·mL⁻¹。取 200 μL LB 液体培养基和 20 μL 不同浓度的稀释菌液于无菌 96 孔细胞培养板中, 37 °C 孵育 48 h, 每组 3 个复孔, 每隔 2、4、8、

12、24 和 48 h 采用光学显微镜观察生物膜形成情况, 同时以 LB 液体培养基作为阴性对照。生物膜形成的生物量以 A 值表示, 采用酶标仪分析各组 A 值。

1.4 生物膜的测定

采用“1.3”中的方法构建生物膜, 弃去孔内培养液并用无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 3 次, 加入 200 μL 甲醇固定 15 min, 再加入 200 μL 0.1% 结晶紫溶液染色 5 min, 采用 ddH₂O 洗涤 3 次, 最后加入 200 μL 33% 冰醋酸溶液溶解, 酶标仪测定 A (570) 值。生物膜形成能力判定标准^[9]: A (570) 值 ≤ A 值为阴性 (-), A 值 < A (570) 值 < 2×A 值为弱阳性 (+), 2×A 值 < A (570) 值 < 4×A 值为中等阳性 (++) , A (570) 值 > 4×A 值为强阳性 (+++) , A 值为阴性对照均值与 3 倍标准偏差之和。

1.5 最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 的测定

在无菌 96 孔细胞培养板中加入 100 μL 过夜振荡稀释后的菌液和 100 μL 梯度稀释过的 QS 抑制剂 C-30 溶液 (最终浓度梯度为 128.0、64.0、32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0 和 0.5 mg·L⁻¹), 37 °C 培养 18~24 h, 肉眼观察细菌生长情况, 以澄清孔的最低浓度为 MIC。

1.6 亚抑菌浓度 C-30 抑制剂对生物膜形成抑制作用的检测

取 200 μL LB 液体培养基和 20 μL 生物膜形成最佳浓度的菌液, 加入终浓度为 1/2MIC^[10] 的 C-30 抑制剂, 对照组为不加入抑制剂的孔, 每组 3 个复孔。37 °C 培养孵育 24 h 后, 弃去浮游菌, 洗涤和检测步骤同“1.3”。

1.7 QS 相关基因 mRNA 表达水平检测

1.7.1 引物设计 基于 NCBI 数据库中已公布的铜绿假单胞菌的 QS 相关基因 *lasR/I*、*RhlR/I*、*pqsR/A* 和内参基因 16SrRNA 序列, 进行多序列比对, 根据比对结果设计特异性引物, 引物序列见表 1。

1.7.2 试剂盒法提取细菌 RNA 操作步骤按照 BIOG 细菌 RNA 提取试剂盒步骤进行。操作步骤: 将收集的细菌以 5 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 弃上清, 加入 200 μL PBS 缓冲液, 振荡混匀, 5 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 彻底弃上清。加入 100 μL 裂解液 I, 振荡混匀, 直到沉淀完全分散悬浮, 无

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Specific primer	Specific primer sequence (5'-3')	Fragment size(bp)
<i>lasR</i>	F:TCGAACATCCGGTCAGCAAA R:GTTACATTGGCTTCCGAGC	128
<i>lasI</i>	F:CGTGCTCAAGTGTTCAAGGA R:AAACCTGGGCTTCAGGAGTA	130
<i>RhlR</i>	F:GAATGACGGAGGCTTTTTCG R:CGTAGTAATCGAAGCCCAGG	125
<i>RhlI</i>	F:CAGTTCGACCATCCGCAAAAC R:TAGCGCGAAAGCTCCCATAC	170
<i>pqsR</i>	F:TCGTTCTGCGATACGGTGAG R:CACTGGTTGAAGCGGGAGAT	167
<i>pqsA</i>	F:TTTCCTGCAATACACCTCGG R:GCTGAACCAGGGAAGAACA	193
16S RNA	F:CGTAGGTGGTTCAGCAAGTT R:TCTACGCATTTACCGCTAC	125

明显块状沉淀。加入裂解酶 25 μL ，充分混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min。加入 200 μL 裂解液 II 和 20 μL 复合消化液，充分混匀，65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。加入 400 μL 异丙醇，轻轻颠倒混匀。将吸附柱放入收集管内，将上述溶液全部转入吸附柱内，12 000 g 离心 1 min，弃收集管内废液。将吸附柱放回收集管内，加入 500 μL 洗涤液，静置 2 min，12 000 g 离心 1 min，弃去管内废液。同时按每份样本 40 μL 取洗脱液，放置于灭菌 1.5 mL 离心管，65 $^{\circ}\text{C}$ 预热。将吸附柱放回收集管内，12 000 g 离心 2 min，去除残留的洗涤液。取出吸附柱，放入新的 1.5 mL 离心管内，加入上述预热的 40 μL 洗脱液，静置 2 min，12 000 g 离心 2 min，收集 RNA 溶液。采用微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度，以 A(260)/A(280)比值代表 RNA 纯度，每个样品重复测 3 次，取平均值。

1.7.3 改良 TRIzol 法^[11]提取浮游态和生物膜态 RNA 构建生物膜，收集菌株浮游生物和生物膜，2 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，弃上清，留沉淀，分别向 2 管中加入 500 μL TRIzol 轻轻混匀并置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s 条件下冷却，恢复室温，在超声粉碎仪中粉碎 3 次，再加入 500 μL TRIzol 和 200 μL 氯仿颠倒混匀 8 次，冰盒静置 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 10 min，弃去沉淀，尽量吸取上清，至新的 EP 管中，再加入 500 μL 异丙醇充分混匀，室温静置 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 10 min，弃上清，沿管壁旋转加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇，4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 g

离心 5 min，重复 1 次，弃上清，将 EP 管倒置干燥，再加入 20 μL RNase Free ddH₂O，溶解沉淀，采用微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度，以 A(260)/A(280)比值代表 RNA 纯度，每个样品重复测量 3 次，取平均值。

1.7.4 合成 cDNA 按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书中的步骤进行操作。操作步骤：总 RNA 1 μg ，OligdT (18) 1 μL ，dNTPs 1 μL ，5 $\times$ First-stand Synthesis Buffer 4 μL ，Super M-mLV Reverse transcriptase RNase H 1 μL ，RNase inhibitor 2 μL ，RNase-free ddH₂O 补足至 20 μL 。短暂离心，混匀体系中组分。42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min。合成 cDNA 用于后续实验。

1.7.5 RT-qPCR 法检测各组 QS 相关基因 mRNA 表达水平 RT-qPCR 法反应体系 10 μL ，每组设置 3 个复孔，包括 cDNA 0.2 μL ，上游引物 0.2 μL ，下游引物 0.2 μL ，ddH₂O 4.4 μL ，2 $\times$ Q3 SYBR qPCR Master Mix 5 μL 。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，40 个循环。以 16SrRNA 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组 QS 相关基因 mRNA 表达水平。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0、OriginPro 2021 和 GraphPad Prism 9 统计软件进行统计学分析。各组 QS 相关基因 *lasR/I*、*RhlR/I* 和 *pqsR/A* mRNA 表达水平比较采用两独立样本 *t* 检验；组间生物膜形成能力比较采用单因素方差分析，两两样本均数组间比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 铜绿假单胞菌药敏检测 耐药组 ($n=56$) 的判定标准：对临床使用的 3 类或 3 类以上抗菌药物同时呈现耐药的细菌可判定为多重耐药菌；敏感组 ($n=21$) 的判定标准：对所有的抗菌药物均敏感的细菌可判定为敏感菌。77 株铜绿假单胞菌对 11 种抗菌药物的药敏结果见表 2。

2.2 生物膜的形成条件 $1.5\times10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的铜绿假单胞菌生物膜形成量高于 1.5×10^6 和 $1.5\times10^7\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铜绿假单胞菌生物膜形成量，且在培养 48 h 时， $1.5\times10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铜绿假单胞菌生物膜形成量高于培养 24 h 的生物膜形成量（图 1），故选择 $1.5\times10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、培养 48 h 为生物膜形成的最佳条件进行后续实验。

表2 77株铜绿假单胞菌对11种抗菌药物的药敏检测结果
Tab. 2 Detection results of drug sensitivity of 77 strains of *Pseudomonas aeruginosa* to 11 kinds of antibiotics [n(η/%)]

Antibacterial drug	Drug resistance rate	Intermediate rate	Sensitivity rate
TZP	24(31.17)	13(16.88)	40(51.95)
TIM	48(62.34)	8(10.39)	21(27.27)
CAZ	33(42.86)	4(5.19)	40(51.95)
FEP	24(31.17)	11(14.29)	42(54.54)
IPM	31(40.26)	1(1.30)	45(58.44)
MEM	29(37.66)	1(1.30)	47(61.04)
TOB	3(3.90)	0(0)	74(96.10)
AK	3(3.90)	0(0)	74(96.10)
CIP	27(35.06)	8(10.39)	42(54.55)
LEV	30(38.96)	8(10.39)	39(50.65)
SCF	19(24.68)	12(15.58)	46(59.74)

TZP: Piperacillin/Tazobactam; TIM: Ticacillin/clavulanic acid; CAZ: Ceftazidime; FEP: Cefepime; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; TOB: Tobramycin; AK: Amikacin; CIP: Ciprofloxacin; LEV: Levofloxacin; SCF: Cefoperazone/Sulbactam.

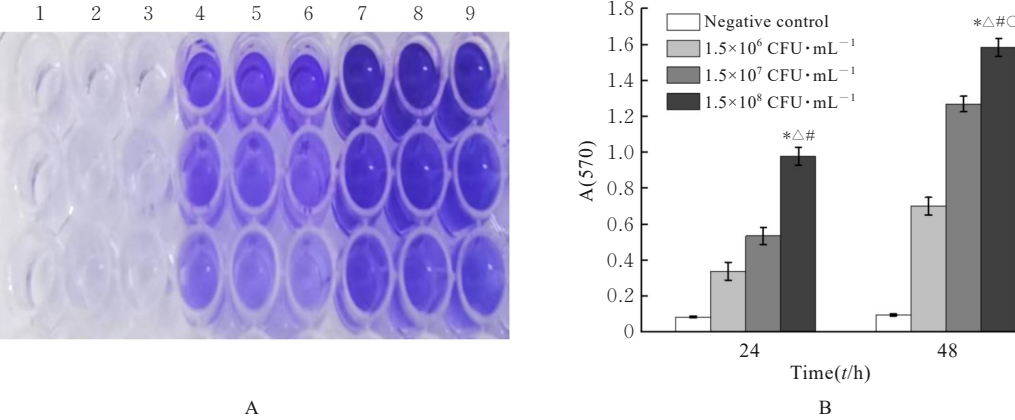
2.3 结晶紫染色半定量法检测生物膜形成能力
在所分离的77株铜绿假单胞菌中70株具有形成生物膜能力, 其中强阳性(+++) 12株(16%), 中等阳性(++) 26株(34%), 弱阳性(+) 32株(41%), 阴性(−) 7株(9%)。生物膜形成能力见图2。部分铜绿假单胞菌生物膜形成能力见表3, 铜绿假单胞菌耐药组和敏感组具体生物膜形成构成比见表4。

2.4 不同浓度C-30作用下铜绿假单胞菌生物膜形成能力 与空白对照组比较, 当C-30浓度为 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时铜绿假单胞菌生物膜的形成能力降低($P<0.01$), 且C-30浓度越高, 对铜绿假单胞菌生物膜形成能力的抑制作用越明显。见图3。

2.5 多重耐药和敏感菌株QS基因表达mRNA水平 以16S RNA为内参基因, 多重耐药组和敏感组菌株中*lasR*、*lasI*、*RhlR*、*RhlI*、*PqsR*和*PqsA* mRNA表达水平分别为(9.37 ± 0.37 vs 1.71 ± 0.39)、(5.24 ± 0.26 vs 1.77 ± 0.13)、(9.51 ± 0.50 vs 1.50 ± 0.10)、(6.31 ± 0.17 vs 0.83 ± 0.05)、(8.44 ± 0.62 vs 1.72 ± 0.16)及(13.57 ± 0.58 vs 1.63 ± 0.14), 多重耐药组菌株QS相关基因mRNA表达水平高于敏感组($P<0.01$)。

2.6 生物膜态和浮游态QS基因mRNA表达水平 以16S RNA为内参基因, 多重耐药组菌株*lasR*、*lasI*、*RhlR*、*RhlI*、*PqsR*和*PqsA*在生物膜态及浮游态的mRNA表达水平分别为(10.74 ± 0.34 vs 1.78 ± 0.04)、(12.52 ± 0.44 vs 1.95 ± 0.08)、(20.35 ± 1.38 vs 1.72 ± 1.12)、(13.72 ± 1.71 vs 0.76 ± 0.45)、(18.51 ± 0.49 vs 1.12 ± 0.36)及(10.02 ± 1.03 vs 1.65 ± 0.09), 生物膜态菌株中QS相关基因mRNA表达水平均高于浮游态菌株($P<0.01$)。

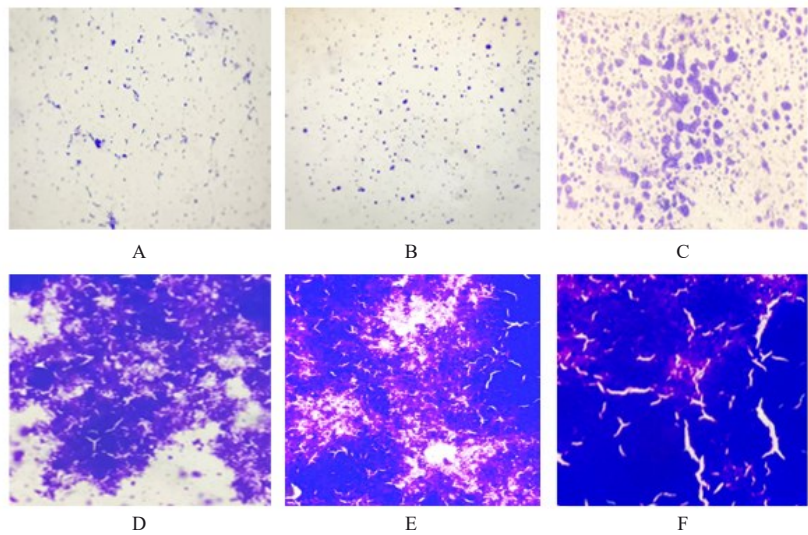
2.7 加入C-30抑制剂后菌株QS相关基因mRNA表达水平 加入1/2 MIC C-30抑制剂前后, 生物膜态菌株中*lasR*、*lasI*、*RhlR*、*RhlI*、*PqsR*和*PqsA*



A: Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* at 24 and 48 h at different concentrations (1–3: Negative control; 4–6: Biofilm formation of $1.5\times10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1.5\times10^7\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, and $1.5\times10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 24 h culture; 7–9: Biofilm formation of $1.5\times10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1.5\times10^7\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, and $1.5\times10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 48 h culture); B: Histogram of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. (* $P<0.05$ vs negative control group; ^ $P<0.05$ vs $1.5\times10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$; # $P<0.05$ vs $1.5\times10^7\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$; ^# $P<0.05$ vs 24 h).

图1 生物膜形成最适条件的筛选

Fig. 1 Screening of optimal conditions for biofilm formation



A: 2 h; B: 4 h; C: 8 h; D: 12 h; E: 24 h; F: 48 h.

图 2 光学显微镜观察铜绿假单胞菌生物膜的形成情况(结晶紫,×1 000)

Fig. 2 Formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm observed by optical microscope (Crystal violet, ×1 000)

表 3 部分铜绿假单胞菌生物膜的形成能力
Tab. 3 Biofilm forming abilities of parts of *Pseudomonas aeruginosa*

Strain number	A(570)	Biofilm formation ability
7	1.772±0.027	+++
8	1.687±0.063	+++
50	1.623±0.156	++
55	1.409±0.185	++
69	1.331±0.080	+
70	1.520±1.136	+

mRNA 表达水平分别为 (10.74±0.34 vs 3.47±0.05)、(12.52±0.44 vs 2.89±0.06)、(20.35±1.38 vs 8.06±0.10)、(13.72±1.71 vs 7.01±0.35)、(18.51±0.49 vs 4.39±0.11) 及 (10.02±1.03 vs 5.9±0.25), 与未加抑制剂组比较, 加入抑制剂组菌株中 QS 相关基因 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。与敏感组比较, 耐药组菌株生物形成能力升高 ($P<0.05$)。

3 讨论

铜绿假单胞菌是一种条件致病菌, 可作为正常菌群在人体皮肤表面分离到。然而, 在免疫力低下的患者中, 铜绿假单胞菌可定植于患处导致持续的慢性感染^[12]。近年来, 随着广谱抗生素的广泛使用, 铜绿假单胞菌的耐药情况呈现逐年上升趋势, 且多重耐药情况严重^[13-14]。因此, 对于多重耐药铜绿假单胞菌耐药机制的研究已引起关注和重视。

生物膜的形成过程包括黏附、生物膜形成期、生物膜成熟期和生物膜分散期几个动态阶段^[15], 易受 QS 系统、外排泵、鸟苷二磷酸、黏附素、噬菌体和小分子蛋白等影响^[16-18], 其不仅能导致下呼吸道的各种病理改变, 如支气管扩张和肺纤维化等^[19], 且难以被清除。研究^[20]显示: 多重耐药的铜绿假单胞菌生物膜阳性率为 100%, 与本研究结果相似 (多重耐药组的生物膜阳性率为 96%), 均为较高水平, 可能与地域、科室分布和毒力基因表达水平等因素有关^[21-22]; 有些耐药菌株不产生生物膜, 可能与产生的 D-环丝氨酸有关^[23]。本研究中,

表 4 77 株铜绿假单胞菌生物膜的形成情况
Tab. 4 Biofilm formations of 77 strains of *Pseudomonas aeruginosa*

Group	Biofilm formation ability				χ^2	P
	Feminine character	Weakly positive	Moderately positive	Strongly positive		
Drug resistant	2	24	21	9	7.843	<0.05
Sensitive	5	8	5	3		

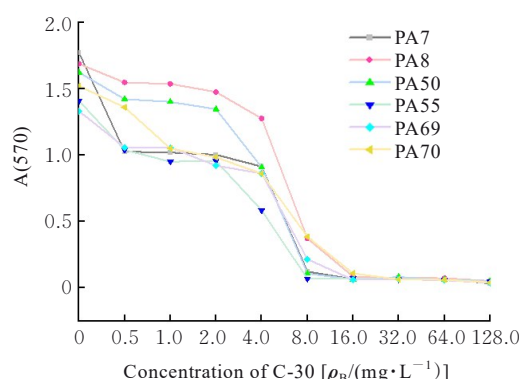


图3 不同浓度C-30作用后6株铜绿假单胞菌生物膜形成情况

Fig. 3 Biofilm formations of 6 strains of *Pseudomonas aeruginosa* after treated with different concentrations of C-30

耐药组与敏感组菌株生物膜形成能力比较差异有统计学意义,表明铜绿假单胞菌耐药大多与生物膜有关,是发生反复感染的主要原因。

QS系统由信号分子和相应的信号分子受体组成, *lasR*、*lasI*、*RhlR*、*RhlI*、*pqsR*和*pqsA*是编码信号分子受体的基因^[24],当细菌群体密度增大达到阈值时分泌的信号分子与信号分子受体结合,被激活的受体再激活相关转录调节子形成生物膜。研究^[25]显示:QS相关基因可通过调节其他因素在铜绿假单胞菌耐药机制中发挥重要作用。本研究结果显示:多重耐药组菌株QS相关基因mRNA表达水平高于敏感组菌株,提示QS相关基因的高表达会增加细菌耐药性。生物膜是导致耐药的重要机制之一。研究^[26]显示:生物膜态菌株中QS相关基因表达水平比浮游态菌株中表达水平高,与本研究结果一致,表明QS相关基因与生物膜形成存在密切关联。研究^[27]显示:QS抑制剂可竞争性地与对应受体结合,抑制QS系统,并降低生物膜中细菌细胞的黏附作用。本研究采用C-30抑制剂验证QS抑制剂对生物膜形成和QS相关基因表达的影响,结果显示:经C-30抑制剂处理后细菌的生物膜被破坏,生物膜态菌株中QS相关基因表达水平降低,证明QS相关基因的高表达会促进细菌生物膜的形成,从而增强其耐药性。

综上所述, QS相关基因可通过调控生物膜的形成,影响铜绿假单胞菌的耐药性。本研究通过对QS相关基因的探讨,提供了一个抗生物膜新的作用靶点,为临床铜绿假单胞菌所引发的感染提供治疗新思路。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

刘岩参与实验研究设计和论文撰写,潘蓓珍、杨继飞、张先宇和丁文博参与研究数据收集及整理,宋伶俐参与数据分析,赵云冬参与论文审阅。

[参考文献]

- [1] CRONE S, VIVES-FLÓREZ M, KVICH L, et al. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. APMIS, 2020, 128(3): 220-231.
- [2] ALMEIDA V F, DANTAS R C, FERREIRA M L, et al. Relationship between antimicrobial use and the highest number of multidrug-resistant-*Pseudomonas aeruginosa*: a 10-year study [J]. J Infect Dev Ctries, 2024, 18(8): 1227-1232.
- [3] 吴贤丽, 祝司霞. 2017—2021年临床分离多重耐药铜绿假单胞菌的分布、耐药性变迁及*OprD2*基因突变分析[J]. 国外医药(抗生素分册), 2022, 43(6): 415-420.
- [4] 尹佳锋, 郭智, 耿燕, 等. 西安某院近8年铜绿假单胞菌的临床分布特征及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(9): 957-961.
- [5] AVAKH A, GRANT G D, CHEESMAN M J, et al. The art of war with *Pseudomonas aeruginosa*: targeting mex efflux pumps directly to strategically enhance antipseudomonal drug efficacy [J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(8): 1304.
- [6] NASSARAWA S S, NAYIK G A, GUPTA S D, et al. Chemical aspects of polyphenol-protein interactions and their antibacterial activity [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(28): 9482-9505.
- [7] SHASTRY R P, ABHINAND C S. Targeting the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing system to inhibit virulence factors and eradicate biofilm formation using AHL-analogue phytochemicals[J]. J Biomol Struct Dyn, 2024, 42(4): 1956-1965.
- [8] HUMPHRIES R, BOBENCHIK A M, HINDLER J A, et al. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100 [J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(12): 10.1128/jcm.00213-21.
- [9] 李小凤. 碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌生物膜与外排泵相关性研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.
- [10] YU H, LIU Y, YANG F W, et al. The combination of hexanal and geraniol in sublethal concentrations synergistically inhibits quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*-In vitro and in silico approaches [J]. J Appl Microbiol, 2022, 133(4): 2122-2136.

- [11] 段 薇, 刘思琪, 黄 云, 等. 浮游状态和生物膜状态白念珠菌总RNA提取方法的比较研究[J]. 口腔医学, 2022, 42(5): 416-419, 430.
- [12] CAO P B, FLEMING D, MOUSTAFA D A, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* small RNA regulates chronic and acute infection[J]. Nature, 2023, 618(7964): 358-364.
- [13] 王 艳, 曹洪兵, 丁 妍. 2437株临床病原菌分布及其耐药性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(2): 209-212.
- [14] MENDES PEDRO D, PAULO S E, SANTOS C M, et al. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical features and treatment with ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam in a tertiary care university hospital center in Portugal-A cross-sectional and retrospective observational study[J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1347521.
- [15] MA L Z, WANG D, LIU Y W, et al. Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Annu Rev Microbiol, 2022, 76: 413-433.
- [16] ELSHAFIEE E A, KHALEFA H S, AL-ATFEEHY N M, et al. Biofilms and efflux pump regulatory gene (*mexR*) in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from migratory birds in Egypt [J]. Vet World, 2022, 15(10): 2425-2431.
- [17] ANDERSEN J B, KRAGH K N, HULTQVIST L D, et al. Induction of native c-di-GMP phosphodiesterases leads to dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2021, 65(4): e02431-20.
- [18] WANG W Q, FENG X C, SHI H T, et al. Biofilm inhibition based on controlling the transmembrane transport and extracellular accumulation of quorum sensing signals[J]. Environ Res, 2023, 221: 115218.
- [19] MÉSINÈLE J, RUFFIN M, KEMGANG A, et al. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* airway infection and lung function decline in children with cystic fibrosis[J]. J Cyst Fibros, 2022, 21(1): 45-51.
- [20] UGWUANYI F C, AJAYI A, OJO D A, et al. Evaluation of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Federal Medical Center in Nigeria[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2021, 20(1): 11.
- [21] ALI A S B E, OZLER B, BADDAL B. Characterization of virulence genes associated with type III secretion system and biofilm formation in pseudomonas aeruginosa clinical isolates [J]. Curr Microbiol, 2023, 80(12): 389.
- [22] CHIMI L Y, NOUBOM M, BISSO B N, et al. Biofilm formation, pyocyanin production, and antibiotic resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from wounds[J]. Int J Microbiol, 2024, 2024: 1207536.
- [23] KUMAR R, SINGH N, CHAUHAN A, et al. Mycobacterium tuberculosis survival and biofilm formation studies; effect of D-amino acids, D-cycloserine and its components[J]. J Antibiot (Tokyo), 2022, 75(8): 472-479.
- [24] MIRANDA S W, ASFAHL K L, DANDEKAR A A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing [J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1386: 95-115.
- [25] 李 镛, 刘嘉琳, 周 莲. 泛耐药铜绿假单胞菌群体行为与群体密度感应系统基因的相关性分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(3): 288-291, 295.
- [26] 谭 芳, 余鹏飞, 李诗佳, 等. 铜绿假单胞菌生物膜和浮游菌的毒力表达差异[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(6): 646-650.
- [27] VETRIVEL A, VETRIVEL P, DHANDAPANI K, et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by selected LasR inhibitors [J]. Int Microbiol, 2023, 26(4): 851-868.