doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.006

抗菌肽人β防御素3对铜绿假单胞菌PAO-1株的抑制作用 *

宋 珍 李 镛 阴振晨 李擎天△

（上海交通大学医学院附属瑞金医院检验系 上海 200025）

摘要 目的：分析抗菌肽人β防御素3 (human β defensin 3，hBD3) 对铜绿假单胞菌PAO-1株的抑制作用。**方法：**合成抗菌肽hBD3，分别通过最低抑菌浓度（minimal inhibitory concentration，MIC）检测、直接杀菌试验、重要功能基因检测分析其对PAO-1的直接抑制作用；并将其与阿奇霉素、四环素、利福平、氯霉素、链霉素、环丙沙星联合施用，观察对抗生素MIC的影响。**结果：**HBD3对PAO-1的MIC为32 μg/mL；在浓度达到8 μg/mL时即有明显杀菌作用。HBD3上调PAO-1株的ahpF基因表达，下调aprA和rhlR基因表达。在联用5 μg/mL的hBD3后，四环素、利福平、氯霉素、链霉素、环丙沙星的MIC值均有降低。**结论：**抗菌肽hBD3对铜绿假单胞菌PAO-1株有显著的抑制作用。

关键词：抗菌肽；人β防御素3；铜绿假单胞菌；抑菌试验

中图分类号：R378 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2014)32-6225-04

The Inhibition on Pseudomonas Aeruginosa PAO-1 by Antimirobial Peptide Human β Defensin 3*

SONG Zhen, LI Yong, YIN Zhen-chen, LI Qing-tian△

(Department of Laboratory Medicine, Ruijin hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the inhibition effects of antimicrobial peptide human β defensin 3 (hBD3) against Pseudomonas aeruginosa PAO-1. **Methods:** Antimicrobial peptide hBD3 was synthesized. The direct inhibition on PAO-1 was detected with the MIC (minimal inhibitory concentration) test, antibacterial activity test and the analysis on some important functional genes. The peptide was combined with azithromycin, tetracycline, rifampin, chloramphenicol, streptomycin, and ciprofloxacin for the effect on antibiotic MIC values. **Results:** The MIC of hBD3 against PAO-1 is 32 μg/mL, the bactericidal activity was observed while the hBD3 concentration as high as 8 μg/mL. The peptide hBD3 can improve the expression of ahpF and reduce the expression of aprA and rhlR. When 5 μg/mL peptide was added, the MIC values against PAO1 of tetracycline, rifampicin, chloramphenicol, streptomycin were dropped down. **Conclusions:** There is considerable bactericidal activity of antimicrobial peptide hBD3 against P. aeruginosa PAO1.

Key words: Antimicrobial peptide; human β defensin 3; Pseudomonas aeruginosa; Antibacterial Test

Chinese Library Classification (CLC): R378 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)32-6225-04

前言

铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa, PA)在自然界广泛存在，是临床最常见的病原菌之一，在临床分离的革兰阴性病原菌中一直居于前列。铜绿假单胞菌是医院感染、导管相关感染、烧伤皮肤感染、重症监护病房（intensive care unit，ICU）感染的主要病原菌，可导致机体多个器官的感染，进而引起患者的败血症而致命[1]。近年来，多重耐药的铜绿假单胞菌的危害日趋严重，也越来越引起研究者的重视。在联合应用抗生素应对耐药铜绿假单胞菌感染的同时，研究者们也在探寻其他的有效应对方案。

目前，对抗生素外的感染应对手段的研究主要包括噬菌体[2]、细胞壁水解酶以及抗菌肽（抗微生物肽，Antimicrobial peptide, AMP）等[3]。AMP是一类小分子量蛋白，对细菌、病毒、真菌具有广谱抗菌活性。其中，人β防御素（human β defensin，hBD）是重要的人体AMP，人体上皮细胞、单核/吞噬细胞等多种细胞均可分泌hBD。人β防御素3（hBD3）能够在人体血清（生理性盐浓度）中发挥抑菌活性，因而最具应用潜力[4]。抗菌肽目前还没有投入临床应用，有研究认为抗菌肽的临床应用最有可能从治疗创伤性皮肤感染开始[5]。铜绿假单胞菌是烧伤等皮肤感染的最常见病原菌之一，因此，抗菌肽对铜绿假单胞菌的作用研究显得十分必要。

铜绿假单胞菌PAO1株最初分离自澳大利亚的一名烧伤后感染患者，是临床和实验室研究常用的铜绿假单胞菌标准菌株，已经过全基因组测序[6,7]。本研究通过体外抑菌试验、重要功能基因表达改变以及对主要抗生素的最低抑菌浓度（minimal

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81000708）

作者简介：宋珍（1986-），女，助理实验师，主要研究方向：细菌感染与免疫，电话：021-63846590-776469，E-mail：sz87zs@hotmail.com

△通讯作者：李擎天，电话：021-63846590-776561，E-mail：qingtianli@sjtu.edu.cn

（收稿日期：2014-04-25 接受日期：2014-05-25）

inhibitory concentration，MIC）的影响，来探讨将抗菌肽 hBD3 用于应对铜绿假单胞菌感染的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

铜绿假单胞菌菌株 PAO1 由本实验室保存。抗菌肽 hBD3 由上海科肽生物科技有限公司合成，全长为 45 个氨基酸，序列为 GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRK-CCRRKK。药敏试验 MH 肉汤及琼脂购自上海博微生物科技有限公司；细菌 RNA 抽提、反转录及定量 PCR 试剂盒等均购自天根公司；96 孔细胞培养板购自 BD 公司；荧光定量 PCR 反应在 ABI 7500 FAST 仪器（美国 ABI 公司）上进行。

1.2 方法

1.2.1 抗菌肽 hBD3 对铜绿假单胞菌 PAO1 的体外抑菌试验 MIC 测定时，按照梯度稀释的方法，在 96 孔细胞培养板上，用水解酪蛋白胨（MH）肉汤稀释冻存的 hBD3 为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 μg/mL 的浓度，每孔 100 L，再将浓度为 1 麦氏浊度的铜绿假单胞菌 PAO1 用 MH 肉汤稀释 100 倍，每孔加入 100 L。这样，各孔的 hBD3 的终浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/mL。将 96 孔细胞培养板置于 37 ℃孵育 18 小时，直接观察各孔是否有细菌生长。以没有细菌生长的最低 hBD3 浓度作为 hBD3 对 PAO1 的 MIC 值。

在定时杀菌计数的方法中，将新鲜培养的 PAO1 菌调至 10^6 CFU/mL 浓度后，分置 6 个实验管，每实验管 3 mL，分别加入 hBD3 直至终浓度为 0、4、8、16、32、64 μg/mL，置于 37 ℃孵育 3 小时，分别以梯度稀释平板涂布法检测各实验管的活菌浓度。

1.2.2 抗菌肽 hBD3 对铜绿假单胞菌 PAO1 重要功能基因表达的影响 将新鲜培养的 PAO1 菌调至 10^6 CFU/mL 浓度后，加入 hBD3 直至终浓度为 10 μg/mL，置于 37 ℃孵育 3 小时，抽提其 mRNA，以 16srDNA 基因为内参，用实时定量 PCR（Q-PCR）的 ΔΔCT 方法检测分析铜绿假单胞菌 PAO1 的 ahpF、pa3187、aprA、rhlR 和 rpoS 基因的表达情况，计算公式为实验组表达量 / 对照组表达量 $=2^{-\Delta\Delta CT}$。RNA 抽提、反转录及 Q-PCR 反应均按照天根公司试剂说明书及 ABI 7500 FAST 仪器说明书进行。

表 1 铜绿假单胞菌所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in P. aeruginosa

编号 No.	基因 Gene	引物序列 Primer sequences	来源 Sources
P1	16s rDNA	TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA	[8]
P2		GGTTTCGCTGCCCTTTGTATTGT	
P3	ahpF	ACCCAGTTGAAGGCCTACCT	[9]
P4		AGGGTGATCTTGTCGGTCAG	
P5	pa3187	AGTCGACCCTGATGAACTGC	[10]
P6		GTACAGGGCGTAGGACTGGA	
P7	aprA	CGGGGCGGGGACGAATTGGT	[8]
P8		GGGCCTGCTGCTGCGCGGAA	
P9	rpoS	CGATCATCCGCTTCCGACCAG	[8]
P10		CTCCCCGGGCAACTCCAAAAG	
P11	rhlR	CTCAGGATGATGGCGATTTC	[8]
P12		AATTTGCTCAGCGTGCTTTC	

1.2.3 抗菌肽 hBD3 作用于铜绿假单胞菌 PAO1 对抗生素 MIC 的影响 选用上述相同的微量肉汤稀释法，检测 PAO1 对抗生素阿奇霉素、四环素、利福平、氯霉素、链霉素、环丙沙星的 MIC 的影响。同时，在将 1 麦氏浊度的 PAO1 稀释 100 倍时，另作一组加入抗菌肽 hBD3 使得菌液的 hBD3 浓度为 10 μg/mL，即抗菌肽 hBD3 的最终作用浓度为 5 μg/mL。将 96 孔细胞培养板置于 37 ℃孵育 18 小时，直接观察各孔是否有细菌生长，以确定抗菌肽 hBD3 作用于铜绿假单胞菌 PAO1 之后，其对抗生素 MIC 的影响。

1.3 统计学方法

抑菌试验、基因表达检测及对抗生素 MIC 的影响均进行 3 次独立实验，取各自结果的平均值和标准差，采用 SPSS17.0 进行统计学分析，不同实验组间的存活菌菌量比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗菌肽 hBD3 对铜绿假单胞菌的抑菌作用

微量 MH 肉汤稀释法测得抗菌肽 hBD3 对铜绿假单胞菌 PAO1 株的 MIC 为 32 μg/mL。在体外定时杀菌试验中，当 hBD3 终浓度达到 8 μg/mL 时，3 小时后的菌量即与对照组有显著性差异（$P<0.05$），见图 1。

2.2 抗菌肽 hBD3 对铜绿假单胞菌 PAO1 毒力等重要基因表达的影响

根据 Q-PCR 测得的循环数（CT）计算所测基因的相对表达量，以 16srDNA 基因为内参，公式为实验组表达量 / 对照组表达量 $=2^{-\Delta\Delta CT}$。并以实验组表达量 / 对照组表达量的比值大于 2 判为表达显著上调，小于 0.5 判为表达显著下调。结果显示抗菌肽 hBD3 使 ahpF 的表达上调，而 aprA 和 rhlR 的表达下调；对 pa3187 和 rpoS 表达的影响不显著，见表 2。各检测基因的常规 PCR 检测结果见图 2。

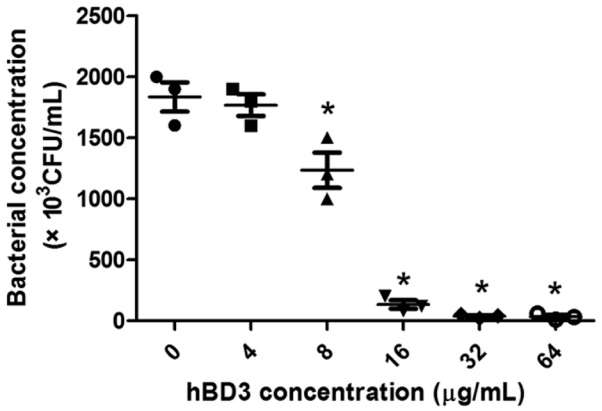

图 1 抗菌肽 hBD3 对铜绿假单胞菌 PAO1 的体外杀菌试验

Fig.1 In vitro bactericidal test of antimicrobial hBD3 against P. aeruginosa PAO1

注：CFU/ml；每毫升菌落形成单位；*，与对照组相比 P＜0.05。

Note: CFU/ml, colony formation unit per ml; *, P value ＜0.05 compared with control.

2.3 抗菌肽 hBD3 作用于铜绿假单胞菌 PAO1 对抗生素 MIC 的影响

MH 微量肉汤稀释法 MIC 检测结果显示，铜绿假单胞菌 PAO1 对阿奇霉素、四环素、利福平、氯霉素、链霉素、环丙沙星的 MIC 分别为 8、32、64、32、8 和 4 μg/mL。当加入抗菌肽 hBD3 至终浓度 5 μg/mL 时，阿奇霉素的 MIC 值没有改变，四环素、利福平、氯霉素、链霉素、环丙沙星的 MIC 分别为 1、4、8、1 和 1 μg/mL。

3 讨论

铜绿假单胞菌广泛分布于自然界及人的皮肤、肠道和呼吸道，具有极强的环境适应能力。该菌也分布在医院环境中，经各类器械而引起医院感染，尤以导管相关感染、ICU 感染、烧创伤后皮肤感染为重。铜绿假单胞菌主要通过诸如产酶(如超广谱 β- 内酰胺酶和金属酶等)、膜屏障与外排泵作用、改变药物靶点以及形成生物膜等不同机制对多种抗菌药物产生耐药。

表 2 铜绿假单胞菌的 ahpF、pa3187、aprA、rpoS 和 rhlR 基因表达情况

Table 2 Expression of ahpF, pa3187, aprA, rpoS, rhlR genes in P. aeruginosa

检测基因 Detected gene	ahpF	pa3187	aprA	rpoS	rhlR
与对照组表达量比值 Ratio compared to control	5.633± 1.656↑	0.613± 0.249	0.200± 0.278↓	1.470± 0.453	0.186± 0.217↓

注：比值大于 2 判为表达显著上调，比值小于 0.5 判为表达显著下调。

Note: Gene expression was significant improved when the ratio > 2 and reduced when the ratio < 0.5.

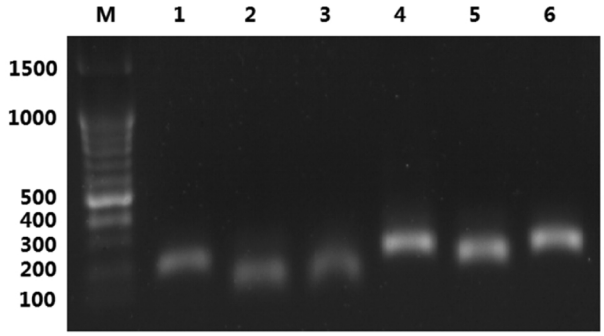

图 2 铜绿假单胞菌检测基因 PCR 电泳结果

Fig.2 PCR electrophoresis for detected genes of P. aeruginosa

注：M, 100bp marker; 1, 16srDNA; 2, ahpF; 3, pa3187; 4, aprA; 5, rpoS; 6, rhlR。

Note: M, 100bp marker; 1, 16srDNA; 2, ahpF; 3, pa3187; 4, aprA; 5, rpoS; 6, rhlR.

对于抗菌肽的杀抑菌能力测试方法，目前有两种主要观点。多数研究者认为，由于抗菌肽的稳定性相对有限，更适合用短时杀菌试验来评价其活性；但也有研究采用常用于抗生素药敏试验的经典的肉汤稀释法 MIC 测定[11,12]。本文分别使用这两种方法对抗菌肽 hBD3 对铜绿假单胞菌 PAO1 的作用进行了检测。结果发现抗菌肽 hBD3 对 PAO1 的 MIC 为 32 μg/mL，而在 3 小时杀菌试验中，8 μg/mL 的 hBD3 对 PAO1 已经有显著的杀菌作用。这一结果提示短时杀菌试验和经典 MIC 测定均可用于抗菌肽性能评价，有必要为此建立不同的评价标准。

本研究检测了铜绿假单胞菌 ahpF、pa3187、aprA、rpoS 和 rhlR 基因的表达情况。其中 ahpF 是铜绿假单胞菌氧化应激防御的重要基因，属于 oxyR-recG 操纵子成员，参与编码烷基过氧化物还原酶，是铜绿假单胞菌进行氧化应激防御和 DNA 修复的关键酶之一[13]。抗菌肽 hBD3 使得 ahpF 表达增加，表明它影响了病原菌生存的氧化还原环境状态，且可能影响到 DNA 的损伤与修复。AprA 编码碱性蛋白酶，是铜绿假单胞菌的毒力因子之一，该酶可降解宿主补体蛋白和细胞因子 [14]。抗菌肽 hBD3 对 aprA 的抑制，将有助于对宿主免疫系统蛋白成分的保护，从而提高机体应对铜绿假单胞菌感染的能力。RhlR 是铜绿假单胞菌的转录调节因子，其表达抑制与铜绿假单胞菌重要毒力性状的精细调节、群体感应以及细菌生物膜的形成有关[15,16]。由于生物膜的形成在铜绿假单胞菌感染中起重要作用[17]，下调 rhlR 基因的表达可通过干扰铜绿假单胞菌生物膜的形成来抑制其感染和致病，有望改善抗生素等其他治疗方案的疗效。此外，pa3187 编码的 ABC 转运结合蛋白可协助大分子进行穿膜转运；rpoS 编码 RNA 聚合酶，在细菌 RNA 合成和生物膜形成过程中有重要作用[18]；抗菌肽 hBD3 对于这两个病原体关键基因的表达也有一定影响。

本研究还检测了抗菌肽 hBD3 对抗生素阿奇霉素、四环素、利福平、氯霉素、链霉素、环丙沙星作用于 PAO1 的 MIC 的

影响。结果发现除了阿奇霉素以外,抗菌肽 hBD3 能有效降低多种抗生素对 PAO1 的 MIC。这一结果为抗菌肽的远景应用提供了佐证。由于抗菌肽目前还没有得到 FDA 的认证用于临床治疗,加之尚存在稳定性有限、潜在副作用以及对免疫系统的可能作用等限制因素,抗菌肽独立用于未来感染性疾病治疗的前景尚不明朗。本文结果显示,抗菌肽能有效降低多种抗生素对 PAO1 的 MIC,这可能对于临床上抑制耐药菌的不断蔓延提供一个新的可行方案。

包括 hBD3 在内的数以千计的抗菌肽的杀抑菌作用已经得到证实。假以时日,抗菌肽可能成为应对铜绿假单胞菌等病原菌引发的医院和社区感染的有效手段[19,20]。本文提出的建立抗菌肽杀抑菌作用的评判标准以及将抗菌肽联合抗生素用于铜绿假单胞菌的临床治疗,将在预防耐药性细菌产生和播散方面起到应有作用。

参 考 文 献(References)

[1] Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, et al. Infections caused by Pseudomonas aeruginosa[J]. Rev Infect Dis, 1983, 5(2): 279

[2] Fischetti VA. Phage antibacterials make a comeback [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(8): 734

[3] Parisien A, Allain B, Zhang J, et al. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides[J]. J Appl Microbiol, 2008, 104(1): 1

[4] Lee JK, Chang SW, Perinpanayagam H, et al. Antibacterial efficacy of a human beta-defensin-3 peptide on multispecies biofilms [J]. J Endod, 2013, 39(12): 1625

[5] Samy RP, Thwin MM, Chow VT, et al. Evaluation of antibacterial activity of proteins and peptides using a specific animal model for wound healing[J]. Methods Mol Biol, 2011, 716: 245

[6] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen [J]. Nature, 2000, 406(6799): 959

[7] Hare NJ, Solis N, Harmer C, et al. Proteomic profiling of Pseudomonas aeruginosa AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain[J]. BMC Microbiol, 2012, 12: 16

[8] Perez-Osorio AC, Williamson KS, Franklin MJ. Heterogeneous rpoS and rhlR mRNA levels and 16S rRNA/rDNA (rRNA gene) ratios within Pseudomonas aeruginosa biofilms, sampled by laser capture microdissection[J]. J Bacteriol, 2010, 192(12): 2991

[9] Tremblay J, Deziel E. Gene expression in Pseudomonas aeruginosa swarming motility[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 587

[10] Turner KH, Vallet-Gely I, Dove SL. Epigenetic control of virulence gene expression in Pseudomonas aeruginosa by a LysR-type transcription regulator[J]. PLoS Genet, 2009, 5(12): e1000779

[11] Li Q, Zhou Y, Dong K, et al. Potential therapeutic efficacy of a bactericidal-immunomodulatory fusion peptide against methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infection[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(1): 305

[12] Zhu C, Tan H, Cheng T, et al. Human beta-defensin 3 inhibits antibiotic-resistant Staphylococcus biofilm formation [J]. J Surg Res, 2013, 183(1): 204

[13] Ochsner UA, Vasil ML, Alsabbagh E, et al. Role of the Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF[J]. J Bacteriol, 2000, 182(16): 4533

[14] Bardoel BW, van Kessel KP, van Strijp JA, et al. Inhibition of Pseudomonas aeruginosa virulence: characterization of the AprA-AprI interface and species selectivity[J]. J Mol Biol, 2012, 415(3): 573

[15] Medina G, Juarez K, Valderrama B, et al. Mechanism of Pseudomonas aeruginosa RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter[J]. J Bacteriol, 2003, 185(20): 5976

[16] O'Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, et al. A quorum-sensing inhibitor blocks Pseudomonas aeruginosa virulence and biofilm formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(44): 17981

[17] Li P, Poon, YF Li, W, et al. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability [J]. Nat Mater, 2011, 10(2): 149

[18] 林萍, 赵雨璠, 吴悦, 等. 壳聚糖及其季铵盐对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响[J]. 检验医学, 2012, 27(10): 854
Lin Ping, Zhao Yu-fan, Wu Yue, et al. The influence of chitosan and quaternized chitosan on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation [J]. Laboratory Medicine, 2012, 27(10): 854

[19] 李晓平, 朱倩, 夏睿, 等. 一类蛙源非典型结构抗菌肽 cDNA 的克隆以及成熟肽的预测[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1429
Li Xiao-ping, Zhu Qian, Xia Rui, et al. Gene cloning of antimicrobial peptides with atypical structure and property prediction of mature peptides[J]. Pregress in Modern Biomedicine, 2010, 10(8): 1429

[20] 邹姗姗, 宫倩红, 尹守亮, 等. 铜绿假单胞菌群体感应抑制剂研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5): 949
Zou Shan-shan, Gong Qian-hong, Yin Shou-liang, et al. Research progress of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing inhibitors [J]. Pregress in Modern Biomedicine, 2010, 10(5): 949