

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.11.021

• 综述 •

结核分枝杆菌耐药表型与耐药基因型相关性研究进展

Advances in correlation between drug resistance phenotype and genotype of *Mycobacterium tuberculosis*

陈 珊(CHEN Shan)¹, 刘厚明(LIU Hou-ming)², 单万水(SHAN Wan-shui)²

(1 广东医科大学, 广东 湛江 524000; 2 深圳市第三人民医院, 广东 深圳 518000)

(1 Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China; 2 The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, China)

[关键词] 结核分枝杆菌; 分子机制; 表型耐药; 耐药基因

[中图分类号] R378.91⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2016)11-0883-04

20 世纪 80 年代以来, 结核病 (tuberculosis, TB) 疫情呈全球性回升趋势, 我国作为全球最大的发展中国家, 同时也是全球 TB 疫情最严重的国家之一^[1]。随着全球耐药结核病 (drug-resistant tuberculosis, DR-TB) 的出现和传播, 特别是耐多药结核病 (multidrug-resistant TB, MDR-TB)、广泛耐药结核病 (extensively drug-resistant TB, XDR-TB), 以及全耐药结核病 (totally drug-resistant TB, TDR-TB) 发生率的增高, 全球 TB 的有效治疗和控制受到严重威胁。深入研究结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 的耐药分子机制, 发现基因突变是 MTB 产生耐药的重要原因。现就各抗结核药物的耐药表型与耐药基因型的相关性研究进行综述。

1 MTB 耐利福平 (rifampin, RFP)

RFP 为半合成广谱杀菌剂, 是最有效的抗结核药物之一, 在短期化学治疗中起重要作用。RFP 通过与细菌 RNA 聚合酶的 β 亚单位牢固结合, 抑制细菌 mRNA 的合成, 防止该酶与 DNA 连接, 从而干扰、阻断 RNA 转录过程。MTB RNA 聚合酶 β 亚单位由 *rpoB* 基因编码, 当 *rpoB* 基因个别密码子发生突变时, DNA 依赖性 RNA 聚合酶 β 亚单位的空间构象发生改变, 无法与 RFP 结合, 从而表现为耐药。

现已知 95%~99% 的 MTB 耐 RFP 主要是因

rpoB 基因在 507-533 位密码子共 81 bp 的核心区域内 (rifampicin resistance determining region, RRDR)^[2-3] 碱基发生突变、缺失、颠换等导致。最常见的突变位点为 531 位点 TCG(Ser)-TTG(Leu), 526 位点 CAC(His)-TAC(Tyr)、GAC(Asp)、CTC(Leu), 516 位点 GAC(Asp)-GTC(Val)^[4]。已发现的突变位点还有 450、511、512、513、514、515、517、518、522、524、530、533 位点等。近年来, RFP 耐药基因 *rpoB* 的突变特征成为各国研究热点, 不同国家报道的 *rpoB* 基因突变位点及每个位点的突变率并不完全相同。孟加拉的研究^[5] 表明, 207 株耐 RFP 菌株中, 最常见的突变位点为 531(57.4%), 其次 526(22.9%)、516(7.3%), 个别菌株在 513、530、533 位点突变, 另有 5% 耐药菌株未发现基因突变。在 531 位点有相似突变率的国家不在少数, 如尼泊尔为 57.8%^[6], 摩洛哥为 59.6%^[7], 新加坡为 54.9%^[8], 泰国为 58.5%^[9], 巴西为 56.1%^[10] 等; 较高突变率的国家有西班牙 (72.3%)^[11]、缅甸 (63.6%)^[12]。由此可见, *rpoB* 基因有明显的地域性突变差异。针对耐 RFP 临床分离株的研究中发现 (MIC 法测定结果), RRDR 区域内不同碱基突变耐 RFP 水平不同, 531、526 和 516 位点突变常导致高水平耐药 (MIC > 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 511、513、514、533 位点突变一般引起低水平耐药。此外, 研究^[13] 表明, 约 90% 的耐 RFP 菌株往往也耐其他一线抗结核药物。耐 RFP 是判断 MDR-TB 菌株的风向标,

[收稿日期] 2016-05-24

[基金项目] 深圳市科技计划项目 (JCYJ20140411113637598); 深圳市科技研发资金项目 (JCYJ20130401164749996); 深圳市“三名工程”专项资金

[作者简介] 陈珊 (1990-), 女 (汉族), 湖南省益阳市人, 硕士研究生, 主要从事结核分枝杆菌耐药性分子机制及检测方法的研究。

[通信作者] 单万水 E-mail: 13923478156@qq.com

而 *rpoB* 基因突变为 RFP 耐药的主要原因,由此可见,快速、准确检测 *rpoB* 基因突变不仅有助于指导临床精准用药,提高疗效,而且可有效防控 MDR-TB 的传播。

2 MTB 耐异烟肼 (isoniazid, INH)

INH 是一种前体药,性质稳定,通过被动扩散方式进入增长期的 MTB 中,由菌体内过氧化氢-过氧化物酶 (*katG* 酶) 激活,产生活化的游离自由基,如活性氧化物、活性有机物等,能抑制细胞壁分枝菌酸的合成,破坏细胞壁的完整性,引起细菌增殖力、抗酸性等生理功能丧失,达到杀菌目的。研究^[14]发现,使用 INH 一段时间后,INH 本身会诱导 MTB 基因突变,产生基因型耐 INH 菌株。INH 耐药机制复杂,涉及菌体中的 *KatG* 酶、烯酰脂酰载体蛋白还原酶 (*inhA*)、 β -酮酰基运载蛋白合成酶 (*kasA*)、烷基过氧化氢酶还原酶 (*ahpC*) 和还原型辅酶 I 脱氢酶 (*ndh*) 等多基因突变。

2.1 *KatG* 基因 *KatG* 基因编码 *KatG* 酶,在菌体内将 INH 氧化成异烟酸,参与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶 I (NAD) 的合成,抑制细胞壁分枝菌酸的合成。当 *KatG* 基因发生完全缺失或突变时,导致细胞中过氧化氢酶不被表达或活性降低,从而引起结核分枝杆菌对 INH 耐药。绝大部分耐 INH 菌株中均有 *KatG* 基因表达,仅 24% 的耐 INH 结核菌株中 *KatG* 基因完全缺失,且均是 MIC > 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高度耐药株。*KatG* 基因突变可能是 MTB 耐 INH 更重要、更普遍的原因。30%~95% 的耐 INH 菌株存在 *KatG* 突变。有记载的 *KatG* 突变位点约 300 种,最常见的是密码子 S315 (AGC) 突变成苏氨酸 (ACC)、天冬氨酸 (AAC)、精氨酸 (CGC)、异亮氨酸 (ATC)、甘氨酸 (GGC) 等,94% 以上是 S315T 突变。另有 104、108、138、141、148、270、275、314、328、341、378、381、394、420、463、494、553、595、658 等位点突变,大部分可导致 INH 耐药。据报道^[15],不同碱基突变的菌株其过氧化氢酶活性及 INH 耐受程度不同。如 S315T、W341G、G494D 和 R595S 等与高浓度 INH 耐药有关,而 S315N、L141F、E553K 和 F658V 等与低浓度 INH 耐药有关。但是,并非所有密码子突变均与 INH 耐药有关,如 R463L 位点突变较常见,且在 INH 敏感株中的突变率高于耐药株,但其突变并不影响 *KatG* 酶活性,提示该突变位点的存在为基因多态性^[16]。简言之,

KatG 基因 S315T 是结核菌株耐 INH 的主要分子机制,但也有因基因多态性而存在的突变位点和无 *KatG* 基因突变却耐 INH 的菌株,提示 MTB 中存在其他耐 INH 的途径。

2.2 *inhA* 基因 *inhA* 基因编码烯酰基乙酰载体蛋白还原酶,分子量约为 32 kd 的蛋白质,参与分枝菌酸的生物合成,是 INH 的作用靶点。*inhA* 突变多见于调节序列的启动子区,包括点突变和碱基缺失,突变频率较高的位点包括 C-15T、T-8C,目前发现的突变位点还有 16、72、90、94、98、105 等。Tekwu 等^[17]研究发现,低水平耐 INH 菌株中,*inhA* (C-15T) 突变率达 50% (10/20),因此认为 *inhA* 编码基因的突变常见于低耐药菌 (MIC = 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。各地区耐 INH 菌株中 *inhA* 基因突变率并不相同,陈杨等^[18]研究结果为 30%,韦红玉等^[19]研究结果为 20%。*inhA* 除单一位点突变外,少部分联合 *KatG* 出现双基因突变,占耐药菌株的 8.5%,当 *inhA* 与 *KatG* 基因联合突变时,INH 的耐药性明显增强。

2.3 *oxyR-ahpC* 基因区 *oxyR* 基因编码的蛋白既是基因转录的活化剂,又是感受氧压的感受器。*oxyR* 基因本身无生物活性,是一假性基因,与 MTB 对 INH 的敏感性无关,但因 *oxyR* 蛋白参与 *KatG* 和 *ahpC* 基因的表达,因而与 MTB 的耐药性有关。*ahpC* 基因启动子位于 *oxyR-ahpC* 基因区,耐 INH 菌株常在此区域发生突变。据研究^[20]报道,在 MTB 耐 INH 临床分离株中,*oxyR-ahpC* 突变率可达 39.6% (19/48),其中 G-46A 突变位点占 31.2%。当 *oxyR-ahpC* 突变,能代偿性增加 *ahpC* 表达,填补 *KatG* 酶的缺乏,为 MTB 抗氧化应激反应提供保护。有学者视 *ahpC* 突变为 *KatG* 损伤的一种标志,然而两者并无直接因果关系,大部分耐 INH 菌株发生 *KatG* 突变时并不伴有 *ahpC* 突变。

2.4 *kasA* 基因 *kasA* 基因编码 β -酮酰基运载蛋白合成酶,属 II 型脂肪酸合酶系统,参与分枝菌酸的合成。*kasA* 基因突变不常见,占异烟肼 INH 耐药菌株的 10%,已发现的突变位点有 66、121、269、312 和 387 等,其中 G312S 最常见,但在部分 INH 敏感株中亦存在 312 位点突变,因此考虑该突变位点可能为基因多态性。除 312 位点外,*KasA* 基因中还存在部分 INH 耐菌株和敏感株中均有的突变位点,所以 *KasA* 基因在 MTB 产生 INH 耐药过程中的作用仍需进一步研究。

2.5 其他基因 除 *KatG*、*inhA*、*oxyR-ahpC*、*KasA* 等基因外,近年还发现许多可能与 MTB 耐

INH 有关的基因,如 *ndh*、*iniA*、*iniB*、*iniC*、*accD6*、*efpA*、*furA*、*nal*、*msbA* 等。如 *ndh* 基因编码 NADH 脱氢酶,突变可引起酶活性缺失,NADH 含量增加,NAD⁺ 减少,NADH/NAD⁺ 比例改变,使 INH 过氧化被抑制造成耐药,常见突变位点 V18A。上述大多基因与 INH 耐药的关系并未十分明确,还有待进一步研究证实。

3 MTB 耐链霉素 (streptomycin, SM)

SM 是氨基环醇糖苷类抗生素,通过诱导遗传密码错误,抑制翻译启动及干扰校正过程,影响蛋白质的合成而发挥抗菌作用。研究^[21]表明,编码小亚基核糖体蛋白 S12 的 *rpsL* 和编码 16SrRNA 的 *rrs* 基因突变是 MTB 耐 SM 的主要分子机制。约 80% 耐 SM 菌株存在 *rpsL* 或 *rrs* 突变,其中 *rpsL* 突变率高于 *rrs*。*rpsL* 最常见突变位点是第 43 和 88 位密码子,第 43 位密码子不仅突变率最高,且与高浓度 SM 耐药有关。该位点有限制性内切酶 Mbo II 的识别序列(GAAGGA),易使 Lys 突变为 Arg,部分菌株 Lys-Thr。在耐 SM 菌株中,*rrs* 突变主要集中于 530 茎-环区和 915 核苷区,已发现 426(G-C)、491(C-T)、512(C-T)、513(A-C)、513(A-T)、514(A-C)、516(C-T)、903(C-G)、903(C-A)、904(A-C)、905(A-G) 等突变位点。部分菌株有双突变位点,如 *rrs*513(A-C) 合并 *rpsL*43(A-G),*rrs*905(A-G) 合并 *rpsL*88(A-G),但类似联合突变不常见。近年有学者认为,7-甲基鸟苷-甲基转移酶的编码基因 *gidB* 与低水平 SM 耐药有关,*gidB* 基因突变使保守的 M7G 甲基化转移酶修饰丢失,从而产生低水平 SM 耐药^[22-23]。但在 RFP、INH 耐药而 SM 敏感的菌株中亦有 *gidB* 突变,因此需加强 *gidB* 与 SM 表型耐药相关性的研究。除上述耐药基因外,约 1/3 的临床 SM 耐药株无 *rpsL* 或 *rrs* 突变,提示可能有其他 SM 耐药机制存在。

4 MTB 耐乙胺丁醇 (ethambutol, EMB)

EMB 是一种合成的阿拉伯糖类药物,发挥抗菌效力最关键的作用靶点是阿拉伯糖基转移酶。EMB 能抑制其聚合阿拉伯半乳糖,从而影响分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合物(细胞壁的重要成分)的形成,同时使 RFP 等药物更易进入细胞内,因而 EMB 与 RFP 具有协同抗结核的作用。编码阿拉

伯糖基转移酶的 *embABC* 操纵子突变或 *emb* 蛋白过度表达与 EMB 耐药密切相关,过度表达引起 EMB 低耐药,基因突变导致 EMB 高耐药。*embABC* 操纵子由 *embC*、*embA*、*embB* 3 个基因组成,其中 *embB* 基因突变是 MTB 耐 EMB 的主要原因。*embB* 基因约 3 246 bp,编码 1 个糖基转移酶,其突变可导致糖基转移酶结构改变,影响 EMB 与糖基转移酶的相互作用产生耐药。*embB* 基因最常见第 306 位突变,占 *embB* 基因突变的 90%,包括 M306V、M306I、M306L。此外,第 285、306、313、319、328、330、406、497 及 630 位等密码子突变可引起 EMB 耐药。但是,学术界对 *embB*306 突变与 EMB 耐药关系存在争议。普遍认为 *embB*306 突变可作为快速诊断 MDR 的标准^[24],但也有研究发现,*embB*306 突变不仅存在于 EMB 耐药株中,部分敏感株中亦有。

5 MTB 耐吡嗪酰胺 (pyrazinamide, PZA)

PZA 为烟酰胺类似物,最大特点是需要在酸性环境中才表现出抗菌活性,杀死半休眠期 MTB,且 MIC 与 pH 呈正相关性。PZA 在细胞外酸性环境下渗透进入 MTB 内,菌体内的吡嗪酰胺酶(PZase)将其转化为对 MTB 有毒性作用的吡嗪酸(POA)而发挥杀菌作用。PZase 高活性是 PZA 发挥抗 MTB 作用的关键,而 PZase 编码基因 *pncA* 突变造成的 PZase 活性缺失或降低被认为是 MTB 耐 PZA 的主要原因。*pncA* 基因约 561 bp,其突变类型包括点突变、上游调控序列变异、核苷酸插入或缺失、小片段插入等。目前,已发现的 *pncA* 突变位点约 175 种,呈弥散分布无规律可循,最常见突变位点为 A-11G,还有第 47 位(Thr-Ala),第 85 位(Leu-Pro)。研究^[25]发现,部分 PZA 耐药株中并未出现 *pncA* 基因突变,且少数 EMB 耐药株发生了 *pncA* 突变但未对 PZase 活性产生明显影响,表明 *pncA* 突变并非唯一的 PZA 耐药机制。

6 结语

综上所述,MTB 菌体内与抗结核药物作用靶点有关的编码基因突变是结核菌耐药的主要作用机制,但大部分药物仍存在其他耐药机制,有待进一步研究发现,耐药表型与基因型之间的相关性仍需进一步深入研究。因此,加强对抗结核药物作用机制及 MDR 耐药机制的研究,寻找与耐药基因突变有

关的诱导因素,并建立新的高效、灵敏、特异、价廉的结核菌耐药性检测方法十分必要。总之,人类在抗 TB 的道路上任重而道远,但笔者坚信,随着分子生物学及遗传学的发展,新型检测技术的成熟,在不久的将来包括 TB 及 MDR-TB 在内的很多传染病都会从根本上得到遏制。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control. 2011 [R]. Geneva, Switzerland: WHO, 2011.
- [2] Khosravi AD, Goodarzi H, Alavi SM. Detection of genomic mutations in *KatG*, *inhA* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(1):57-62.
- [3] Heysell SK, Houpt ER. The future of molecular diagnostics for drug-resistant tuberculosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(4):395-405.
- [4] Goncalves MG, Fukasawa LO, Oliveira RS, et al. Fast test for assessing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by real-time PCR[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2012, 107(7):903-908.
- [5] Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, et al. Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh [J]. Tuberculosis, 2012, 92(6):529-534.
- [6] Poudel A, Nakajima C, Fukushima Y, et al. Molecular characterization of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Nepal [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(6):2831-2836.
- [7] Kourout M, Chaoui I, Sabouni R, et al. Molecular characterisation of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Morocco [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(11):1440-1442.
- [8] Lee AS, Lim IH, Tang LL, et al. High frequency of mutations in the *rpoB* gene in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Singapore [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4):2026-2027.
- [9] Prammananan T, Cheunoy W, Taechamahapun D, et al. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(5):446-453.
- [10] Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, et al. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(8):3119-3122.
- [11] Torres MJ, Criado A, González N, et al. Rifampin and isoniazid resistance associated mutation in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2002, 6(2):160-163.
- [12] Aung WW, Ei PW, Nyunt WW, et al. Phenotypic and genotypic analysis of anti-tuberculosis drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar [J]. Ann Lab Med, 2015, 35(5):494-499.
- [13] Rahman A, Sahrin M, Afrin S, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF assay and genotype MTBDR plus DNA probes for detection of mutations associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. PloS One, 2016, 11(4):e0152694.
- [14] Siddiqi S, Takhar P, Baldeviano C, et al. Isoniazid induces its own resistance in nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(6):2100-2104.
- [15] Vilchêze C, Jacobs WR. Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities [J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(4):MGM2-0014-2013.
- [16] 蔡捷,刘小香,李召东,等. 结核分枝杆菌临床菌株 *katG*、*inhA* 和 *ahpC* 基因突变与异烟肼耐药的相关性研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(6):1430-1432.
- [17] Tekwu EM, Sidze LK, Assam JP, et al. Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Central Region of Cameroon [J]. BMC Microbiol, 2014, 14:113.
- [18] 陈杨,陈玲,张泓,等. 耐异烟肼结核分枝杆菌及其 *katG* 与 *inhA* 基因突变的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(10):788-792.
- [19] 韦红玉,隆昕颖,凌俊,等. 广西百色地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药基因特征 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(5):731-734.
- [20] Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P, et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iran [J]. Microb Drug Resist, 2008, 14(4):273-279.
- [21] Sun YJ, Luo JT, Wong SY, et al. Analysis of *rpsL* and *rrs* mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore [J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(3):287-289.
- [22] Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, et al. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* *gidB* gene [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(7):2625-2630.
- [23] Mikhei DM, Shippy DC, Eakley NM, et al. Deletion of gene encoding methyltransferase (*g-idB*) confers high-level antimicrobial resistance in *Salmonella* [J]. J Antibiot (Tokyo), 2012, 65(4):185-192.
- [24] 刘厚明,肖颜玉,李天品,等. 结核分枝杆菌 *embB* 基因 306 位点突变与乙胺丁醇药敏表型及耐多药关系的研究 [J]. 热带医学杂志, 2015, 15(6):731-734.
- [25] 洪创跃,王峰,桂静,等. 耐多药结核分枝杆菌 *pncA* 基因突变特征及与吡嗪酰胺耐药相关性研究 [J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(5):436-439.