

结核分枝杆菌 *eis* 基因突变与氨基糖苷耐药的研究*黄 芳 刘家云 马越云 苏明权 郝晓柯[△]

(第四军医大学 西京医院 全军检验医学中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨结核分枝杆菌 *eis* 基因突变与氨基糖苷耐药之间的相互关系。方法 :以本室保存的 35 株已确定耐一线药物(异烟肼、利福平、乙胺丁醇、链霉素)的结核分枝杆菌为研究对象,应用 BECTEC960 测定其二线药物(阿米卡星、卡那霉素)的耐药情况,同时应用基因测序的方法测定结核分枝杆菌 *eis* 基因突变情况,分析 *eis* 基因突变与氨基糖苷耐药之间的相互关系。结果 :氨基糖苷耐药的部分结核分枝杆菌中 *eis* 基因 487 位碱基出现突变,相应的 163 位氨基酸密码子由 CGT 突变为 CAT,即由缬氨酸变为异亮氨酸。结论 :*eis* 基因 V163I 突变(缬氨酸变为异亮氨酸)可能与结核分枝杆菌耐氨基糖苷类药物有关。

关键词 结核分枝杆菌 耐药 氨基糖苷类药物 基因突变 *eis* 基因

中图分类号 R378.911 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)07-1213-03

Relationship Between Enhanced Intracellular Survival Gene Mutation in Mycobacterium Tuberculosis and Aminoglycoside-resistance*

HUANG Fang, LIU Jia-yun, MA Yue-yun, SU Ming-quan, HAO Xiao-ke[△]

(Center for Clinical Laboratory Medicine of People's Liberation Army, XiJing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between enhanced intracellular survival (*eis*) gene mutations and aminoglycoside-resistance in MTB. **Methods:** 35 strains of MTB resistant to isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin were chosen, the resistance to amikacin and kanamycin were determined by BECTEC 960, *eis* gene mutations were identified by PCR and sequencing. **Results:** There was *Eis* gene mutation of G487A in 4 strains and the amino acid changed from valine to isoleucine. **Conclusion:** The *eis* V163I mutation might associate with aminoglycoside-resistance in MTB.

Key words: Mycobacterium tuberculosis(MTB); Drug-resistance; Aminoglycosides; Gene mutation; Enhanced intracellular survival (*eis*)

Chinese Library Classification(CLC): R378.911 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)07-1213-03

前言

中国是结核病大国,呈现感染率高、患病率高、耐药率高、死亡率高的特点。我国肺结核病人结核菌初始耐药率为 18.6/10 万,继发耐药率为 46.5/10 万。按照全国菌阳肺结核病人 200 万计算,全国有耐药病人 55.5 万。这其中更有耐多药及严重耐多药结核病的存在^[1]。由于耐多药结核病对大多数常用的抗结核药物(一线抗结核药物,如异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、链霉素等)耐药,因此在治疗耐多药结核病药物选择方面,多选择应用较少的抗结核药物(二线抗结核药物,如丁胺卡那、卷曲霉素、氟喹诺酮类、口服抑菌类等)。但由于耐多药结核病的广泛存在,对二线抗结核药物尤其是注射用的氨基糖苷类药物丁胺卡那和卡那霉素的耐药呈现逐年上升趋势^[2]。研究证实,结核分枝杆菌耐药与相关耐药基因突变有关,其中与氨基糖苷耐药关系比较明确的基因突变有:链霉素耐药与核糖体蛋白 S12 编码基因 *rpsL*、16S rRNA 编码基因 *rrs* 基因突变有关^[3]。

但这些还不足以解释结核分枝杆菌耐氨基糖苷类药物的机制。有研究发现,结核分枝杆菌 *eis* (enhanced intracellular survival)基因突变与氨基糖苷耐药的存在某种关系^[4],*eis* 基因及其蛋白 EIS,可以增强结核分枝杆菌在巨噬细胞内的存活,生物信息学分析显示 EIS 是 GCN5 相关的 N-乙酰转移酶家族成员^[5]。近期研究显示卡那霉素耐药与 *eis* 启动子区突变有关,启动子区突变可以增加 EIS 蛋白的转录水平,但是其机制尚不明确^[6]。为找寻 *eis* 基因突变与氨基糖苷类药物耐药的关系,本研究对临床分离的结核分枝杆菌的氨基糖苷类药物耐药表型及 *eis* 基因突变情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

35 株耐药菌株来自西安市胸科医院临床分离株, H37Rv 标准株为本室保存菌种,临床分离株按结核病诊断细菌学规程进行菌种鉴定及药敏实验证实为结核分枝杆菌,其中耐异烟

* 基金项目:军队"十一五"医药卫生科研基金资助项目(08G099),

第四军医大学西京医院学科助推计划基金资助项目(XJZT08R05, XJZT10Z03)

作者简介:黄芳(1984-)女,硕士研究生,主要从事结核分枝杆菌耐药研究。E-mail:fklsuijk@163.com

[△]通讯作者:郝晓柯(HAO Xiao-ke, corresponding author),E-mail:haoxkg@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-01-21 接受日期:2011-02-15)

肝、利福平、乙胺丁醇、链霉素有 12 株,耐异烟肼及利福平的有 16 株,单耐异烟肼的有 6 株,单耐利福平 1 株。菌株来源的结核病人多来自于陕西地区,占 92.7%;其中男性 21 人、女性 14 人;年龄多数为 49 岁以下(<30 岁占 46.9%,30-40 岁占 21.9%,40-50 岁占 21.9%,50-60 岁占 6.3%,>60 岁占 3.1%)。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 本研究采用 BECTEC960 系统进行药敏鉴定。BECTEC960 系统是全自动非侵入非放射的系统,用于结核分枝杆菌的检测和药敏实验,被认为是鉴定检测的金标准。药物阿米卡星、卡那霉素、链霉素、分枝杆菌生长指示管(MGIT)、BECTEC MGIT 960 生长添加剂及 Middlebrook 7H9 Broth 培养基均购自 BD 公司。

1.2.2 药敏实验 将药物干粉按照说明用 4ml 无菌水溶解,药物终浓度分别为:卡那霉素 5.0μg/ml,阿米卡星 1.0μg/ml,链霉素 5.0μg/ml,将配置好的药物溶液 1.2ml 分装并保存于 -20℃。按照 BECTEC MGIT 960 有关药敏鉴定的实验操作规范,使用 Middlebrook 7H9 Broth 将菌体磨碎并静置至少 35 分钟,取上清用无菌生理盐水配置成为 0.5 麦氏浊度,再将菌悬液接种在含药物的药敏管中,将 0.5 麦氏浊度的菌悬液 100 倍稀释后接种于生长对照管中。将所有接种好的含药物的 MGIT960 管子放在药敏架上,放入 BECTEC MGIT 960 仪器中,当生长对照管的生长单位(GU)值达到 400 时,仪器报阳指示灯亮,此时打印药敏报告。当生长对照管的 GU 值是 400 且其他含药物管子的 GU 值也是 400 时,结果为耐药(R);当生长对照管的 GU 值是 400 但其他含药物管子的 GU 值小于 400 时,结果为敏感(S)。

1.2.3 细菌 DNA 制备 临床分离株 DNA 用 Ultraclear Microbial DNA isolation kit 提取,测定浓度后置于 -20℃ 保存备用。

1.2.4 PCR 扩增 Eppendorf master 梯度热循环 PCR 仪为 Eppendorf 产品,PrimeSTAR HS DNA Polymerase 及 Wide Range DNA Marker (100-6000) 购自 TaKaRa 公司。据 eis 基因序列 Rv2416c,全长 1208bp,文献报道其启动子区域位于其上游约 40bp,基于此选取目的 eis 基因约 1600bp,包含上游启动子区并且上下游均向外延约 100bp。引物根据 eis 基因,用软件 Primer 5.0 设计,于 Takara 公司合成,引物序列如下。Sense-primer: 5'-TggTgACCGCCATgggACCGgTACT-3', anti-sense: 5'-CATCCg-gACTCggCTCACCgCgATC-3'。采用 50 μl 反应体系,4x dNTPs 终浓度为 0.2 mmol/L,引物终浓度为 0.2 μmol/L,置 DNA 扩增仪按照 95℃ 30s,65℃ 30s,72℃ 30s 扩增 30 次,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外检测 eis 条带。将 PCR 产物同相应的引物送至 Takara 公司测序。

2 结果与分析

2.1 药敏实验结果

链霉素药敏共检测临床分离株 36 株(35 株临床分离株,1 株 H37Rv 标准株),其中链霉素耐药 12 株,链霉素敏感 23 株;卡那霉素和阿米卡星药敏共检测菌株 12 株,其中 1 株均对卡那霉素和阿米卡星耐药,其余敏感(表 1)。

2.2 eis 基因突变分析结果

经 PCR 扩增及琼脂糖电泳,所有待测菌株均扩增出目的

基因(图 1)。对 35 株临床分离株进行 DNA 测序分析,发现其中 4 株 eis 基因有突变,同源数据分析发现 eis 基因 487 位碱基由 G 突变为 A,相应的 163 位氨基酸密码子由 CGT 突变为 CAT,由缬氨酸(V)变为异亮氨酸(I),为有意义突变(图 2)。eis 突变的 4 株中,其中的 1 株链霉素耐药菌株同时也对卡那霉素和阿米卡星耐药,其余结果为敏感(表 2)。

表 1 35 株结核分枝杆菌病的药敏结果

Table.1 Susceptibility Results of 35 strains MTB

	Streptomycin	Kanamycin	Amikacin
Resistant	12 株	1 株 *	1 株 *
Sensitive	23 株	11 株	11 株
Total	35 株	12 株	12 株

注:“*”卡那霉素和阿米卡星耐药株为同一株,并且它同时对链霉素耐药

“*”There is only one strain that was resistant to kanamycin, amikacin and streptomycin simultaneously

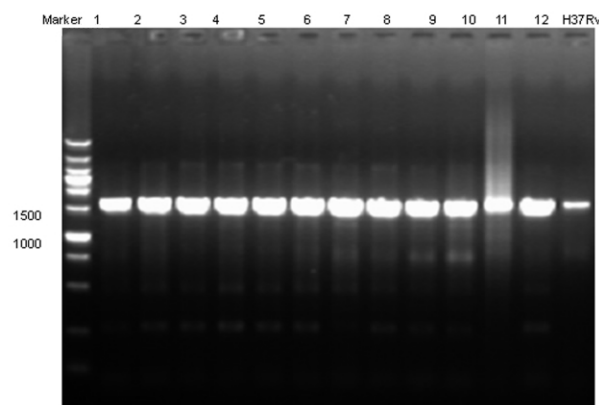


图 1 部分 MTB eis 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图:1-12 泳道为标本,H37Rv 为对照,DNA Marker 为 Wide Range DNA Marker(100-6000)
Fig.1 Electrophoresis results of some MTB eis PCR products. Lane 1-12 are PCR products from clinical strains and standard strain H37Rv. Wide Range DNA Marker(100-6000) was used

表 2 4 株 eis 突变株药敏结果

Table.2 Susceptibility Results of 4 mutant strains

	Streptomycin	Kanamycin	Amikacin
Resistant	1 株 *	1 株 *	1 株 *
Sensitive	3 株	3 株	3 株
Total	4 株	4 株	4 株

注:“*”同一菌株同时对链霉素、卡那霉素和阿米卡星耐药

“*”There is only one strain that was resistant to kanamycin, amikacin and streptomycin simultaneously

3 讨论

结核分枝杆菌耐受氨基糖苷类药物的机制已愈发引起人们关注,这与结核分枝杆菌严峻的耐药形势有关,其中研究最广泛的主要为与药物相关的酶的表达活化,这其中的酶包括四种:氨基糖苷磷酸转移酶、氨基糖苷乙酰转移酶、氨基糖苷核苷

酸转移酶、16s rRNA 甲基化酶^[6-7]。这些酶相关的基因包括有与氨基糖苷磷酸转移酶相关的 aph 基因,与氨基糖苷乙酰转移酶相关的 aac 基因^[8],与氨基糖苷核苷酸转移酶相关的 ant 基因,与 16s rRNA 甲基化酶相关的 rmtA、rmtB、rmtC、rmtD、armA 基因^[9-15]。这些基因不同程度的存在于氨基糖苷耐药的各种细菌菌体之中,比如不动杆菌属、沙雷菌属等。在结核分枝杆菌中这些基因是否存在,或者是否存在类似的基因尚不清楚。

eis 基因及其蛋白 EIS(一种 42KD 蛋白)可增强结核分枝杆菌在巨噬细胞内的存活能力,生物信息学分析 EIS 是一种 GCN5 相关的 N-乙酰转移酶家族成员^[16]。有研究证实卡那霉素低水平耐药与 eis 基因启动子区发生突变有关,eis 启动子区发生突变可以增加 EIS 蛋白的转录水平,通过 SigA 调节 eis 基因表达增强从而增强 MTB W-Beijing 株在巨噬细胞内的存活能力^[17]。最新研究显示,eis 可以调节细胞自噬,调节炎症反应以及调节氧化还原反应依赖的信号通路。EIS 蛋白借助于其结构上的 N-乙酰转移酶结构域发挥作用,可以通过抑制 ROS(reactive oxygen species)来抑制自噬,通过阻断胞外信号调节激酶的磷酸化作用降低 TNF- α 和 IL-4 的表达分泌作用从而抑制炎症反应^[18]。

本研究所作 eis 基因的启动子突变区并未发现突变,这与文献报道不同,这可能由于文献报道 eis 基因启动子突变为卡那霉素较低水平耐药(KAN:40 μ g/ml)^[19],而本研究采用的药物浓度为 KAN:5 μ g/ml,药物浓度的不同对耐药菌株的效应也不同。本研究发现的 eis 基因 487 位突变已有报道^[20-21],但是该突变与氨基糖苷菌株的耐药关系尚不明确,结合突变菌株对氨基糖苷类药物的药敏结果,认为该突变可能与氨基糖苷药物耐药有关。但是由于本研究样本容量不大,对于突变位点与菌株耐药表型的关系还不能做出有意义的推断,需要扩大样本容量与样本耐药表型的多样性才能进行有意义的统计推断。

结核分枝杆菌基因突变的研究已从一线药物耐药菌株转移到二线药物耐药菌株,这不仅是临床需要的更加是我们要迫切关注的。eis 基因作为新近确立的与结核分枝杆菌耐药密切相关的基因,相信会为结核感染免疫致病机制方面提供新的思路。

参考文献(References)

[1] 万康林 中国结核病流行新特点及挑战 疾病监测 [J].2008 23(11): 667-670
Wan Kang-lin. Epidemiological characteristics and challenges of tuberculosis at present in China [J]. Disease Surveillance, 2008, 23 (11):667-670

[2] 马丽萍 宋艳华 耐药结核病的化学治疗 中国临床医生杂志[J] 2009 37(7):14-16
Ma Li-ping, Song Yan-hua. Chemotherapy of drug-resistant tuberculosis[J]. Chinese Journal For Clinicians, 2009,37(7):14-16

[3] Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in Mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005,49(8):3192-3197

[4] Zaunbrecher MA, Sikes RD Jr, Metchock B, et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(47):20004-20009

[5] Samuel LP, Song CH, Wei J, et al. Expression, production and release of the Eis protein by Mycobacterium tuberculosis during infection of macrophages and its effect on cytokine secretion [J]. Microbiology, 2007,153(2):529-40

[6] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47 (8): 2565-2571

[7] Wu Q, Zhang Y, Han L, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae isolates in Shanghai, China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1):271-272

[8] Magalhaes ML, Blanchard JS. The Kinetic Mechanism of AAC(3)-IV Aminoglycoside Acetyltransferase from Escherichia coli[J]. Biochemistry, 2005,44(49): 16275-16283

[9] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(11):1320-1330

[10] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence[J]. Nature, 1998,393(6685):537-544

[11] Wachino J, Yamane K, Shibayama K, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006,50 (1): 178-184

[12] Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, et al. Genetic environments of the rmtA gene in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(6):2069-2074

[13] Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance[J]. Chem Rev, 2005,105(2):477-98

[14] Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005,49 (8):3192-3197

[15] Luo T, Zhao M, Li X, et al. Selection of mutations to detect multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother, 2010,54(3):1075-1081

[16] Lella RK, Sharma C. Eis (enhanced intracellular survival) protein of Mycobacterium tuberculosis disturbs the cross regulation of T-cells [J]. J Biol Chem, 2007,282(26):18671-18675

[17] Wu S, Barnes PF, Samten B, et al. Activation of the eis gene in a W-Beijing strain of Mycobacterium tuberculosis correlates with increased SigA levels and enhanced intracellular growth[J]. Microbiology, 2009,155(4):1272-1281

[18] Shin DM, Jeon BY, Lee HM, et al. Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling[J]. PLoS Pathog, 2010,6(12): 100-123

[19] Roberts EA, Clark A, McBeth S, et al. Molecular characterization of the eis promoter of Mycobacterium tuberculosis [J]. J Bacteriol, 2004,186 (16):5410-5417

[20] Wei J, Dahl JL, Moulder JW, et al. Roberts EA. Identification of a Mycobacterium tuberculosis gene that enhances mycobacterial survival in macrophages[J]. J Bacteriol, 2000,182(2):377-84

[21] Gao Q, Kripke KE, Saldanha AJ, et al. Gene expression diversity among Mycobacterium tuberculosis clinical isolates[J]. Microbiology, 2005,151(1):5-14