

扶正解毒化痰方对多重耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 外排泵表达影响的研究

王玉婷¹ 徐红日² 赵世同¹ 程 森¹ 姚兴伟³ 常桂娇³ 陈师林¹ 王成祥⁴

(1 北京中医药大学东直门医院呼吸科,北京,100700; 2 北京中医药大学第三附属医院急诊科,北京,100029;

3 北京中医药大学东直门医院检验科,北京,100700; 4 北京中医药大学第三附属医院呼吸科,北京,100029)

摘要 目的:研究扶正解毒化痰方对多重耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 外排泵表达的影响。方法:针对筛选出的 MexAB-OprM 阳性的铜绿假单胞菌菌株,通过微量稀释法,测定哌拉西林-他唑巴坦的最小抑菌浓度和扶正解毒化痰方水提物的最小杀菌浓度,从而确定荧光定量 PCR 细菌样本时培养剂中哌拉西林-他唑巴坦和扶正解毒化痰方水提物的浓度。绘制细菌生长曲线,确定细菌样本的培养时间。利用实时荧光定量 PCR 技术检测药物干预前后 mexB、oprM、mexR 的表达量。结果:扶正解毒化痰方水提物能降低 MexAB-OprM 外排泵阳性 MDRPA 菌株的 mexB、oprM 表达量($P < 0.05$),同时能增加 mexR 的表达量($P < 0.05$)。结论:扶正解毒化痰方对 MDRPA 所致肺炎的作用机制之一可能是通过抑制 MexAB-OprM 外排泵的表达实现的。

关键词 扶正解毒化痰方;多重耐药铜绿假单胞菌;外排泵;MexAB-OprM;最小抑菌浓度;生长曲线;实时荧光定量 PCR;作用机制

Effects of Fuzheng Jiedu Huayu Decoction on the Expression of Efflux Pump MexAB-OprM of Multidrug-resistant *Pseudomonas Aeruginosa*

Wang Yuting¹, Xu Hongri², Zhao Shitong¹, Cheng Miao¹, Yao Xingwei³, Chang Guijiao³, Chen Shilin¹, Wang Chengxiang⁴

(1 Respiratory Department, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2 Emergency Department, Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China; 3 Clinical Laboratory Department, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 4 Respiratory Department, Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To study the effects of Fuzheng Jiedu Huayu Decoction on the expression of MexAB-OprM efflux pumps in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods:** The minimum inhibitory concentration of piperacillin-tazobactam and the minimum bactericidal concentration of the water extract of Fuzheng Jiedu Huayu Decoction were determined via microdilution method for selected MexAB-OprM positive *Pseudomonas aeruginosa* strains so as to determine the concentration of piperacillin-tazobactam and the water extract of Fuzheng Jiedu Huayu Decoction in the culture medium during the fluorescence quantitative PCR of bacterial samples. The bacterial growth curve was drawn and the culture time of the bacterial samples was determined. The expression levels of mexB, oprM, and mexR before and after drug intervention were detected by real-time fluorescence quantitative PCR technology. **Results:** The expression levels of mexB and oprM in MexB-OprM efflux pump positive strains were decreased after the intervention of Fuzheng Jiedu Huayu Decoction water extract ($P < 0.05$), and that of mexR was increased than before ($P < 0.05$). **Conclusion:** The therapeutic effect of Fuzheng Jiedu Huayu Decoction on pneumonia caused by MDRPA may be attributed to the inhibition of the expression of MexAB-OprM efflux pump.

Key Words Fuzheng Jiedu Huayu Decoction; *Pseudomonas aeruginosa*; Efflux pump; MexAB-OprM; Minimum inhibitory concentration; Growth curve; Real-time fluorescence quantitative PCR; Mechanism of action

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.04.014

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas Aeruginas*, PA) 是医院感染最常见的病原菌之一,尤以肺部感染最多见。PA 耐药形势严峻,1996—2010 年耐药 PA 感染所致菌血症患者病死率由 16% 升至 26%,耐

药 PA 感染已成为院内感染死亡的主因之一^[1-3]。PA 因其自身结构的特殊性,对多数抗菌药物天然耐药或获得性耐药^[4],且耐药机制复杂^[5],同时由于临床抗菌药物的不合理使用,细菌耐药逐年增

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81573924)

作者简介:王玉婷(1988.11—),女,博士研究生,研究方向:中医药治疗呼吸系统疾病,E-mail:13269225853@163.com

通信作者:王成祥(1963.06—),男,博士研究生,主任医师,院长,研究方向:中医药治疗呼吸系统疾病,E-mail:wang601@vip.sina.com

加,耐药机制不断变化,因此该菌引发的感染性疾病治疗难度不断增加。通过依据不同耐药机制来寻找或探索相应的抗菌药物已滞后于临床需求,难以及时应用于临床而起到预期的抗菌作用。据 NHSN 报道,细菌耐药性的增加明显限制了抗菌药物的选择,在过去 20 年已加速了抗菌药物的研发,但针对耐药 PA 感染,目前并无疗效更好的药物问世。因此,研发新的高效且低不良反应的药物迫在眉睫。

本课题组在“十一五”国家科技支撑计划项目证实,扶正解毒化痰方在老年性肺炎的治疗中,该方较单纯应用抗生素能够显著改善病程达 2 周以上患者的呼吸道症状,促进炎性反应病灶的吸收,提高病程较长老年患者耐药菌肺炎的临床有效率^[6]。经初步分析,扶正解毒化痰方的疗效机制可能与干预 PA 耐药的相关环节从而逆转 PA 的耐药性,或与抗生素起到协同抑菌增效作用有关。外排泵系统是 PA 固有耐药的主要机制,其中 MexAB-OprM 是最常见的药物外排系统。本研究将通过观察扶正解毒化痰方对多重耐药铜绿假单胞菌(MDRPA)的 MexAB-OprM 外排泵表达的影响,深入探索该复方的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 实验菌株由北京中医药大学东直门医院检验科细菌室提供。在从临床诊断为 MDRPA 感染所致肺炎患者深部呼吸道分泌物标本中分离、培养、纯化、鉴定所得的 18 株 MDRPA 的菌株中(编号为 P1~P18),利用碳酰-氰-间氯苯胺(CCCP)筛选出 MexAB-OprM 高表达株 P17, -80℃ 冰箱保存备用。质控菌株为 ATCC27853。

1.1.2 药物 扶正解毒化痰方:黄芩、连翘、漏芦、赤芍、瓜蒌、西洋参、败酱草、炒薏苡仁等组成。药物剂型为北京康仁堂药业有限公司制备的全有效成分提取配方颗粒。沸水溶解,用 0.22 μm 过滤器过滤,4℃ 冰箱低温保存备用。哌拉西林/他唑巴坦(TZP, Wyeth Lederle S. R. L., 产品批号:AKGD/11)购自北京中医药大学东直门医院西药库。

1.1.3 试剂与仪器 营养肉汤(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,OXOID CM1168,批号 1377374),RNAzol® RT、RNAprep Pure 总提取试剂盒(天根),逆转录试剂盒(DBI);荧光定量 PCR 检测试剂盒(Genecopies),DEPC(Vetec)。采用 BD Phoenix-100 system 全自动细菌分析仪(美国 BD 公司,型号 BD

Phoenix),恒温湿培养箱(上海一恒科技仪器有限公司,型号 LHS-250 HC-11),恒温震荡器(苏州培英实验设备有限公司,型号 MSG. N 180L),台式高速离心机(D3204R SCIllogex),荧光定量 PCR 仪(7500, ABI),微量核酸定量仪(Merinton, SMA4000);基因扩增仪(Stratagene Mx3000P)。

1.1.4 引物设计 委托上海生物工程有限公司合成序列。目的基因 mexB 片断长度为 130 bp,上游引物:5'-TCGAGGAGATCGTCAAGCAA-3',下游引物:5'-CAGAGGAACACCACCAGCAG-3'。目的基因 oprM 片断长度为 114 bp,上游引物:5'-ACGCGAAGATCCAGAAGGAC-3',下游引物:5'-GCAACTGCTCGGTGAAGGTA-3'。目的基因 mexR 片断长度为 142 bp,上游引物:5'-GCAGCTTC-CAGCTCTTCTC-3',下游引物:5'-CACTGGTCGAG-GAGATGCAC-3'。内参基因 rpsL 片断长度为 99 bp,上游引物:5'-AACTCGGCACTGCGTAAGGT-3',下游引物:5'-AACTCGGCACTGCGTAAGGT-3'。

1.2 方法

1.2.1 TZP 最小抑菌浓度(MIC)测定 利用微量稀释法,在 96 孔板 1~10 孔中加入 100 μL 肉汤,第 1 孔加入配置好的含有 4 096 μg/mL TZP 的肉汤 100 μL,将 TZP 进行对倍稀释;再往 12、13 孔加入 200 μL 肉汤分别作为阳性和阴性对照;配制菌液,分别往 1~11 孔中加入已调制好的菌液 10 μL,最终接种菌量约为 5×10^5 CFU/mL,重复 3 行。

上述 96 孔板振荡培养 18~24 h,放入酶标仪中检测,参数调整为 single,570 nm,读出相应的 OD 值。MIC 判定标准:抑菌率(%) = (阳性对照 OD 值 - 试验 OD 值) / (阳性对照 OD 值 - 阴性对照 OD 值) × 100 ≥ 80%。

1.2.2 扶正解毒化痰方最小杀菌浓度(MBC)测定 微量稀释法将中药水提物对倍稀释成 10 个梯度,第 1 孔浓度为 1.56 g/mL,11 孔为阳性对照,12 孔为阴性对照;配制菌液,往 1~11 孔中加入已调制好的菌液 10 μL,最终接种菌量约为 5×10^5 CFU/mL,重复 3 行。

上述 96 孔板振荡培养 18~24 h。实验结果判定:接种环挑取 96 孔板中 1~10 孔内菌液涂至增菌培养基血平板上,37℃ 恒温湿培养箱静置培养 18~24 h 观察结果。培养出 3 个菌落以内的浓度为中药水提物的最小杀菌浓度。

1.2.3 生长曲线测定 取 4 支 50 mL 无菌离心管,每只离心管中加入 30 mL 肉汤,于 1、2、3 管内加入

上述实验中配置的菌液 1.5 mL(菌液终浓度为 5×10^5 CFU/mL),前三管为平行实验组,第 4 管不加菌,为阴性对照组。将离心管放置于恒温振荡器中进行震荡培养,温度 37 ℃,转速 200 r/min。在菌液震荡培养的 0~24 h 中,每隔 1 h 使用酶标仪测定菌液的 OD_{570nm} 值,对 OD_{570nm} 值用统计软件进行分析,绘制标准生长曲线,确定 PCR 实验中所需 MDRPA 菌株样本的最佳培养时间。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分离提取总 RNA 1) 培养细菌:挑取单个细菌菌落分别置于含 TZP、中药水提物的营养肉汤及纯营养肉汤中,37 ℃ 过夜振荡(200 r/min)培养,收集 5 mL 含菌培养液,10 000 r/min 离心 1 min,尽量吸净上清。往沉淀中加入 1 mL RNazol® RT,反复吹打裂解细胞,裂解液转移至 2 mL 离心管中。2) 相分离:每 1 mL RNazol® RT 加入 400 mL ddH₂O,盖上盖子,振荡混匀约 15 s,室温静置 5~15 min。10 000 r/min 离心 15 min。3) 沉淀:转移上清至新的 2 mL 离心管中,加入等体积的异丙醇,室温静置 10 min。10 000 r/min 离心 10 min。4) 洗涤弃上清,余下沉淀加入 400 μL 75% 乙醇,混匀后 7 500 r/min 离心 1~3 min,此步重复 1 次。5) 溶解:弃上清,自然风干沉淀,加入 50 μL ddH₂O 溶解,即为总 RNA。

逆转录反应:取一 PCR 管,加入含 2 μg RNA 的溶液,加入 1 μL oligo(dT) 15,用无核糖核酸酶的去离子水补足至 12 μL,于 PCR 仪上 70 ℃ 保温 5 min,迅速置冰上冷却,依次加入 4 μL 5 × buffer,2 μL 10 mmol/L dNTPs,1 μL RNA inhibitor 和 1 μL 反转录酶,用枪抽吸混匀。于 PCR 仪上 42 ℃ 保温 30 min,结束后 80 ℃ 保温 5 min 灭活反转录酶。

定量 PCR 反应:使用 All in one qPCR Mix 进行定量 PCR 反应。取 0.2 mL PCR 管,配制如下反应体系:2 × All-in-One qPCR Mix 10.0 μL,PCR forward primer (2 μmol/L) 2.0 μL,PCR reverse primer (2 μmol/L) 2.0 μL,cDNA 2.0 μL,50 × Rox Reference Dye 0.4 μL,ddH₂O 3.6 μL。PCR 扩增反应条件:95 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 35 s,共进行 40 个循环。循环结束后从 55 ℃ 升高到 95 ℃ 获取熔解曲线。根据标准品反应后所得数值获得标准曲线,目的基因的反应则根据标准曲线进行定量分析。目的基因初始模板量与内参基因初始模板量的比值,为所测目的基因的相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

方差齐采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多重比较采用 LSD 法;方差不齐采用 Welch 近似方差分析,多重比较采用 Dunnett's T3 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微量稀释法测定 TZP 的 MIC 值 根据抑菌率 ≥80% 的 MIC 判定标准得出,P17 和 ATCC27853 菌株 TZP 的 MIC 值分别为 1 024 μg/mL 和 2 μg/mL。参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准^[7],MIC ≤16 μg/mL 即为敏感,ATCC27853 MIC 值可以验证实验方案的可行性,实验菌株 P17 对 TZP 耐药。

2.2 微量稀释法测定中药水提物的 MBC 值 将 96 孔板中 1~10 孔内菌液接种于血平板上,37 ℃ 恒温湿培养箱静置培养 18~24 h,结果显示只有初始浓度的孔未培养出菌落,最终确定扶正解毒化瘀方水提物的 MBC 值为 0.78 g/mL。

2.3 绘制多重耐药铜绿假单胞菌的标准生长曲线 酶标仪测得培养 24 h 的 MDRPA 实验管及阴性对照管的 OD_{570nm} 值。见表 1。

表 1 生长曲线各时间点的 OD_{570nm} 值

时间	OD 值($\bar{x} \pm s$)	时间	OD 值($\bar{x} \pm s$)	时间	OD 值($\bar{x} \pm s$)
1 h	0.046 ± 0.000	9 h	0.300 ± 0.040	17 h	0.583 ± 0.090
2 h	0.048 ± 0.001	10 h	0.432 ± 0.029	18 h	0.642 ± 0.050
3 h	0.051 ± 0.001	11 h	0.527 ± 0.037	19 h	0.694 ± 0.040
4 h	0.055 ± 0.001	12 h	0.635 ± 0.081	20 h	0.701 ± 0.033
5 h	0.078 ± 0.007	13 h	0.490 ± 0.035	21 h	0.681 ± 0.034
6 h	0.096 ± 0.013	14 h	0.495 ± 0.031	22 h	0.686 ± 0.004
7 h	0.122 ± 0.033	15 h	0.541 ± 0.053	23 h	0.734 ± 0.012
8 h	0.195 ± 0.048	16 h	0.537 ± 0.074	24 h	0.733 ± 0.004

OD_{570nm} 值反应菌液的浓度,OD_{570nm} 值越大菌液浓度越大,细菌生长数量越多。由上表可见在 24 h 内随着培养时间的增加细菌 OD_{570nm} 值逐渐增大,说明培养基中的 MDRPA 生长、繁殖菌量逐渐增多。以培养时间为横坐标,OD_{570nm} 值为纵坐标,绘制实验菌株 P17 的标准生长曲线。结果提示,在 0~6 h 细菌进入新的营养环境的适应阶段,细菌分裂很少,细菌数量增加不明显,为迟缓期,此阶段为细菌下一阶段的分裂增殖做准备。在 6~21 h 进入细菌的快速分裂增殖阶段,以指数方式增加,为指数增长期。21 h 后随着培养基中营养物质的消耗,代谢产物的累积,细菌的增殖和死亡达到平衡,细菌量维持在一定水平,进入平稳期。细菌在指数增长期基因复制处于较高水平,因此实验菌株 P17 在进行实时荧光定量 PCR 实验时,最佳的菌株样本制备时间为 18~21 h。见图 1。

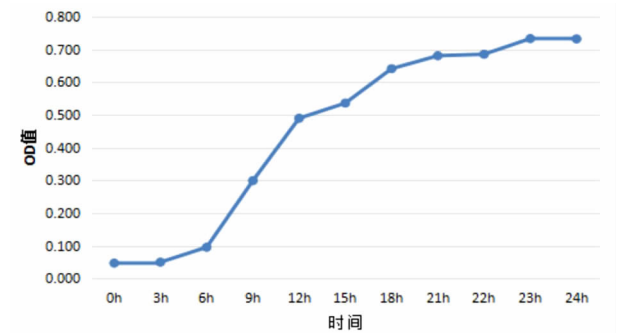


图1 P17的标准生长曲线

2.4 实时荧光定量 PCR 测定扶正解毒化疗方对 MexAB-OprM 外排泵表达的影响 根据预实验结果,实时荧光定量 PCR 菌株样本制备的营养基中 TZP 组 TZP 的浓度为 1/32MIC 值,即 32 μg/mL;扶正解毒化疗方水提物的浓度为 1/4MBC 值,即 0.195 g/mL。单纯营养肉汤培养的菌株样本作为空白对照组。空白对照组、TZP 组、扶正解毒化疗方水提物组 mexB、oprM、mexR 的表达量之间差异均有统计学意义($P<0.05$)。扶正解毒化疗方水提物干预组 mexB、oprM 的表达量较空白组降低,TZP 组较空白组增高。经 TZP 干预组和扶正解毒化疗方水提物干预组 mexR 表达量均高于空白组,TZP 干预组较扶正解毒化疗方水提物干预组升高明显。见表 2。

表 2 TZP 和扶正解毒化疗方干预后 mexB、oprM、mexR 的表达量($\bar{x} \pm s$)			
基因	编号	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	Mean
mexB	空白对照组	0.42 ± 0.06	
	TZP 干预组	1.12 ± 0.32 *	
	中药干预组	0.13 ± 0.01 * [△]	
oprM	空白对照组	0.40 ± 0.04	
	TZP 干预组	0.56 ± 0.12 [△]	
	中药干预组	0.32 ± 0.08 * [△]	
mexR	空白对照组	0.38 ± 0.11	
	TZP 干预组	0.63 ± 0.02 [△]	
	中药干预组	0.56 ± 0.11 * [△]	

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与 TZP 组比较,[△] $P<0.05$

3 讨论

主动外排系统的过度表达是 PA 固有耐药的重要原因之一。1993 年,首次报道 PA 外排泵的表达。许多革兰氏阴性杆菌均有外排泵,PA 外排泵是一种质子泵,可将多种药物泵出细胞并参从而产生多重耐药^[8]。根据 PA 全基因组序列分析,推测该菌至少有 12 种主动外排系统,至今已经通过基因检测发现了 7 种^[9]。MexAB-OprM 是在 PA 中发现的最主要的外排系统,也是临床上最常见的药物外排系统。MexAB-OprM 具有最广的底物特异性,包括 β-内酰胺类、β-内酰胺酶抑制剂、喹诺酮类、大环内酯类、四

环素类、氯霉素类、新生霉素类、磺胺类及甲氧苄氨嘧啶,可导致野生型 PA 对上述药物耐药^[10]。目前研究^[11-14]表明,MexAB-OprM 是惟一的确定存在于野生型 PA 中的外排蛋白,对其天生的耐药性起重要作用而 MexAB-OprM 的失活可恢复野生型 PA 对多种抗菌药物的敏感性。MexAB-OprM 由 MexAB-OprM 操纵子 mexO 编码,mexR、nalC、nalD 基因可负性调节操纵子 mexO 的表达,使 mexR 基因突变失活。mexB 和 oprM 基因位于同一个操纵子,mexR 是 MexAB-OprM 操纵子的上游基因序列,控制产生 MexAB-OprM 的阻遏蛋白 MexR^[15],mexR 的表达量增加,则会抑制 MexAB-OprM 外排泵基因的表达。

尽管抗菌药物的使用目前仍然是临床上治疗耐药菌感染最为常用的手段,但由于 PA 耐药机制复杂,抗生素的选择压力逐年增加。中医药是一个伟大的宝库,对于感染性疾病的治疗具有丰富的理论和临床实践基础。近年来中药治疗耐药菌感染的研究进展较快,取得了较为积极的成果。林冬玲^[16]等发现加味银翘散可通过降低 PA 外膜蛋白 OprD2 的表达而减弱其耐药性。李少滨等^[17]证实黄芩苷能够体外抑制 PA 生物膜的形成,从而降低 PA 的耐药性。

王淋荆等^[18]发现中药穿心莲、金银花、夏枯草和五倍子可通过促进外排泵基因的表达拮抗抗生素的抗菌作用。

本课题组在临床研究疗效肯定的基础上,选用 MDRPA 最为重要的外排泵耐药机制为切入点,对扶正解毒化疗方延缓或逆转 MDRPA 耐药性的相关机理进行深入研究。利用泵抑制剂和 PCR 法筛选出 MexAB-OprM 外排泵阳性的菌株,并对其用 TZP 和扶正解毒化疗方水提物进行干预培养。实时荧光定量 PCR 检测结果显示,扶正解毒化疗方水提物干预后 oprM 的表达量降低($P<0.05$),mexB 表达量显著降低($P<0.05$),mexR 表达量明显高于空白组($P<0.05$),表明扶正解毒化疗方治疗 MDRPA 感染所致肺炎的有效性可能是通过直接和间接抑制 MexAB-OprM 外排泵的表达,降低细菌耐药实现的。TZP 作为半合成青霉素与 β-内酰胺酶抑制剂的复合制剂,除其本身杀菌作用外,还可以通过促进产生阻遏蛋白 MexR,而抑制 MexAB-OprM 外排泵基因的表达,从而降低细菌耐药性。

近年来对中药抑菌作用的研究涉及到体外研究与体内研究。体外研究多从单味中药或中药复方对细菌的直接抑菌作用入手探讨中药的抑菌机制。但

综合分析目前中药的体外抑菌研究,未能得出令人满意的结果。并且,在组方用药方面,目前的体外实验用药多局限于清热解毒类药物,较少涉及含有扶正类药物的中药复方。因此,进一步的研究,应在传统中医理论的指导下,辨病与辨证相结合,更加重视耐药菌感染肺炎病机中正气不足的因素,采用更为切合病机的中药复方进行干预,深入挖掘中药在直接抑菌、逆转 PA 耐药及与抗生素协同抑菌等方面的作用机制和巨大潜力,从而多角度、多层面探索中医药对于耐药菌感染性疾病的疗效机制。

参考文献

- [1] Werth B J, Carreno J J, Reveles K R. Shifting trends in the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in hospitalized adults in the United States from 1996-2010[J]. American journal of infection control, 2015, 43(5): 465-468.
- [2] Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, et al. Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality associated with bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2017, 61(6): e02671-16.
- [3] Gonçalves I R, Dantas R C C, Ferreira M L, et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; association with virulence genes and biofilm formation[J]. brazilian journal of microbiology, 2017, 48(2): 211-217.
- [4] 曾为伦, 吴海鸥, 章如玲, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌的相关耐药机制研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(5): 377-381.
- [5] 谢朝云, 蒙桂鸾等. 耐多药铜绿假单胞菌感染临床特征及相关因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(11): 1617-1620.
- [6] Xu H, Li M, Wang C, et al. Evaluation on clinical efficacy of Fuzheng Jiedu Huayu Decoction combined with antibiotics in the treatment of pneumonia in the elderly-A multi-center, double-blind, parallel, randomized controlled trial[J]. Complementary therapies in medicine, 2018, 37: 127-132.
- [7] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-seventh informational supplement[S]. CLSI documents M100-S27, CLSI, 2017: 40-42.
- [8] Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm[J]. Virulence, 2013, 4(3): 223-229.
- [9] Li Y, Mima T, Komori Y, et al. A new member of the tripartite multi-drug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Antimicrob Agents Chem-ther, 2003, 47(3): 1101-1111.
- [10] S. Islam, H. Oh, S. Jalal, F. Karpati, O. Ciofu, N. Hoiby, B. Wretling. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2009, 15(1): 345-348.
- [11] Choudhury D, Ghosh A, Dhar C D, et al. Premature Termination of MexR Leads to Overexpression of MexAB-OprM Efflux Pump in *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Referral Hospital in India[J]. Plos One, 2016, 11(2): e0149156.
- [12] Anandapadamanaban M, Pilstål R, Andresen C, et al. Mutation-induced population shift in the MexR conformational ensemble disengages DNA binding; a novel mechanism for MarR family derepression[J]. Structure, 2016, 24(8): 1311-1321.
- [13] Suresh M, Nithya N, Jayasree P R, et al. Mutational analyses of regulatory genes, mexR, nalC, nalD, and mexZ, of mexAB-oprM, and mexXY, operons, in efflux pump hyperexpressing multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2018, 34(6): 83.
- [14] 魏光, 叶英, 郑美娟, 等. 碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌外排泵 MexAB-OprM 的研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(3): 193-198.
- [15] Starr L M, Fruci M, Poole K. Pentachlorophenol Induction of the *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM Efflux Operon: Involvement of Repressors NalC and MexR and the Antirepressor ArmR[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e32684-e32684.
- [16] 林冬玲, 伍彬宁, 等. 加味银翘散对铜绿假单胞菌外膜蛋白 OprD2 干预作用[J]. 中国热带医学, 2017, 17(12): 1181-1183, 1228.
- [17] 李少滨, 方泓, 成颜琦, 等. 黄芩苷、黄芪甲苷对铜绿假单胞菌生物膜的体外干预实验研究[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(11): 63-67, 83.
- [18] 王淋荆, 曾建明, 鲁鲁, 等. 中药对多重耐药铜绿假单胞菌外排泵的作用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(06): 401-407, 362.

(2018-06-28 收稿 责任编辑: 芮莉莉)