

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.003

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.003

阿司匹林对耐药幽门螺杆菌的体外影响

祝喜萍, 任旭, 孙晓玲, 林喜杰, 李锐, 于丹, 薛兆国, 杨月

(黑龙江省医院消化病院消化内科, 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 探讨阿司匹林(aspirin)对幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, HP)克拉霉素耐药性的影响, 并分析其可能的作用机制。方法: 通过克拉霉素药物浓度倍增的方法诱导体外培养的HP26695获得HP26695克拉霉素耐药菌株。采用琼脂稀释法检测阿司匹林对耐药菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 而后通过低浓度的阿司匹林持续培养耐药菌30 d, 检测其对克拉霉素耐药性的变化, 并采用实时荧光定量PCR检测外排泵系统基因hefABC的表达情况。结果: HP26695利用克拉霉素药物浓度倍增法成功诱导出HP26695克拉霉素耐药菌株, 其MIC稳定为8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。阿司匹林可剂量依赖性抑制HP26695克拉霉素耐药菌的体外生长。低剂量阿司匹林体外持续作用30 d可降低克拉霉素对HP26695克拉霉素耐药菌的MIC, 增加耐药菌的敏感性; 但并不影响耐药菌外排泵基因hefABC的表达。结论: 阿司匹林对HP26695克拉霉素耐药菌具有一定的生长抑制作用, 并可提高其对克拉霉素的敏感性; 但该作用与耐药菌外排泵基因hefABC的表达无关。

[关键词] 阿司匹林; 幽门螺杆菌; 克拉霉素耐药; 外排泵系统

Effect of aspirin on resistant *helicobacter pylori* in vitro

ZHU Xiping, REN Xu, SUN Xiaoling, LIN Xijie, LI Rui, YU Dan, XUE Zhaoguo, YANG Yue

(Department of Gastroenterology, Digestive Disease Hospital, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, China)

Abstract **Objective:** To evaluate the effect of aspirin on the clarithromycin resistance of *helicobacter pylori* (HP) and explore its possible mechanism. **Methods:** HP26695 clarithromycin resistant strain was obtained by multiple concentration of clarithromycin stimulation to HP26695 standard strain. Agar dilution method was used to detect the minimum inhibitory concentration (MIC) of aspirin to HP26695 clarithromycin resistant strain. After clarithromycin resistant HP was cultured in medium with low concentrate aspirin for 30 days, its resistance to clarithromycin was detected, and the gene expression of efflux pump system hefABC was measured by quantitative real-time PCR. **Results:** HP26695 clarithromycin resistant strain was successively obtained with multiple concentration of clarithromycin stimulation, and its MIC was 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After incubated with low concentrate aspirin for 30 days, the MIC of HP26695 clarithromycin resistant strain was declined and its sensitivity to

收稿日期 (Date of reception): 2018-11-19

通信作者 (Corresponding author): 祝喜萍, Email: zhuxiping23@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 黑龙江省自然科学基金 (H2016043)。This work was supported by the Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation, China (H2016043).

clarithromycin was increased, while the gene expression of efflux pump system *hefABC* in clarithromycin resistant *HP* hadn't changed. **Conclusion:** Aspirin could inhibit the growth of clarithromycin resistant *HP* at some point, and enhanced its sensitivity to clarithromycin, while this action was not associated with the gene expression of efflux pump system *hefABC*.

Keywords aspirin; *helicobacter pylori*; clarithromycin resistance; efflux pump system

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *HP*)是一种微需氧的螺旋形革兰氏阴性病原菌,可长期定植于人胃黏膜,诱发胃炎、胃溃疡等常见胃肠道疾病^[1-2],同时也是胃癌以及相关肿瘤的重要危险因素^[3-4]。目前临床上治疗*HP*感染的主要疗法是合并使用2种抗生素,同时使用1种胶体铋过质子泵抑制剂的三联或四联疗法^[2]。其中,克拉霉素(*clarithromycin*, *CLR*)是根治*HP*感染疗效最强的抗生素之一。研究^[5]表明:*HP*对克拉霉素的耐药性是导致联合方案治疗失败的重要原因。关于其耐药机制的研究^[5-6]显示:细菌外排泵系统的主动外排作用以及对药物的渗透性降低是细菌抗生素耐受性出现的主要机制。早期研究^[7-8]表明:非甾体抗炎药阿司匹林可抑制多种细菌的生长,并影响某些细菌毒力因子的合成。Zhang等^[9]研究明确提示:包括阿司匹林、吲哚美辛、塞来昔布和水杨酸钠在内的非甾体抗炎药可浓度依赖性的抑制*HP*的体外生长。但是关于阿司匹林在*HP*克拉霉素耐药中的相关作用,目前尚缺乏足够的研究资料。在众多细菌的耐药机制中,细菌对药物的主动外排作用是最为重要的一种。有报道^[10]显示RND家族的*hefABC*基因参与影响*HP*多药耐药性。因此本研究以HP26695标准菌株为研究对象,首先通过药物浓度倍增的方法构建*HP*克拉霉素耐药菌株,并检测阿司匹林对其生长的影响,初步分析阿司匹林对耐药*HP*的作用;然后通过低浓度的阿司匹林持续培养耐药菌,分析其耐药性的变化及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

幽门螺杆菌HP26695由中国疾控中心流行病学研究惠赠;阿司匹林及克拉霉素均购自美国Sigma公司;新生牛血清(Newborn Calf Serum, NBCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;克拉霉素E-test药敏试纸购自法国bioMerieux公司;SYBR Green I real-time PCR kit由上海吉玛制药技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 HP26695 的培养及耐药菌株的筛选

实验用幽门螺杆菌HP26695常规培养于预先配置好并经高压灭菌的固体或液体培养基(含10%NBCS)中。培养箱条件设置为温度37℃,10%CO₂,5%O₂,85%N₂,间隔1~2 d传代;于液体培养基中培养时需将培养液密封后置于37℃的恒温摇床中,设置转速为120 r/min。体外培养的HP26695利用克拉霉素药物浓度倍增的方法构建HP26695克拉霉素耐药菌株。具体方法如下:先将HP26695标准菌株接种于不含抗生素的平板培养基中培养3代,然后挑菌接种于含克拉霉素[浓度为1/2最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)]平板培养基中培养;至细菌性状稳定后,挑选耐药菌落接种至含克拉霉素(浓度倍增)的平板培养基中;重复上述步骤,直至达到最高浓度。测定其MIC后将所得耐药菌株培养于含低浓度的克拉霉素培养基中,以保证其耐药性。

1.2.2 E-test 药敏试验测定细菌的 MIC

克拉霉素的E-test药敏试纸条共有15个浓度梯度,跨度范围为0.015~256 μg/mL。首先将菌液稀释至10⁷个/mL,取500 μL的菌液均匀涂布至平板细菌培养基上,静置约3 min,待培养基表面晾干后贴上克拉霉素E-test试纸条。置于微需氧环境中培养5 d并直接读取MIC结果。

1.2.3 琼脂稀释法检测阿司匹林对 *HP* 的 MIC

通过倍比稀释法配置含不同浓度阿司匹林的细菌培养基(阿司匹林的终浓度为1, 2, 4, 8, 10 mmol/L),将稀释好的菌液接种于含药平板培养基上,置于微需氧环境中培养72 h并观察细菌的生长状况,以不出现*HP*菌落的平板所含的药物浓度为其MIC。不含阿司匹林的平板培养基作为对照操作。

1.2.4 平板菌落计数法检测药物对 *HP* 的生长抑制作用

挑选菌落接种于含药物的液体培养基中,置于微需氧环境中以120 r/min震荡培养,每隔2 h分别从培养液中取等量的菌液,稀释后分别涂布于平板培养基中。置于微需氧环境中培养72 h,肉眼

计数各培养基中生长的单个菌落数, 计算存活率并绘制生长抑制曲线。

1.2.5 低浓度阿司匹林压迫培养耐药菌

挑取HP26695克拉霉素耐药菌接种至液体培养基中, 置于微需氧环境中以120 r/min震荡培养48 h; 取菌液稀释后接种至含1/2 MIC浓度的阿司匹林液体培养基中, 再次置于微需氧环境中以120 r/min震荡培养, 每5 d传代1次, 共培养30 d。用于检测其耐药性的变化。

1.2.6 实时荧光定量PCR

使用无菌的PBS将各培养基中的HP洗涤下来, 离心(4 °C, 8 000 r/min)收集菌体。依据TRIzol一步法说明书提取各组菌体中的总RNA, 并通过分光光度计测定所提RNA样品的纯度。定量后取2 μg总RNA经反转录酶反转录至终体积为20 μL的cDNA, 然后依照SYBR Green实时荧光PCR试剂盒说明采用PRISM7700型荧光定量PCR仪检测外排泵基因hefABC的表达。16S rRNA为内参, 引物设计如下: hefA上游引物为5'-AGGGCGTTTTGGGAATTTCT-3'; 下游引物为5'-GCATGATGGATTGTTTTTGCA-3'; hefB上游引物为5'-AGGGCGATGTTTTGTTGCTT-3'; 下游引物为5'-CCCCAATTTTGCTGTATCGT-3'; hefC上游引物为5'-GTTTTCGTTCTTGCGTAACG-3'; 下游引物为5'-TGTTTAATGAAAAGCCCATCCA-3'; 16S rRNA上游引物为5'-CCGCCTACGCGCTCTTTAC-3'; 下游引物为5'-CTAACGAATAAGCACCGGCTAAC-3'。

PCR反应条件: 95 °C预变性3 min, 然后进行40个循环(94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s), 最后72 °C延伸5 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因相对表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析。实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组计量资料的组间差异采用t检验, 多组计量资料行单因素方差分析, 同时采用Bonferroni校正的t检验进行均数组间的两两比较, 计数资料的比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 克拉霉素耐药HP的建立

利用克拉霉素浓度倍增的方法成功获得稳定

的HP26695克拉霉素耐药菌株(标记为CLR-HP), 其MIC稳定为8 μg/mL, 是HP26695标准菌株的64倍(HP26695标准菌株的MIC为0.125 μg/mL), 可用于后续实验。

2.2 阿司匹林对HP的生长抑制作用

采用琼脂稀释法检测阿司匹林对HP26695标准菌株以及克拉霉素耐药菌株的MIC, 结果显示阿司匹林对幽门螺杆菌HP26695标准菌株的MIC为2 mmol/L, 对HP26695克拉霉素耐药菌株的MIC为8 mmol/L。同时将菌体接种至含不同浓度阿司匹林的液体培养基中, 每12 h记录其OD₆₀₀的值, 结果显示(图1): 阿司匹林可剂量依赖性地抑制HP26695耐药菌株的生长。

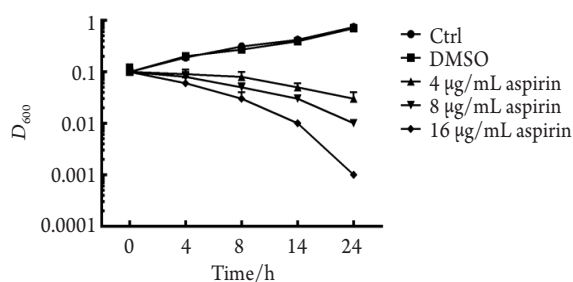


图1 阿司匹林对CLR-HP菌株体外生长的作用

Figure 1 Effect of aspirin on the growth of CLR-HP

2.3 阿司匹林压迫培养对耐药HP的作用

采用低剂量阿司匹林压迫培养耐药菌株30 d, 所得菌株标记为(aspirin-HP)之后测定其MIC, 结果显示: 克拉霉素对耐药菌株的MIC由8 μg/mL降低至4 μg/mL。随后取等量的aspirin-HP和CLR-HP菌株用6 μg/mL的克拉霉素处理, 间隔2 h测量菌落的存活率, 并绘制生长抑制曲线。结果如图2所示: 2株菌株的存活率均随着时间的延长逐渐下降; 在2 h时, aspirin-HP菌株的存活率已不足10%, 而此时CLR-HP菌株的存活率仍可达(53.2±1.58)%; 到8 h时, aspirin-HP菌株的存活率降至0.1%, CLR-HP菌株的存活率维持在(20.36±1.07)%。结果表明经过低剂量阿司匹林压迫培养后, HP克拉霉素耐药菌对克拉霉素的敏感性增加。

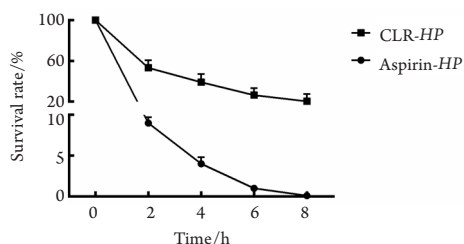


图2 克拉霉素对CLR-HP和aspirin-HP菌株体外生长的影响
Figure 2 Effect of clarithromycin on the growth of CLR-HP and aspirin-HP

2.4 阿司匹林压迫培养对耐药 HP 外排泵基因表达的影响

为初步分析阿司匹林逆转HP26695克拉霉素耐药的可能机制, 本研究采用16S rRNA为内参, 测定了外排泵基因hefABC的表达情况。结果如图3所示, 相较于CLR-HP菌株, 经过低浓度阿司匹林持续压迫培养的aspirin-HP菌株中hefA, hefB, hefC的基因表达均未出现显著变化; 相较于HP26695标准菌株, CLR-HP菌株中hefA, hefB, hefC的基因表达水平显著升高。提示外排泵基因hefABC参与HP克拉霉素耐药, 但阿司匹林提高耐药菌对克拉霉素的敏感性与外排泵基因的表达没有显著相关性。

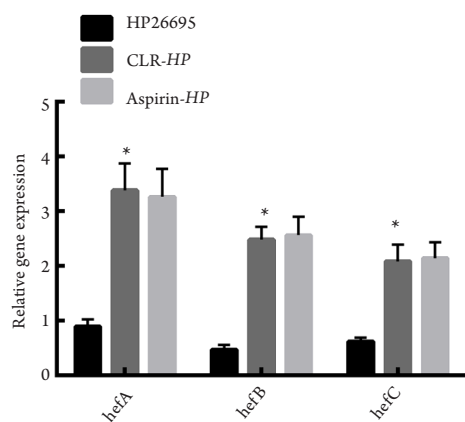


图3 HP26695, CLR-HP以及aspirin-HP菌株中, hefABC基因的表达情况

Figure 3 Gene expression of hefABC in HP26695, CLR-HP and aspirin-HP

* $P < 0.05$ vs HP26695.

3 讨论

阿司匹林是一种非甾体抗炎药物, 可通过抑制环氧酶(COX)从而阻断花生四烯酸转化为前

列腺素; 小剂量的阿司匹林还可通过抑制血栓烷A₂(TXA₂)的合成发挥抗血小板聚集的作用^[11]。此外还有研究^[12-14]显示: 阿司匹林还可通过促进上皮细胞的凋亡和调节血管新生等对某些肿瘤, 如食管癌、胃癌以及结肠癌等, 产生一定的预防作用。且阿司匹林可体外抑制HP等细菌的生长^[9]。但阿司匹林对耐药HP的作用并无系统的研究。本研究首先利用克拉霉素浓度倍增的方法构建幽门螺杆菌HP26695克拉霉素耐药菌株, 最终成功获得稳定的HP26695克拉霉素耐药菌株, 其MIC稳定为8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可用于后续的实验。本研究随后分析了阿司匹林对耐药菌株体外生长的作用, 结果显示: 阿司匹林对幽门螺杆菌HP26695及其克拉霉素耐药菌株均具有生长抑制作用; 而阿司匹林对幽门螺杆菌HP26695标准菌株的MIC为2 mmol/L, 对HP26695克拉霉素耐药菌株的MIC为8 mmol/L, 说明其对标准菌株的抑菌效果优于耐药菌株。

细菌对抗生素产生耐药性是药物治疗失败的主要原因。本研究进一步通过小剂量的阿司匹林持续压迫培养耐药HP 30 d, 分析其对克拉霉素耐药性的变化。琼脂稀释法测定MIC的结果显示: 克拉霉素对耐药菌株的MIC由8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降低至4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此外, 绘制的体外生长抑制曲线显示: 经过低剂量阿司匹林长期压迫培养后, HP克拉霉素耐药菌对克拉霉素的敏感性增加, 表明阿司匹林可部分逆转耐药HP对克拉霉素的耐受性。关于HP克拉霉素耐药性的产生机制, 目前有研究^[15-16]认为: HP23S rRNA基因结构域V发生突变, 进而减弱克拉霉素与细菌的亲合力, 使药物无法达到杀菌抑菌的目的。但是也有研究^[17]显示: 许多HP耐药菌株中并未检测到23S rRNA基因的突变, 说明该基因突变并不是HP耐药的唯一机制。在众多细菌的耐药机制中, 细菌对药物的主动外排作用是最为重要的一种。目前已确定的外排泵系统包括5个家族: ABC家族、MFS家族、RND家族、MATE家族以及SMR家族^[18-19], 其中hefABC属于RND家族。Liu等^[10]的报道指出: 在包括HP NCTC11637在内的20株HP中, hefA基因的表达在耐药株中显著升高, 且敲除外排泵基因可显著提高HP对多种抗生素的敏感性。本研究检测了细菌外排泵系统基因hefABC的表达, 结果显示: 相较于HP26695标准菌株, 耐药菌株中hefA, hefB, hefC的基因表达水平显著升高, 但经过低浓度阿司匹林持续压迫培养的耐药菌株中hefA, hefB, hefC的基因表达与耐药菌株相比, 并无显著变

化;提示外排泵基因 *hefABC* 参与 *HP* 克拉霉素耐药,但阿司匹林提高耐药菌对克拉霉素的敏感性与外排泵基因的表达没有显著关系。除外排泵基因外,药物作用靶点的改变以及生物膜的形成降低渗透性等作用也是常见的细菌耐药机制^[20-21],但是这些作用以及相关的信号通路是否参与阿司匹林提高耐药菌对克拉霉素的敏感性,甚至其中具体的作用机制还需进一步深入的研究。

综上所述,通过克拉霉素浓度倍增的方法可成功构建 *HP* 耐药菌株,且阿司匹林可体外抑制耐药 *HP* 耐药菌的生长;此外,小剂量阿司匹林长期压迫培养可提高耐药 *HP* 对克拉霉素的敏感性,但这一作用不涉及外排泵系统基因的异常表达。

参考文献

- Burucoa C, Axon A. Epidemiology of helicobacter pylori infection[J]. *Helicobacter*, 2017, 22 Suppl 1.
- Du LJ, Chen BR, Kim JJ, et al. Helicobacter pylori eradication therapy for functional dyspepsia: systematic review and meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(12): 3486-3495.
- Amieva M, Peek RM Jr. Pathobiology of helicobacter pylori-induced gastric cancer[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(1): 64-78.
- McClain MS, Beckett AC, Cover TL. Helicobacter pylori vacuolating toxin and gastric cancer[J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(10): E316.
- Hu Y, Zhu Y, Lu NH. Novel and effective therapeutic regimens for helicobacter pylori in an era of increasing antibiotic resistance[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 168.
- Zhang M. High antibiotic resistance rate: a difficult issue for helicobacter pylori eradication treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(48): 13432-13437.
- Wang H, Anthony D, Yatmaz S, et al. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces pneumococcal lung infection and inflammation in a viral and bacterial coinfection pneumonia model[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(18): 2347-2362.
- El-Mowafy SA, Abd El Galil KH, El-Messery SM, et al. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microb Pathog*, 2014, 74: 25-32.
- Zhang XP, Wang WH, Tian Y, et al. Aspirin increases susceptibility of *Helicobacter pylori* to metronidazole by augmenting endocellular concentrations of antimicrobials[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(8): 919-926.
- Liu ZQ, Zheng PY, Yang PC. Efflux pump gene *hefA* of helicobacter pylori plays an important role in multidrug resistance[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(33): 5217-5222.
- Capodanno D, Angiolillo DJ. Aspirin for primary cardiovascular risk prevention and beyond in diabetes mellitus[J]. *Circulation*, 2016, 134(20): 1579-1594.
- Burn J, Sheth H. The role of aspirin in preventing colorectal cancer[J]. *Br Med Bull*, 2016, 119(1): 17-24.
- Dai X, Yan J, Fu X, et al. Aspirin inhibits cancer metastasis and angiogenesis via targeting heparanase[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(20): 6267-6278.
- Kim YI, Kim SY, Kim JH, et al. Long-term low-dose aspirin use reduces gastric cancer incidence: a nationwide cohort study[J]. *Cancer Res Treat*, 2016, 48(2): 798-805.
- Çağan-Appak Y, Gazi H, Ayhan S, et al. Clarithromycin resistance and 23S rRNA gene point mutations of *Helicobacter pylori* infection in children[J]. *Turk J Pediatr*, 2016, 58(4): 371-376.
- Redondo JJ, Keller PM, Zbinden R, et al. A novel RT-PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mediated by mutations in the 23S rRNA gene[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 90(1): 1-6.
- Serrano CA, Leon MA, Palma C, et al. Helicobacter pylori-clarithromycin resistance in symptomatic pediatric patients in a high prevalence country[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2017, 64(3): e56-e60.
- Wang-Kan X, Blair JMA, Chirullo B, et al. Lack of AcrB efflux function confers loss of virulence on salmonella enterica serovar typhimurium[J]. *MBio*, 2017, 8(4).
- Molale LG, Bezuidenhout CC. Antibiotic resistance, efflux pump genes and virulence determinants in *Enterococcus spp.* from surface water systems[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23(21): 21501-21510.
- Waclaw B. Evolution of drug resistance in bacteria[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 915: 49-67.
- Abadi ATB. Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(35): 6379-6384.

本文引用: 祝喜萍, 任旭, 孙晓玲, 林喜杰, 李锐, 于丹, 薛兆国, 杨月. 阿司匹林对耐药幽门螺杆菌的体外影响[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(5): 928-932. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.003
Cite this article as: ZHU Xiping, REN Xu, SUN Xiaoling, LIN Xijie, LI Rui, YU Dan, XUE Zhaoguo, YANG Yue. Effect of aspirin on resistant *helicobacter pylori* in vitro[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(5): 928-932. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.003