

煤矿工尘肺结核患者结核分枝杆菌 L 型耐药基因 *rpoB* 序列分析

陆军 叶松 李朝品 赛文莉 李卫鹏

【摘要】 目的 探讨淮南矿区尘肺结核患者感染结核分枝杆菌 L 型利福平耐药基因 *rpoB* 突变特点。方法 收集结核分枝杆菌 L 型临床分离株 42 株,其中利福平耐药株 31 株,敏感株 11 株,抽提临床分离株 DNA 和 H37Rv 标准菌株 DNA,PCR 法扩增 *rpoB* 基因,并应用全自动 DNA 测序仪对 *rpoB* 基因的突变集中区域进行测序分析。结果 42 株结核分枝杆菌 L 型中,31 株耐药株 *rpoB* 基因突变率 93.55% (29/31),主要集中在 531 位点(51.61%, 16/31)和 526 位点(32.26%, 10/31)碱基置换突变,新发现 516 位点突变目前在国内外研究中未见报道。11 株敏感株未见 *rpoB* 基因单链构象异常。结论 高度保守的 *rpoB* 基因突变是导致结核分枝杆菌 L 型利福平耐药的分子基础,其突变位点呈多样性。

【关键词】 结核分枝杆菌 L 型; 尘肺病; 耐药

Sequence analysis on drug-resistant gene of *rpoB* in *Mycobacterium tuberculosis* L-forms among pneumoconiosis patients complicated with tuberculosis LU Jun*, YE Song, LI Chao-pin, SAI Wen-li, LI Wei-peng. Medical College in Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, China

【Abstract】 Objective To study the drug-resistant characteristics genetic mutation of *rpoB* in *Mycobacterium tuberculosis* L-forms among patients of pneumoconiosis complicated with pulmonary tuberculosis. **Methods** A total of 42 clinical isolated strains of *Mycobacterium tuberculosis* L-forms were collected, including 31 drug-resistant strains. Their genomes DNA were extracted and target genes amplified by PCR. Hot regions in the *rpoB* gene were analyzed by automated DNA sequenator. **Results** No mutation of *rpoB* was identified in 11 rifampicin-sensitive strains while conformation changes were found in 31 rifampicin-resistant strains. The mutation rate was 93.55% (29/31) in resistant strains, mainly concentrated in codon 531 (51.6%, 16/31) and 526 (32.26%, 10/31), happened base substitutions, including 27 unit point mutation and 2 two point mutation. The newly found mutation of codon 516 had not been reported by internal or overseas scholars. **Conclusion** The substitution of highly conserved amino acids encoded by *rpoB* gene resulted in the molecular mechanism was responsible for RFP resistance in *Mycobacterium tuberculosis* L-forms. It also proved that *rpoB* gene was in diversiform.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* L-form; Pneumoconiosis; Drug-resistance

自 20 世纪 80 年代由于 HIV/AIDS 的流行以及耐药性结核分枝杆菌的出现,全球结核病疫情急剧恶化,感染者已达 20 亿^[1,2]。尘肺结核是严重危害煤矿职工身体健康的主要职业病,目前对尘肺结核的治疗方案包括尘肺和肺结核同时治疗,但尘肺病尚无根治药物,因此抗结核药物的选择是尘肺结核治疗的关键。利福平作为结核病治疗的一线抗痨药,随着结核分枝杆菌耐药株的出现和 L 型变异,临床疗效严重降低,已成为人类消灭结核病的一大障碍

^[3]。结核分枝杆菌 L 型利福平耐药基因 *rpoB* 突变约占利福平临床耐药株的 90%^[4,5],但尚无 L 型主要突变位点的报道。本研究通过 DNA 测序,探讨结核分枝杆菌 L 型利福平耐药基因 *rpoB* 突变特点。

材料与方法

1. 菌株来源:2005 年 2 月至 2006 年 6 月,收集安徽理工大学医学院附属医院和淮南矿业集团职业病防治院住院尘肺结核病患者痰标本,检出 42 株结核分枝杆菌 L 型阳性标本,患者年龄 41 ~ 70 岁(平均 53.35 岁),均为男性。质控菌株 H37Rv 由中国药品生物制品检定所提供。

2. 试剂:结核分枝杆菌 L 型药物敏感性检测中所使用利福平为美国 BD 公司产品;结核分枝杆菌 L

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.05.018

基金项目:安徽省高校省级重点自然科学基金项目(KJ2008A152);安徽省教育厅自然科学基金(2005KJ238)

作者单位:232001 淮南,安徽理工大学医学院(陆军、叶松、赛文莉);皖南医学院(李朝品);蚌埠医学院附属医院(李卫鹏)

型液体培养基(92-3 TB-L 液体培养基)和细菌型普通液体培养基(92-3 TB 液体培养基)由蚌埠医学院提供; Taq DNA 聚合酶、dNTP 及 DNA Marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品; 细菌 DNA 回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。

3. 结核分枝杆菌 L 型药敏试验: 药敏试验采用绝对浓度间接法^[1]。首先在 92-3 TB-L 液体培养基加入利福平制成含药液体培养基, 利福平浓度: 高浓度 250 μg/ml、低浓度 50 μg/ml, 然后以无菌吸管吸取 MTB-L 菌液 0.1 ml 接种至上述四种含药液体培养基及不含药 92-3 TB-L 液体培养基(空白对照), 混匀后置 37℃ 培养箱培养 1~3 周。接种后第 3 天起开始观察液体培养基表面或底部有无生长现象, 每周观察 3 次, 离心后取沉淀物涂片采用改良 IK 抗酸染色法镜检。阴性者观察至第 4 周。

4. 结核分枝杆菌 L 型回复试验: 参照《结核分枝杆菌 L 型的检测方法(试行)》^[6], 取 MTB-L 菌液 0.1 ml 接种至 92-3 TB 液体培养基, 混匀后置 37℃ 培养 1~3 周。接种后第 3 天起, 每周观察 3 次, 取沉淀物涂片采用改良 IK 抗酸染色法镜检, 阴性者观察至第 4 周为止。

5. 结核杆菌 DNA 的抽提: 痰标本灭活处理后, 加入 200 μl DNA 裂解液, 55℃ 水浴 1~3 h, 95℃ 5 min, 加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(体积比为 25:24:1)抽提 2 次, 直至无白色中间层。再将上清移入离心管, 加入 2.5 倍体积冰冷无水乙醇, -20℃ 过夜, 14 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 加入 75% 冰冷乙醇后 15 000 r/min 离心洗涤 1 次, 室温干燥, 加 TE 缓冲液(pH 值 7.4) 200 μl 溶解 DNA^[7]。

6. 引物设计: 根据 GenBank 结核分枝杆菌 *rpoB* 基因序列信息, 针对其 69 bp 突变高发区重复保守序列设计引物, 碱基序列为: 上游 5' - CGG ATG ACC ACC CAG GAC - 3', 下游 5' - GGT TTA GAT CGG CAC AT - 3', 扩增片段大小为 258 bp, 由上海生工生物工程技术有限公司提供。

7. PCR 扩增: 采用宝生物工程(大连)有限公司的 50 μl 反应体系。PCR 反应条件: ① 95℃ 预变性 5 min; ② 以下条件循环 33 次: 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 30 s; ③ 72℃ 终延伸 10 min。扩增结束后取 8~12 μl 扩增液, 加入电泳加样液 2 μl, 混匀置 1% 琼脂糖凝胶电泳 20~30 min(5 V/cm), 观察结果, 若 258 bp 处出现特异性条带, 则判为结核分枝杆菌 L 型阳性; 反之, 则为阴性。

8. DNA 序列分析: PCR 产物纯化后由上海博亚

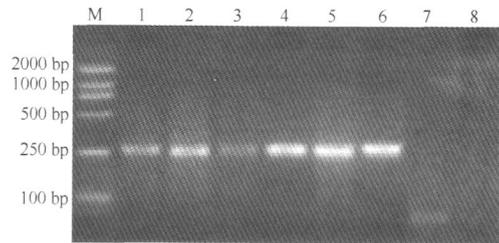
生物技术有限公司测序, 测序所用仪器为美国 ABI 公司 377 型全自动激光测序仪。

9. 统计学分析: 采用 SPSS 12.0 软件系统进行统计学分析。

结 果

1. 药敏试验: 42 株结核分枝杆菌 L 型临床分离株中检出利福平耐药株 31 株, 耐药率 73.81%。

2. *rpoB* 基因的 PCR 扩增: 结核分枝杆菌 L 型 *rpoB* 基因 PCR 产物经过电泳, 若 258 bp 处出现特异性条带, 则判为阳性(图 1)。42 株 MTB-L 临床分离株中利福平耐药株有 31 株, 11 株敏感。



注: 1: H37Rv; 2~6: clinical rifampicin-resistant strains with mutation *rpoB*; 7: clinical rifampicin-sensitive strain to *rpoB*; 8: negative control

图 1 煤矿工尘肺结核病患者临床痰标本 *rpoB* 基因 PCR 扩增结果

3. PCR 产物测序分析: 31 株耐药株中 *rpoB* 基因突变的有 29 株, 突变率 93.55%(29/31)(表 1), 主要集中在 531 位点(51.61%, 16/31)和 526 位点(32.26%, 10/31)碱基置换突变, 新发现 516 位点突变 1 株(3.23%, 1/31); 其中 27 株单位点突变, 2 株双位点突变, 2 株未发现 *rpoB* 基因突变。11 株敏感株未见 *rpoB* 基因单链构象异常。

表 1 31 株结核分枝杆菌 L 型临床耐药株 *rpoB* 基因突变特征

菌株数	氨基酸位置	碱基置换突变	氨基酸突变	百分率 (%)
10	531	TCG→TTG	Ser→Leu	32.26
6	531	TCG→TGG	Ser→Trp	19.35
5	526	CAC→GAC	Gln→Asp	16.13
2	526	CAC→TAC	Gln→Cas	6.45
1	526	CAC→CTC	Gln→Leu	3.23
1	526	CAC→CGC	Gln→Arg	3.23
1	526	CAC→GTC	Gln→Val	3.23
1	516	GAC→GGC	Asp→Gly	3.23
1	511, 526	CTG→CCG, CAC→CTC	Leu→Pro, Gln→Leu	3.23
1	526, 531	CAC→CTC, TCG→TGG	Gln→Leu, Ser→Trp	3.23
2	-	-	-	6.45

讨 论

结核分枝杆菌 L 型现已被认为是一种主要的耐药菌,对异烟肼、利福平和链霉素的耐药率分别为 76.92%、90.38% 和 50.00%^[8]。结核分枝杆菌耐药性的发生与耐药相关基因突变有关^[9-11]。异烟肼是酰肼类化学合成药物, *katG* 基因(过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因)缺失或突变,使过氧化氢酶-过氧化物酶活性丧失或降低,导致耐异烟肼的产生^[9]。结核分枝杆菌对链霉素产生耐药的原因是由于其核糖体蛋白 S12 编码基因(*rpsL*)突变所致^[10]。利福平作为最重要的抗结核药物之一,是多种药物联合化疗治疗结核病的基本组成部分,但也是最易产生耐药性的药物^[8]。结核分枝杆菌耐利福平的分子机制与 RNA 聚合酶 β 亚单位编码 *rpoB* 基因突变有关,利福平通过和结核杆菌中 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的结合来抑制转录过程,导致细胞死亡^[11]。96% 耐药菌株的产生是由 *rpoB* 基因突变所致,主要集中在 69 个碱基区域(利福平耐药决定区)内的各种突变,也有少量发生碱基插入或缺失,共 35 种,其中 43% 为错义突变^[12]。*rpoB* 基因中 513、526、531 位点突变导致利福平高度耐药(MIC > 32 μg/ml),尤以 513 位点突变产生的耐药性最高,514、521、533 位点突变导致利福平低度耐药(MIC < 12.5 μg/ml)^[13-15]。理论上结核分枝杆菌耐利福平有两种可能:一是药物作用靶分子 RNA 聚合酶 β 亚基的突变;二是细胞壁渗透性改变导致药物的摄取减少^[16]。杨柳等^[17]采用 PCR-SSCP 法检测 *rpsL*、*rpoB* 和 *katG* 基因突变情况,发现突变率分别为 40%、45% 和 38%,结果表明,结核分枝杆菌 L 型耐药产生与相关基因突变之间存在着密切联系。

本研究发现尘肺结核患者 31 株耐药株中 *rpoB* 基因突变的有 29 株,突变率为 93.55% (29/31)。单位点突变 27 株,其中 531 点突变为 16 株(51.61%), 10 株为 Ser→Leu (TCG→TTG), 6 株 Ser→Trp (TCG→TGG); 526 位点突变为 10 株(32.26%), 包括 5 株 Gln→Asp (CAC→GAC), 2 株 Gln→Cas (CAC→TAC), 1 株 Gln→Leu (CAC→CTC), 1 株 Gln→Arg (CAC→CGC) 和 1 株 Gln→Val (CAC→GTC)。可见结核分枝杆菌 L 型 *rpoB* 基因单位点突变主要集中在 531、526 位,占 83.87% (26/31),接近结核分枝杆菌细菌型 65% ~ 86% 突变率^[13,18]。516 位发生的点突变为同义突变,回复为细菌型后突变消失。11 株敏感株未见 *rpoB* 基因单链构象异常。

此外,发现 2 株双位点突变,1 株为 526 位和 531 位同时突变(Gln→Leu、Ser→Trp),另 1 株为 511 位和 526 位同时突变(Leu→Pro、Gln→Leu),突变率 6.45% (2/31),略低于与国内外报道^[10,16]。本研究发现的联合突变类型为点突变,未发现文献报道的沉默突变和插入突变。究竟是结核分枝杆菌 L 型 *rpoB* 基因突变的新特点,还是抽样误差所致,需进一步扩大样本量来验证。

参 考 文 献

- [1] 李影林, 主编. 中华医学检验全书. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1119-1120.
- [2] Du LC, Pillay V, Danckwerts MP. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respires*, 2006, 197(1): 118-119.
- [3] Telenti A, Lseman M. Drug-resistant tuberculosis. *Drug*, 2000, 59(2): 171-179.
- [4] Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, et al. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *J Clin Microbiol*, 2000, (38): 3119-3121.
- [5] Ahmad S, Mokaddas E, Farees E. Characterization of *rpoB* mutation in rifampin resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kuwait and Dubai. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002, 44(3): 245-246.
- [6] 戴云海, 李明君, 林特夫. 临床标本分枝杆菌及其 L 型液体培养与检出. *贵州医学*, 1995, 19(8): 278-280.
- [7] 程晓东, 于文彬, 苏明权, 等. 多重聚合酶链反应检测结核菌耐异烟肼相关基因. *第四军医大学学报*, 2003, 24(9): 849-851.
- [8] 陆军, 叶松, 李朝品. 淮南矿区尘肺结核患者结核分枝杆菌 L 型耐药性及相关基因突变. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2007, 25(6): 369-370.
- [9] Dribniewski FA. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* a molecular story. *J Med Microbiol*, 1998, (47): 189.
- [10] Morris S, Bai GH, Stffys P, et al. Molecular mechanism of multiple drug resistance in clinical isolates of *M. tuberculosis*. *J Infect Dis*, 1995, (171): 954-955.
- [11] Pozzi G, Meloni M, Iona E, et al. *ropB* mutation in multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(4): 1197-1199.
- [12] 吴雪琼, 庄玉辉, 张俊仙, 等. 耐多药结核病耐药分子机制的研究. *中华结核和呼吸杂志*, 1997, 20(6): 332-335.
- [13] Isakova ZT. Use of biological microchips in the determination of drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin. *Probl Tuberk Bolezn Legk*, 2005, (8): 50-53.
- [14] Heep M. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(4): 1075-1077.
- [15] Kapur, Li L, Iordaneseu S. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA β subunit in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol*, 1994, (4): 1095-1098.
- [16] 王和, 陈峰宏. 抗结核药物诱导结核分枝杆菌形成 L 型及其特性的观察. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(1): 52-55.
- [17] 杨柳, 苏明权, 程晓东, 等. PCR-SSCP 法检测结核分枝杆菌耐药性. *第四军医大学学报*, 2003, 24(23): 2142-2145.
- [18] 朱敏, 范玉美, 盛国平, 等. 浙江省耐药结核分枝杆菌 *katG*、*rpoB*、*embB* 基因突变特点研究. *医学研究杂志*, 2008, 37(3): 26-29.

(收稿日期: 2008-10-06)

(本文编辑: 张林东)