

幽门螺杆菌阿莫西林耐药株缺乏青霉素结合蛋白基因外突变特征

沈靖 邓大君 柯杨 张建中

【摘要】 目的 研究实验室诱导的耐阿莫西林(AMO)幽门螺杆菌(*H. pylori*)的青霉素结合蛋白基因(*pbp*)突变情况,探讨 *pbp* 基因突变与耐药性形成的关系,比较 AMO 耐药菌株和敏感菌株的蛋白表达谱,为筛选与 *H. pylori* 耐药相关的蛋白提供线索。方法 体外诱导敏感菌株 *H. pylori* 26695 产生 AMO 耐药,测定耐药菌株 5 个 PBP 的全基因的点突变情况;同时运用蛋白质组学技术,比较 AMO 耐药菌株和敏感菌株的蛋白表达谱。结果 (1)体外诱导获得 MIC 为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的耐药菌 1 株(AMO'),其耐药表型经 -80°C 冻存或在不含 AMO 的培养基上多次传代后会丧失;(2) AMO' 全部待测序列和出发菌株 26695 相应的靶序列完全相同,未检出基因点突变等结构变异;(3)对 26695 和 AMO' 的蛋白表达图谱进行比较发现:11 个蛋白斑点在表达量上有显著变化。结论 *H. pylori* AMO 耐药性的形成主要是一种不稳定的表型变化,可能不是由 *pbp* 基因结构变异所致。实验中耐药株和敏感株差异表达的蛋白在 *H. pylori* 的耐药形成过程中发挥着怎样的作用还有待进一步研究。

【关键词】 幽门螺杆菌;阿莫西林;耐药性;点突变;蛋白质

Detection of point mutation in an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori* SHEN Jing*, DENG Da-jun, KE Yang, ZHANG Jian-zhong. *Peking University School of Oncology and Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China

Corresponding author: ZHANG Jian-zhong, Email: helico@public.bta.net.cn, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between point mutation of penicillin-binding protein gene (*pbp*) and amoxicillin resistance (AMO') of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) as well as to compare the protein profiles under proteomic technology to get the candidate resistance-related proteins. **Methods** (1) AMO' strains were selected from the sensitive *H. pylori* strain 26695 by serial passage technique in vitro. (2) Point mutations of five putative resistance genes (HP0597, HP1565, HP1542, HP1556, and HP0160) were analyzed by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) and DNA sequencing. (3) Proteins samples were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Protein profiles were compared between the AMO' strain obtained in vitro and its sensitive parent strain 26695. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was performed to identify the proteins of interest. The proteins were searched by software MASCOT and identified by peptide fingerprint map using the program MS-FIT of Protein Prospect. **Results** (1) An AMO' strain (MIC 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was obtained. Complete loss of the resistant phenotype was observed after cultivation in the absence of AMO or storage at -80°C . (2) DHPLC and Sequencing result showed no point mutations in five *pbp* genes in the AMO' strain when compared with the corresponding PCR products from its parent strain 26695. (3) Protein profiling showed that eleven protein spots were differently expressed between 26695 and the AMO' strain. Of these protein spots in the AMO' strain, two new spots (Spot 1 and Spot 2) were observed with one (Spot 3) was up-regulated three-fold and the remained ones (Spot 4-11) were down-regulated. **Conclusion** AMO resistance of *H. pylori* might be resulted from unstable phenotype change rather than point mutations of *pbp* genes. These differentially regulated proteins in AMO' strain might play a role in development of resistance to AMO in *H. pylori*.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Amoxicillin; Resistance; Point mutation; Proteomics

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7002008);国家“863”高技术研究发展计划课题资助项目(2001AA21516102)

作者单位:100036 北京大学临床肿瘤学院暨北京市肿瘤防治研究所中心实验室(沈靖、邓大君、柯杨);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所诊断室(张建中)

通讯作者:张建中,Email:helico@public.bta.net.cn

随着抗生素的普遍使用,耐药性幽门螺杆菌(*H. pylori*)的比例越来越高^[1,2]。*H. pylori*耐药性的形成往往是导致*H. pylori*清除治疗失败的主要原因。研究表明*H. pylori*的甲硝唑和克拉霉素耐药性形成与基因点突变密切相关^[3,4]。检测到的阿莫西林(AMO)耐药率较低,对其耐药机制的研究极少^[5,8],尤其与包含 AMO 方案的临床*H. pylori*根除治疗中的根除率明显下降无合理解释。有报道耐药菌株中未检测到 β -内酰胺酶活性,其耐药性形成可能与青霉素结合蛋白(PBP)变化有关^[5,8]。本研究通过体外诱导敏感菌株产生 AMO 耐药株,测定耐药菌株 PBP 全长编码基因的点突变情况,研究 *pbp* 基因突变与耐药性形成的关系;并利用双向电泳和蛋白质组学技术比较出发菌和诱导耐药菌的蛋白表达谱,对*H. pylori*的 AMO 耐药机制进行初步探讨。

材料与方 法

1. 材料:

(1)菌株来源:国际标准菌株*H. pylori* 26695 来自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(中国*H. pylori*菌株库)。

(2)主要试剂和仪器:*H. pylori*专用培养基(哥伦比亚琼脂)及抗生素(Oxoid 公司)、阿莫西林(AMO, 中国药品及生物制品检定所)、DNA 合成酶(*pfu* 酶, 上海生工生物工程技术有限公司)、3-3-胆酰胺基丙基二甲氨基丙磺酸盐(CHAPS)、尿素、硫脲、二硫苏糖醇、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、三氟乙酸、胰蛋白酶(蛋白组学纯,经甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮处理)(Sigma 公司)、固相 pH 梯度预制胶条(pH 值 3~10 NL, 24 cm)、LMW 蛋白质标准品(Pharmacia 公司)、碘乙酰胺(Fluka 公司)、乙腈(光谱纯, Fisher 公司)、ZipTip C18(Millipore 公司);PTC-200 智能型热循环仪(MJ Research 公司);WAVE™ DNA 片段分析系统(DHPLC, Transgenomic 公司);双向电泳系统(IPGphor™ 等电聚焦电泳仪,垂直电泳系统, Powerlook III 图像扫描仪, 2-D Image Master 凝胶图像分析软件)(Pharmacia 公司);Reflex™ III 型质谱仪(Bruker 公司)。

2. 方法:

(1)*H. pylori*的培养及耐药菌株的诱导:采用含有 8%~10% 羊血的哥伦比亚琼脂培养基,抗生素为*H. pylori* selective supplement,在 5% O₂、10% CO₂、85% N₂ 的混合气体培养箱中 37℃ 培养 72 h,

用平板掺入法进行药敏检测。*H. pylori*的 AMO 最低抗生素抑菌浓度(MIC) > 1 μ g/ml 时视为耐药。本文中的 MIC 均指 MIC₉₉。

AMO 耐药性的体外诱导^[5]:取溶于 PBS 的 AMO 掺入到培养基中,制成不同浓度的抗性平板。以*H. pylori* 26695 为出发菌,将 10⁹ CFU/ml 的稀释菌液 100 μ l 接种于含 AMO 0.01 μ g/ml 的平板上,经抗性平板连续 3 次或 3 次以上传代后,将*H. pylori* 分为三部分:一部分保存于 -80℃,复苏后再传至相同浓度的抗性平板上;一部分在不含 AMO 的 O 平板上连续传代 3 次,再传至相同浓度的抗性平板上;其余传至更高浓度的抗性平板。

(2)PCR 扩增 *pbp* 基因:采用酚:氯仿法抽提*H. pylori*染色体 DNA^[9]。以*H. pylori* 26695 染色体 DNA 为模板,设计 13 对引物(表 1),分别扩增耐药菌株的 HP0597、HP1565、HP1542、HP1556、HP0160 等基因,其中 HP0597 编码 PBP1;HP1565 编码 PBP2;HP1542 编码 PBP4;HP1556 编码 PBP (GenBank 中为 PBP,本文编号为 PBP3),可在基因组数据库(TIGR genome database)中查到^[10];HP0160 来自文献[11],编码一种新的 PBP(本文编号为 PBP5)。以*H. pylori* 26695 的 DNA 为阳性对照,PCR 循环:95℃ 5 min → (95℃ 1 min; Tm 1 min; 72℃ 1 min) × 35 个循环 → 72℃ 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳鉴定扩增效果。

(3)DHPLC 法测定耐药菌株 *pbp* 基因靶片段的点突变:将出发菌株与耐药菌株的同一目的片段 PCR 产物等摩尔浓度混合,与各自混合前 PCR 产物同时进行变性和复性处理。程序为:95℃ 5 min, 95℃ → 30℃ 缓慢降温(-1℃/min)。片段长度和点突变测定通过 DHPLC 技术在 WAVE™ DNA 片段分析系统上完成。色谱柱为 DNASep 分析柱;采用自动进样,进样量为 2 μ l PCR 产物;流动相为 0.1 mol/L N-三乙基乙酰胺(TEAA, 光谱纯)和不同浓度的乙腈梯度洗脱,梯度由控制软件 WAVE Maker 4.0 根据待测核苷酸序列自动生成,流速 0.9 ml/min;检测器为紫外检测器(260 nm)。

(4)测序:将耐药菌株的 HP0597, HP1556, HP1565, HP1542, HP0160 全部靶片段进行测序(华大基因研究中心),与*H. pylori* 26695 的标准序列进行对照^[12]。

(5)双向凝胶电泳(2-DE):采用三氯醋酸/丙酮沉淀法提取出发菌株和 AMO 菌全菌蛋白,用

Bradford 法进行蛋白定量。采用 24 cm 长 pH 值 3~10 NL 的 IPG 干胶条,经水化、第一向等电聚焦、平衡后,于 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行第二向 SDS-PAGE 电泳,通过硝酸银染色观察结果。2-DE 胶经扫描后应用 2-D Image Master 软件进行图像分析。

(6) 胶内酶解及 MALDI-TOF-MS 鉴定:将目的蛋白斑点切下,经脱色、胰蛋白酶酶解、ZipTip C18 脱盐得到样品,送中科院化学所质谱中心进行 MALDI-TOF-MS 分析,获得检测样品的肽指纹图谱。

(7) 数据库检索:根据各肽段的 M/Z 比数据,利用 MS-FIT 软件 (<http://prospector.ucsf.edu>),在 NCBI 的 *H. pylori* 蛋白数据库中搜索理论上酶解肽段能与之相匹配的蛋白。

结 果

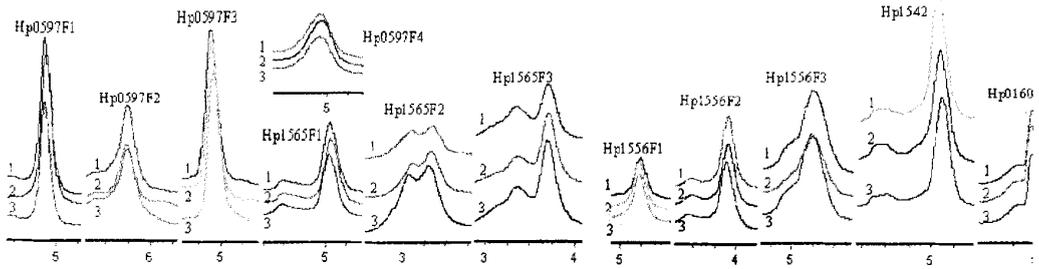
1. AMO 耐药性的体外诱导:出发菌 *H. pylori* 26695 经药敏检测 MIC 为 0.02 mg/L,为 AMO 敏感菌 (AMO^s, MIC \geq 1.0 mg/L 判为耐药)。经过在 AMO 抗性平板上传递 40 多代,历时近 6 个月,最终

得到了 MIC 为 8 μ g/ml 的耐药菌 1 株 (AMO^r)。研究中发现:耐药菌株经 -80 $^{\circ}$ C 冻存后,再复苏至原抗性平板上不能存活,而在与之对照的 O 平板上能够存活;耐药菌株在 O 平板上连续传代后再传至原抗性平板上也不能存活。

2. 诱导耐药菌株 AMO^r PBP_s 基因的点突变测定:在 50 $^{\circ}$ C 非变性条件下,出发菌 26695 和诱导 AMO^r 菌各自对应的 13 个靶序列均为保留时间相同的单一色谱峰。根据 *H. pylori* 26695 靶片段,用 WAVEMaker 4.0 软件预测各个 PCR 产物的部分变性温度,在部分变性温度条件下按照点突变方式对 13 个不同片段进行测定,发现 *H. pylori* 26695 和 AMO^r 及其混合 PCR 产物的各个片段 DHPLC 色谱图完全相同 (图 1)。在 $\pm 1^{\circ}$ C 另外 2 个不同的部分变性温度下测定,这 3 种产物的色谱图仍然相同。测序结果显示,AMO^r 的靶序列与 GenBank 中公布的出发菌株 *H. pylori* 26695 的待测序列一致 (GenBank accession No. 依次为 AE000573、AE000654、AE000653、AE000652 和 AE000511)^[12],未发现点突变等 DNA 序列结构变异。

表 1 扩增 *pbp* 基因的引物序列及退火温度 (T_m)

| 基因 | 扩增片段 | 产物大小 (bp) | 引物 | 引物 T _m (°C) | DHPLC 测定使用的部分变性温度 (°C) | 50 $^{\circ}$ C 时色谱保留时间 (min) |
|------------------------|----------|-----------|--|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| <i>pbp1a</i> (1980 bp) | HP0597F1 | 544 | Forward: 5'-TG TGGCTAAAGT GGAAGAAA-3' Reverse: 5'-CCAACAAAACGATGTCAAAA-3' | 58 | 57.7, 58.7, 59.7 | 5.23 |
| | HP0597F2 | 850 | Forward: 5'-AGTTTGTACATCGTTTTGTT-3' Reverse: 5'-GTTGTATTCTTTAGGCTGGA-3' | 58 | 56.5, 57.5, 58.5 | 5.45 |
| | HP0597F3 | 625 | Forward: 5'-TCCAGCCTAAAGAATACAAC-3' Reverse: 5'-GTTTGGGTAACCTACGGATAA-3' | 58 | 56.6, 57.6, 58.6 | 4.86 |
| | HP0597F4 | 305 | Forward: 5'-AAACGCCCTTTTCGGTCTAA-3' Reverse: 5'-GCTATCCGCCCTCCTACGGT-3' | 58 | 55.1, 56.1, 57.1 | 4.93 |
| <i>pbp2</i> (1767 bp) | HP1565F1 | 617 | Forward: 5'-AAATACAGCAAGCCTAAATCTC-3' Reverse: 5'-GGTTCTAGCCTACACGGGAC-3' | 60 | 56.4, 57.4, 58.4 | 5.01 |
| | HP1565F2 | 720 | Forward: 5'-GCCCGTAGCAATGAGTCCCG-3' Reverse: 5'-CAAGAATTAGCCACCTTAGAAGTA-3' | 60 | 57.3, 58.3, 59.3 | 4.73 |
| | HP1565F3 | 741 | Forward: 5'-TTGGTGCTTGCCAGCACTAC-3' Reverse: 5'-AAAATACTCGGCTTCTCGC-3' | 60 | 54.9, 55.9, 56.9 | 4.82 |
| <i>pbp3</i> (1848 bp) | HP1556F1 | 757 | Forward: 5'-AGTTTGGGTTGAAAAGAGCC-3' Reverse: 5'-AAAGCCGTTGTGGAAGACAT-3' | 61 | 56.9, 57.9, 58.9 | 4.67 |
| | HP1556F2 | 822 | Forward: 5'-GCTAATGACTTGAAAGGTGG-3' Reverse: 5'-CAAAATGGCATAAGAACAGG-3' | 59 | 56, 57, 58 | 5.07 |
| | HP1556F3 | 815 | Forward: 5'-GCTCAAATACACCTCATAGCC-3' Reverse: 5'-TCTCATGCGTTGTGAAAATC-3' | 55 | 55.1, 56.1, 57.1 | 4.89 |
| <i>pbp4</i> (411 bp) | HP1542 | 577 | Forward: 5'-CTCTATAAAGGCTGGATTGGA-3' Reverse: 5'-TGGAATACAGGGATGAGCAC-3' | 58 | 56.4, 57.4, 58.4 | 5.05 |
| <i>pbp5</i> (921 bp) | HP0160F1 | 725 | Forward: 5'-TAGATTGGGTTTTACTGATT-3' Reverse: 5'-TTTGACATCCATACCGACTT-3' | 59 | 56.5, 57.5, 58.5 | 4.74 |
| | HP0160F2 | 512 | Forward: 5'-GAAAGACGGAGCGAGTTGTG-3' Reverse: 5'-GGGATTTCTGCTGGGTGGT-3' | 64 | 54.3, 55.3, 56.3 | 4.55 |



注: 1:26695; 2:AMO^r; 3:26695 + AMO^r

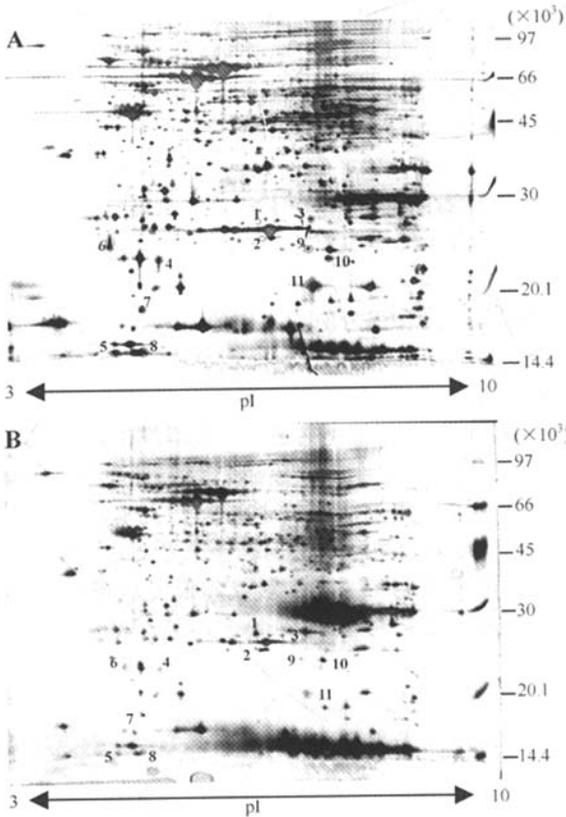
图1 *pbp* 基因 13 个 PCR 产物在部分变性温度下测定的 DHPLC 色谱图

3. 出发菌 26695 和 AMO^r 菌全菌蛋白差异表达图谱: 在出发菌 26695 和诱导的 AMO^r 菌蛋白质的双向电泳图谱中(图 2), 大部分蛋白斑点集中在 pI 4~9.5、相对分子质量(M_r)10×10³~100×10³ 范围内。经 2-D Image Master 软件分析平均每块 2-DE 胶上可检测到 1134 个蛋白斑点, 蛋白斑点的 pI 和分子质量(MW)根据 18 个已知蛋白的 pI 和 MW 来确定。从培养和提取全菌蛋白到进行 2-DE, 每株细菌各重复测定 2~3 次。

比较, 发现 11 个蛋白斑点在表达量上有显著变化, 各斑点的 pI、MW 和相对含量见表 2。图 3 是部分差异表达蛋白点的放大图, 其中 1 个蛋白斑点(Spot 3)在 AMO^r 中的表达量是 26695 中的 3.3 倍, 2 个蛋白斑点(Spot 1 和 Spot 2)只在 AMO^r 中表达, 而在 26695 中未检出; 8 个蛋白斑点(Spot 4~11)在 26695 中的表达量高于 AMO^r, 分别是前者的 2.3~14.2 倍不等。

表2 出发菌和诱导菌中差异表达的蛋白

| 蛋白点序号 | pI/MW (M _r × 10 ³) | 相对强度比 (26695/AMO ^r) | 蛋白名称 |
|-------|---|---------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 6.92/25.71 | - | 推断蛋白 |
| 2 | 6.80/24.30 | - | 核酸外切酶 VII 的大亚单位 (<i>xseA</i>) |
| 3 | 7.22/27.53 | 0.31 | 未确定 |
| 4 | 5.28/20.17 | 5.57 | 亮氨酸氨肽酶 <i>el</i> (<i>pepA</i>) |
| 5 | 4.90/11.85 | 8.48 | 硫氧还蛋白(<i>trxA</i>) |
| 6 | 4.80/19.27 | 6.39 | 无机焦磷酸酶(<i>ppase</i>) |
| 7 | 5.06/19.91 | 2.25 | 预测编码区(HP0697), 与丙酮代谢有关 |
| 8 | 5.06/11.85 | 6.67 | 硫氧还蛋白(<i>trxA</i>) |
| 9 | 7.25/21.92 | 4.71 | γ-谷氨酰转肽酶(<i>ggt</i>) |
| 10 | 7.59/21.12 | 14.20 | 转录终止因子 NusG |
| 11 | 7.27/18.95 | 4.10 | 未确定 |



注: A:26695; B:AMO^r; 图中的数字对应于表 2 中的蛋白点序号

图2 *H. pylori* 全菌蛋白双向电泳银染图谱

对出发菌 26695 和耐药菌 AMO^r 蛋白 2-DE 谱

3 个差别显著的蛋白斑点经胰蛋白酶进行胶内酶解, 用 MALDI-TOF-MS 对抽提的酶解片段做精确的分子质量测定, 获得这些蛋白的肽指纹图谱(图 4)。根据各肽段的 M/Z 比数据, 利用 MS-FIT program, 在 NCBI 的 *H. pylori* 蛋白数据库中搜索理论上酶解肽段能与之相匹配的蛋白, 搜索结果如下: Spot 1 为推断蛋白, 由 HP0205 编码; Spot 2 为核酸外切酶 VII 的大亚单位, 由 HP0259 编码; Spot 4 为氨肽酶, 由 HP0570 编码。其余的 8 个蛋白斑点中有 2 个(Spot 5 和 Spot 6)可以从 <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/> 的 *H. pylori* 26695 双向电泳图谱中查到相对应的并已鉴定的结果: Spot 5 为硫氧还蛋白, 由 HP0824 编码; Spot 6 为无

机焦磷酸酶,由 HP0620 编码。

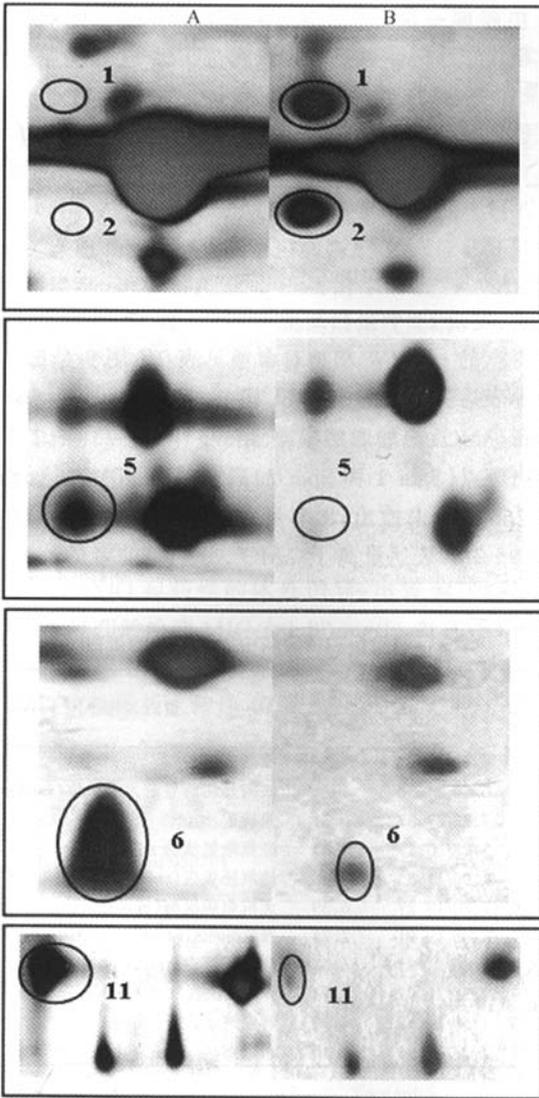
讨 论

目前 *H. pylori* 的耐药问题日趋严重,临床上对甲硝唑和克拉霉素耐药的病例多改用含 AMO 的方案,虽然 AMO 的耐药性仅有少数报道,但正象肺炎链球菌对该药由多年前的缺乏耐药性到如今的敏感性下降一样, *H. pylori* 对 AMO 的耐药性存在着潜在的危险,而近年来对包含 AMO 方案的临床 *H. pylori* 根除治疗中的根除率明显下降也引起了广泛关注,因此探讨 AMO 的耐药机制很有必要。

曾经有国外学者尝试诱导 *H. pylori* 敏感菌株产生 AMO 耐药未成功的报道^[13,14]。我们在实验中发现,体外诱导 *H. pylori* 敏感菌株产生对 AMO 的耐药性的确非常困难。本研究用 *H. pylori* 26695 和 J99 进行尝试,耗时近 6 个月才获得 26695 的 AMO^r。这与 DeLoney 和 Schiller^[5] 同 Paul 等^[8] 的报道结果相似。我们同样用 *H. pylori* 26695 作为出发菌株,诱导对克拉霉素的耐药株,达到 MIC 5.0 mg/L 仅需约 20 d。该结果说明, *H. pylori* 客观上不易产生 AMO 耐药。

我们诱导的 AMO^r 菌,与 Dore 等^[6] 和 Han 等^[15] 报道的临床耐药菌株—过性 AMO 耐药 (transient resistance) 一样,其耐药表型经 -80℃ 冻存或在不含 AMO 的平板上连续多次传代后丧失。但 DeLoney 和 Schiller^[5] 同 Paul 等^[8] 报道的实验室诱导耐药菌株的耐药性非常稳定,也许 AMO 耐药在不同菌株涉及至少两种不同的机制,分别在不同的情况下激活,致使分别产生稳定的和不稳定的耐药性。AMO 耐药存在不稳定提示我们: *H. pylori* 对 AMO 的耐药很可能只是一种表型变化而非基因型改变,进行间隙性多疗程用药可有效克服 AMO 耐药性形成对疗效的影响。临床上 AMO^r 菌检出率比甲硝唑和克拉霉素的耐药菌要低得多,这可能与它的耐药表型相对不易形成和形成后不稳定有关。一般情况下,从现场取来的胃活检标本都要在冻存条件下运回实验室进行 *H. pylori* 的分离、培养、鉴定和药敏检测,AMO 耐药性有可能随着冻存和传代而丧失,这样得到的 AMO 耐药率很可能不能反映真实的耐药情况。

DHPLC 是近年来发展起来的快速检测点突变或单核苷酸多态性的新技术^[16]。本实验中, *H. pylori* 26695 和 AMO^r 的 *pbp* 基因的 PCR 产物在 50℃ 条件下进行 DNA 长度测定时,二者对应的



注: A:26695; B:AMO^r

图3 部分差异表达蛋白点放大图

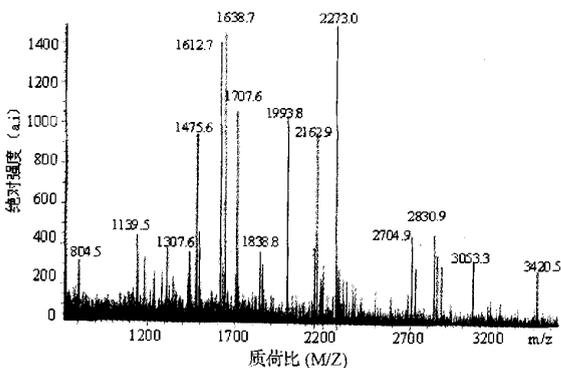


图4 Spot 4 的肽质量指纹图谱

靶序列保留时间相同,说明它们的核苷酸长度相同,耐药菌株的靶序列未发生明显的插入或缺失突变。在部分变性温度检测条件下,*H. pylori* 26695 和 AMO^r 的待测序列的保留时间和峰型一致,二者杂交后的保留时间和峰型与杂交前相比没有变化,说明 AMO^r 的 *pbp* 的全部 13 个片段均未发生点突变。测序结果也显示:耐药菌株和出发菌株的待测序列相同,未检出基因点突变等结构变异,说明 DHPLC 可部分替代测序,用于高通量的基因点突变分析等。综合以上研究结果,认为本实验中 *H. pylori* 阿莫西林耐药性的形成不是由 *pbp* 基因突变所致。

一般情况下细菌对青霉素类的耐药性是通过以下几条途径实现的:①产生 β -内酰胺酶,破坏此类抗生素的 β -内酰胺环,使抗生素失活^[17];②改变细菌外膜蛋白,降低膜通透性,减少药物吸收^[18];③染色体介导改变此类抗生素的作用靶点-PBP。PBP 的改变包括结构和数量的变化,例如与药物亲和力降低,产生缓慢结合的 PBP_s,出现诱导性 PBP_s 等^[19]。尽管在已经测序的两株 *H. pylori* 的基因组中发现有 β -内酰胺酶样的基因存在^[20],目前报道的 *H. pylori* AMO^r 菌,均未检测到 β -内酰胺酶活性^[10,11]。

Dore 等^[7,21]分离到的临床耐药菌,对其他青霉素类药物存在交叉耐药,缺少敏感菌含有的 4 种 PBP 中的 PBP-D。DeLoney 和 Schiller^[5]发现:耐药菌对 β -内酰胺类抗生素的摄取下降,PBP1-阿莫西林亲和力下降。Paul 等^[8]在诱导耐药菌中检测到了 *pbp1* 和 *pbp2* 基因突变,进一步的转化实验表明:突变的 *pbp1* 基因不足以引起高水平的耐药,MIC 仅为 0.5~1 $\mu\text{g/ml}$ 。从上述的研究看 AMO 耐药性很可能与 PBP 有关,本实验中耐药菌的 5 个 *pbp* 基因的靶序列与出发菌株序列相同,未检出基因点突变等结构变异。

蛋白质组学是后基因组时代新兴的研究领域,2-DE 是目前使用最广泛的蛋白分离技术。我们运用 2-DE 和 MALDI-TOF-MS 等蛋白质组学技术比较了耐药菌株和敏感菌株的蛋白表达变化,发现 11 个蛋白斑点在表达量上有显著变化,其中 2 个蛋白斑点(Spot 1 和 Spot 2)只在 AMO^r 中表达,而在出发菌株 26695 中未检出,1 个蛋白斑点(Spot 3)在 AMO^r 中的表达量明显增加,是出发菌株 26695 中的 3.3 倍。Spot 1 为推断蛋白,由 HP0205 编码,只

在 AMO^r 中表达,编码的是参与各类细胞活动的 ATP 酶的 AAA-超家族,这些细胞活动包括膜的融合、蛋白质水解和 DNA 复制等。该蛋白可能通过促进耐药菌胞膜的融合,降低膜的通透性,减少药物吸收,从而导致耐药;Spot 2 为核酸外切酶 VII 的大亚单位,由 HP0259 编码。8 个蛋白斑点(Spot 4~11)在 AMO^r 中的表达量明显下调(表 2 和图 2)。Spot 4 为亮氨酸氨肽酶,由 HP0570 编码;Spot 5 和 Spot 8 为硫氧还蛋白(*trxA*),由 HP0824 编码;Spot 6 为无机焦磷酸酶,由 HP0620 编码;Spot 7 是 HP0697 的预测编码区,可能与丙酮代谢有关;Spot 9 是由 HP1118 编码的 γ -谷氨酰转肽酶(*ggt*);Spot 10 为由 HP1203 编码的转录终止因子 NusG;利用 ExPasy 搜索引擎在 SWISS-2DPAGE 数据库中未检索到 Spot 3 和 Spot 11,为未知蛋白(表 2)。上述差异表达的蛋白究竟在 AMO 的耐药中起着怎样的作用,它们在耐药菌和敏感菌中的表达差异与耐药性形成是一种因果关系还是一种伴随现象,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Torres J, Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, et al. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 2677-2680.
- [2] Wang WH, Wong B, Mukhopadhyay AK, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection with dual resistance to metronidazole and clarithromycin in Hong Kong. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, 214: 901-910.
- [3] Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, et al. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive nitroreductase. *Mol Microbiol*, 1998, 28: 383-393.
- [4] Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 477-480.
- [5] DeLoney CR, Schiller NL. Characterization of an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44: 3368-3373.
- [6] Dore MP, Osato MS, Realdi G, et al. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*, 1999, 43(1): 47-54.
- [7] Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 1999, 4(3): 154-161.
- [8] Paul R, Postius S, Melchers K, et al. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes *rdxA* and *pbp1* cause resistance against metronidazole and amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 962-965.

- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989:464-467.
- [10] Alm RA, Ling LS, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, 1999, 14:176-180.
- [11] Krishnamurthy P, Parlow MH, Schneider J, et al. Identification of a novel penicillin-binding protein from *Helicobacter pylori*. J Bacteriol, 1999, 181:5107-5110.
- [12] Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, 1997, 388:539-547.
- [13] Haas CE, Nix DE, Schentag JJ. In vitro selection of resistant *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother, 1990, 34:1637-1641.
- [14] Hirschall AM, Rotter ML. Amoxicillin for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol, 1996, 31(S9):44-47.
- [15] Han SR, Bhakdi S, Mæurer MJ, et al. Stable and unstable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? J Clin Microbiol, 1999, 37:2740-2741.
- [16] Shen P, Wang F, Underhill PA, et al. Population genetic implications from sequence variation in four Y chromosome genes. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:7354-7359.
- [17] Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev, 1995, 8:557-584.
- [18] Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J Bacteriol, 1996, 178:5853-5859.
- [19] Jacoby GA, Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. N Engl J Med, 1991, 324:601-612.
- [20] Mittl PR, Luthy L, Hunziker P, et al. The cysteine-rich protein A from *Helicobacter pylori* is a beta-lactamase. J Biol Chem, 2000, 275:17693-17699.
- [21] Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR, et al. Sensitivity of amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* to other penicillins. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43:1803-1804.

(收稿日期:2007-11-08)

(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

黑热病一例报道

路宝川 段明友

患者,男,14岁,维吾尔族。因“间断发热,腹胀半年,加重5 d”入吐哈石油医院。患者于入院前半年无诱因出现发热,无明显规律性,未测体温,可自行缓解,腹胀,无寒颤,未诊治;于入院5 d前出现发热加重,最高体温达39.9℃,伴有寒战、乏力、纳差、头晕、腹痛、咳嗽、咳痰;曾于多家医院就诊,给予对症治疗后,效果不明显;于2007年1月29日转入我院。自发病以来体力下降,体重减约3 kg。入院后详细询问病史,患者于8个月前在野外捕获一只野生小黄蛉,并与其同吃同住,形影不离。查体:体温38.9℃,呼吸20次/min,脉搏92次/min,血压120/80 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)。发育、营养中等,中度贫血貌,全身未触及肿大淋巴结,咽部轻度充血,胸骨无压痛,心肺听诊无异常,腹部膨隆,无腹壁静脉曲张,肝上界位于右锁骨中线第6肋间,肝右肋下5 cm,质中,触痛阳性,叩击痛阳性,巨脾(I线8 cm, II线20 cm, III线3 cm),神经系统体查无异常。实验室检查:血常规示:WBC $2.7 \times 10^9/L$, LYM 66.8%, GRN 24.5%, RBC $2.68 \times 10^{12}/L$, HGB 64 g/L, PLT $149 \times 10^9/L$ 。大小便常规正常;肝功能总蛋白104.7 g/L,白蛋白26.5 g/L,球蛋白78.2 g/L,两种蛋白比值0.34,肝功能转氨酶及血清胆红素均正常;C-反应蛋白17.10 mg/L, IgG 3.11 g/L, IgA 1.47 g/L,

IgM 2.31 g/L,类风湿因子89.30 U/ml,抗O 3 IU/ml,补体C3、C4正常,血沉137 mm/h,自身抗体检测均正常。骨髓穿刺涂片显示有核细胞增生活跃,网状巨噬细胞内有大量利什曼原虫无鞭毛体。腹部B超检查肝增大,巨脾;诊断为黑热病。治疗给予葡萄糖酸锑钠静脉滴注1.2 g/d,连用6 d;重组人粒细胞集落刺激因子升高白细胞治疗;2周后患者症状缓解,病情好转后出院。随访1个月后面常规正常,10个月后患者肝脾回缩至正常。

黑热病是由杜氏利什曼原虫引起的慢性地方性传染病,由白蛉通过叮咬人体传播。该病具有地区特点,近年来我国陕西、山西、河北等省有少数散发病例;新疆、甘肃、四川等省(自治区)发病率明显回升。临床特点为长期不规则发热、消瘦、贫血,肝脾进行性肿大及全血细胞减少,可在肝、脾、淋巴结及骨髓中找到病原体,其中骨髓穿刺是最安全可靠的确证检查方法,阳性率80%~90%。本例主要临床表现为发热、贫血、肝脾肿大、全血细胞减少,骨髓检查找到利杜体;在给予葡萄糖酸锑钠治疗后,患者症状迅速缓解。该患者为本地区建国以来第一例黑热病病例,提示对于类似长期不规则发热的患者,应详细询问病史,在排除一般的发热性疾病时,应怀疑黑热病的可能,以免漏诊、误诊。

(收稿日期:2007-10-11)

(本文编辑:尹廉)