

# 异烟肼诱导单耐异烟肼结核分枝杆菌假定药物外排泵基因表达量变化的初步研究

张敬蕊 李桂莲 赵秀芹 万康林 吕建新

**【摘要】 目的** 检测单耐异烟肼结核分枝杆菌经异烟肼诱导培养前后假定药物外排泵基因表达量的变化,探讨可能导致结核分枝杆菌对异烟肼耐药的外排泵基因及导致基因高表达的原因。**方法** 选取35株单耐异烟肼结核分枝杆菌临床分离株、10株全敏结核分枝杆菌临床分离株和H37Rv(标准对照),对各菌株进行无异烟肼和亚抑菌异烟肼浓度(1/4 MIC)的7H9液体培养基诱导培养,提取RNA后反转录并采用real-time PCR技术分别检测27个假定外排泵基因表达量的变化,用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算每个假定基因相对表达量的差异倍数。**结果** 耐药株中27个假定外排泵基因有13个基因高表达,高表达Rv1258c基因的菌株数最多为6株,其次是高表达Rv2265和Rv0849的菌株各有5株。35株菌中14株菌(40.00%)有高表达的外排泵基因,6株(17.14%)菌株均只有1个假定外排泵基因高表达;8株(22.86%)菌株有两种及以上基因高表达,其中4、2、1、1株菌株分别有2、4、5、7个基因高表达;10株全敏菌株和H37Rv 27个假定外排泵基因均无高表达。**结论** Rv1258c、Rv2265和Rv0849等基因可能是导致结核分枝杆菌对异烟肼耐药的外排泵基因,异烟肼可能为结核分枝杆菌部分假定外排泵基因的诱导物而导致其激活并高表达。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 异烟肼; 假定药物外排泵基因

**A primary investigation on the isoniazid-induced alterations in efflux gene expression among the isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates** ZHANG Jing-rui<sup>1,2</sup>, LI Gui-lian<sup>2</sup>, ZHAO Xiu-qin<sup>2</sup>, WAN Kang-lin<sup>2</sup>, LV Jian-xin<sup>1</sup>. 1 Wenzhou Medical College School of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medicine, Wenzhou 325035, China; 2 State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: LV Jian-xin, Email: jxlu313@163.com

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2008ZX10003-003) and National Science and Technology Key Program of Mega Infectious Diseases (No. 2008ZX10003-010).

**【Abstract】 Objective** To detect the changes on the expression of putative drug efflux genes caused by isoniazid-inducement in single resistance to the isoniazid *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) clinical isolates, for exploring the putative efflux genes which causing *M. tuberculosis* isoniazid resistance as well as the mechanism related to high expression of the putative efflux genes. **Methods** We selected 35 *M. tuberculosis* clinical isolates which were only resistant to isoniazid as well as 10 sensitive *M. tuberculosis* clinical isolates and using H37Rv as control. Each strain was cultured in 7H9 liquid medium without isoniazid and with subinhibitory isoniazid concentration (1/4 MIC) induction. After RNA extraction and reverse transcription, real-time PCR was conducted to assess the expression changes of 27 putative drug efflux pump genes with formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  to calculate the expression of each putative drug efflux pump genes. **Results** Of the 27 putative genes, 13 of them were expressed at high level. High expression of Rv1258c gene had the maximum number of 6 strains, followed by high expression of Rv0849 and Rv2265 which both had 5 strains. Fourteen strains (40.00%) out of the 35 strains had high expression pump genes. Six strains (17.14%) had only one

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.04.016

基金项目:国家重大科技专项(2008ZX10003-003);国家重大传染病专项课题(2008ZX10003-010)

作者单位:325035 温州医学院检验医学院检验医学教育部重点实验室(张敬蕊、吕建新);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室(张敬蕊、李桂莲、赵秀芹、万康林)

张敬蕊、李桂莲同为第一作者

通信作者:吕建新, Email: jxlu313@163.com

highly expressed putative efflux pump gene. Eight strains (22.86%) had two or more highly expressed putative efflux pump genes, including two, four, five, seven genes that highly expressed in 4, 2, 1, 1 strains respectively. For the 27 putative genes, ten sensitive strains and H37Rv did not show highly expressed genes. **Conclusion** *Rv1258c*, *Rv2265*, *Rv0849*, etc. genes might be the putative efflux pumps genes of *M. tuberculosis* resistant to isoniazid. Isoniazid might serve as the inducer of *M. tuberculosis* part putative efflux pump genes, inducing activation and causing high expression of these putative efflux pump genes.

**[Key words]** *Mycobacterium tuberculosis*; Isoniazid; Putative drug efflux pump genes

结核分枝杆菌耐药机制主要包括基因突变使药物作用靶位丧失、细菌细胞壁通透性的改变使药物不能有效进入细胞内及依赖主动外排系统(外排泵)将细菌胞内药物泵出。根据药物外排机制的不同,外排泵可分为 ATP 水解能驱动型和跨膜质子梯度能驱动型两大类,划分为 5 个主要超家族,包括主要易化子超家族(major facilitator super family, MFS 家族)、ATP 结合盒超家族(ATP-binding cassette super family, ABC 家族)、耐药结节化细胞分化超家族(resistance nodulation division family, RND 家族)、小耐多药性家族(small multidrug resistance family, SMR 家族)及多药和有毒物质外排家族(multidrug and toxic compound extrusion family, MATE 家族)<sup>[1]</sup>。相关研究证明结核分枝杆菌可通过药物外排泵对异烟肼药物做出应答反应导致其耐药<sup>[1,2]</sup>,但目前鲜见与异烟肼耐药有关的外排泵基因及其引起基因表达量改变原因的报道。本研究通过 real-time PCR 检测单耐异烟肼结核分枝杆菌在无异烟肼和亚抑菌的异烟肼浓度[1/4 最小抑菌浓度(MIC)]诱导下假定药物外排泵基因相对表达量的变化,探讨结核分枝杆菌对异烟肼耐药起到药物外排作用的基因及导致基因高表达的原因,为结核病治疗提供新的依据。

### 材料与方法

1. 菌株:本研究菌株源自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核室(分别收集自福建、广西、河南、湖南、四川和新疆等省)并经筛选。其中经传统菌种鉴定和比例法药敏试验检测证实<sup>[3]</sup>,单耐异烟肼(对利福平、乙胺丁醇、链霉素氧氟沙星、卡那霉素、阿米卡星和卷曲霉素敏感)结核分枝杆菌临床分离株 35 株和对上述药物均敏感(全敏)结核分枝杆菌临床分离株 10 株,以结核分枝杆菌标准敏感菌株(H37Rv, ATCC27294)作为标准对照。

2. 主要试剂及仪器:Middlebrook 7H9 干粉和 ADC 营养添加剂购自美国 BD 公司;异烟肼等药物干粉购自美国 Sigma 公司;Alamar blue 试剂购自美国 AbD Serotec 公司;Trizol 试剂、去除 DNA 试剂盒

购自美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒、SYBR 法 real-time PCR 试剂为康为公司产品;荧光定量 PCR 仪为美国伯乐公司的 Bio-Rad iQ5。

3. 基因组提取、测序和分型鉴定:基因组提取采用 CTAB 法<sup>[4]</sup>。利用直接测序法检测异烟肼耐药相关基因 *katG*、*inhA* 和 *oxyR-ahpC*,引物序列、反应体系及反应条件参考文献[5]。PCR 产物直接送北京擎科新业生物技术有限公司进行单向测序,采用生物信息学软件 DNASTar Lasergene Editseq 7.1.0 和 GENTle1.9.1 对测序得到的基因序列与 H37Rv 基因序列进行比对。基因分型鉴定采用 Spoligotyping 法<sup>[6]</sup>。

4. MIC 测定:结核分枝杆菌异烟肼 MIC 的测定采用微孔板 Alamar blue 显色法<sup>[7]</sup>。

5. 假定药物外排泵基因的检测:

(1)基因的选取及引物设计:根据 H37Rv 菌株全基因组序列选取管家基因 *secA1* 和 27 个假定药物外排泵基因,应用 Primer 5 软件设计引物,然后通过 NCBI-BLAST 再次检测其特异性,引物见参考文献[8](本研究无基因 *Rv1877*)和表 1。

表 1 假定药物外排泵基因家族、引物序列及扩增片段

基因	家族	引物序列	产物长度 (bp)
<i>Rv0037c</i>	MSF	F: 5'-GCGAAGAACAGCAGTGC GGTA-3' R: 5'-GCATCGGATGGTGGTTCGGTATC-3'	105
<i>Rv0191</i>	MSF	F: 5'-GCTGCCATGAGCCTGATGTG-3' R: 5'-CGAGGATTACGGTGGTGACGAG-3'	164
<i>Rv1672c</i>	MSF	F: 5'-CCGTTGTTGGCAGTGTGATATGG-3' R: 5'-CGCTGTATGCGTTGCAGTTCTT-3'	189
<i>Rv0842</i>	MSF	F: 5'-GCCGCTGTATACCTGCCGATGT-3' R: 5'-TTGTCCGAGAGTGCCGCGATA-3'	100
<i>Rv0876</i>	MSF	F: 5'-GGACCGATGAGTGGAGCGATCA-3' R: 5'-ACTCGCAATGGCGGTAGCA-3'	133
<i>Rv2265</i>	MSF	F: 5'-CGGTTGCTCTCGGTAATCCT-3' R: 5'-ATGTGGATGGCGGTGTGTT-3'	112
<i>Rv2456</i>	MSF	F: 5'-CAGCGAACCCACCAAA-3' R: 5'-GCACAATCGAGACGAAGGAA-3'	140
<i>Rv3239</i>	MSF	F: 5'-GCCGATTCCTGGCACTTTT-3' R: 5'-ATGTGGATGGCGGTGTGTT-3'	146
<i>secA1</i>	内参基因	F: 5'-AGAGGTGTTACGCCACTTACG-3' R: 5'-GCTGGAGGCACTACTCAAGGAC-3'	146

(2)细菌总 RNA 的制备:刮取 2~3 周罗氏培养基培养的新鲜菌落调至 1 个麦氏浊度,每株菌各取 1 个麦氏浊度菌液 2 ml 置 28 ml 7H9 培养基中,接种 2 份,其中一份将异烟肼浓度调至该菌株的异烟肼 1/4 MIC(亚抑菌浓度);置 37 °C 培养箱培养 21 d;离心留沉淀,用 Trizol 法提取总 RNA,采用分光光度计测定总 RNA 的纯度和浓度,并以此确定其质量。

(3)去除 DNA 污染:用去除 DNA 试剂盒处理经上述提取的总 RNA,体系为 20 µl: 100 × DNase I Reaction Buffer 2 µl、0.5 µl DNase I (Amp Grade, 1 U/µl)、0.5 µl RNase Inhibitor、总 RNA 1500 ng,加 Rnase-Free Water 至 20 µl,室温放置 15 min,加 1 µl 的 EDTA(25 mmol/L)终止反应,65 °C 10 min 灭活。

(4)反转录合成 cDNA:去除 DNA 污染后的总 RNA 用反转录试剂盒进行反转录操作,以合成第一链 DNA(即 cDNA)。反应体系 50 µl: 7.5 µl dNTP Mix(2.5 mmol/L Each)、4.5 µl Primer Mix、10 µl 5 × RT Buffer、4.5 µl DTT(0.1 mol/L)和 2.5 µl HiFi-MMLV(200 U/µl)、21 µl 去除 DNA 后的总 RNA(共 1500 ng),将混合液振荡混匀,短暂离心,在 42 °C 50 min、70 °C 15 min 的条件下合成 cDNA。用 EASY Dilution 将 cDNA 调节浓度至 10 ng/µl,-20 °C 保存备用。

(5)real-time PCR:采用 SYBR 法 real-time PCR 试剂盒,反应体系为 20 µl: 10 µl 2 × UltraSYBR Mixture、0.3 µl Forward Primer(10 µmol/L)、0.3 µl Reverse Primer(10 µmol/L)、1 µl cDNA(10 ng/µl)、Rnase-Free water 8.4 µl,混匀;循环参数(两步法 PCR):95 °C 预变性 10 min,然后 95 °C 变性 15 s,退火/延伸 60 °C 1 min,40 个循环。内参基因为 *secA1*。

6. 统计学分析:采用公式  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算假定药物外排泵基因相对表达量差异倍数,其中  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{药物诱导}} - \Delta CT_{\text{无药物}}$ , $\Delta CT$  值分别为对照(无药物)和药物诱导情况下每株菌株目标基因与内参基因 *secA1* 的 CT 值之差即  $\Delta CT = CT_{\text{检测基因}} - CT_{\text{secA1}}$ 。当相对表达量差异倍数  $\geq 4$  时认为该假定药物外排泵基

因为高表达<sup>[9]</sup>。

## 结 果

1. 菌株的 MIC 及 *katG*、*inhA* 和 *oxyR-ahpC* 基因突变:35 株单耐异烟肼结核分枝杆菌中 24 株(68.60%)的 MIC 为 2 µg/ml,其中 22 株发生 *katG* 315 AGC-ACC(Ser-Thr)突变,2 株未发生突变;5 株菌 MIC 为 1 µg/ml,其中 2 株发生 *katG* 315AGC-ACC(Ser-Thr)突变,3 株发生 *inhA*(-15)C-T 突变;5 株菌 MIC 为 4 µg/ml,其中 3 株发生 *katG* 315AGC-ACC(Ser-Thr)突变,1 株发生 *ahpC*(-88)G-A 突变,1 株未发生突变;仅有 1 株临床株 MIC 与 H37Rv 相同,均为 0.25 µg/ml,该临床株为 *katG* 261GAA-GAC(Glu-Asp)和 *inhA*-15C-T 联合突变。全敏菌株均无突变,其中 6 株菌株 MIC 为 0.25 µg/ml,3 株菌为 0.125 µg/ml,1 株菌株仅为 0.04 µg/ml(表 2)。

2. Spoligotyping 基因分型鉴定:35 株临床分离株中 Beijing 型菌株最多为 15 株,其次为 U 型 5 株,H3 和 T1 型各 4 株,T2 型 2 株,T4 型 1 株,另 4 株为数据库中不存在的新基因型菌株(000203004103771、77773776720771、777757637760631、777737477760771);10 株全敏临床菌株中 Beijing 型 4 株,T1 型 2 株,4 株为数据库中不存在的新基因型菌株(57777403760731、577400000000000、577400000000000、000000034103771)。

3. 假定药物外排泵基因检测:标准菌株 H37Rv 的 27 个假定药物外排泵基因的相对表达量差异倍数均无意义,即差异倍数 0~ 倍为 9 个基因,1~ 倍为 13 个基因,2~ 倍为 5 个基因,无相对表达量差异倍数  $> 3$  的基因;*Rv2937* 相对表达量差异倍数最大(2.77),*Rv0191* 最小(0.47)。10 株全敏临床菌株的 27 个假定药物外排泵基因的相对表达量差异倍数均无意义,且每个基因表达量差异倍数在 0~ 2 倍之间的菌株数占 80% 以上(表 3)。

本研究 27 个假定药物外排泵基因中 14 个基因的相对表达量差异倍数在所有菌株中均  $< 4$ ,13 个

表 2 全敏、单耐异烟肼结核分枝杆菌和 H37Rv 的 MIC、诱导药物浓度及基因突变结果

全敏菌(n=10)				单耐菌(n=35)			
MIC (µg/ml)	菌株数	诱导浓度 (µg/ml)	突变类型	MIC (µg/ml)	菌株数	诱导浓度 (µg/ml)	突变类型
0.04	1	0.001	WT	0.25	1	0.0625	1 株 <i>katG</i> 261 GAA-GAC + <i>inhA</i> (-15)C-T
0.125	3	0.03125	WT	1	5	0.25	2 株 <i>katG</i> 315 AGC-ACC, 3 株 <i>inhA</i> (-15)C-T
0.25	6	0.0625	WT	2	24	0.5	22 株 <i>katG</i> 315 AGC-ACC, 2 株未突变
0.25(H37Rv)	1	0.0625	WT	4	5	1	3 株 <i>katG</i> 315 AGC-ACC (Ser-Thr), 1 株 <i>ahpC</i> (-88)G-A 和 1 株未突变

注:WT(wild type,野生型)指未发生相关基因突变

**表 3** 结核分枝杆菌耐药菌株和全敏菌株 27 个假定外排泵基因的相对表达量差异倍数

基因	耐药菌株(n=35)					全敏菌株(n=10)				
	不同相对表达量差异倍数					不同相对表达量差异倍数				
	0~	1~	2~	3~	>4	0~	1~	2~	3~	>4
<i>Rv2936</i> <sup>a</sup>	19	12	2	1	1	4	5	1	0	0
<i>Rv2937</i> <sup>a</sup>	17	13	4	0	1	5	4	1	0	0
<i>Rv2846c</i> <sup>a</sup>	17	6	6	2	4	3	5	2	0	0
<i>Rv3065</i> <sup>a</sup>	16	12	3	3	1	3	7	0	0	0
<i>Rv0783c</i>	17	14	4	0	0	3	7	0	0	0
<i>Rv0849</i> <sup>a</sup>	12	13	4	1	5	4	6	0	0	0
<i>Rv1145</i>	14	15	5	1	0	7	3	0	0	0
<i>Rv1146</i> <sup>a</sup>	15	16	2	1	1	6	4	0	0	0
<i>Rv1250</i>	20	14	0	1	0	5	5	0	0	0
<i>Rv1258c</i> <sup>a</sup>	18	7	3	1	6	6	2	2	0	0
<i>Rv1410c</i>	16	15	3	3	0	7	3	0	0	0
<i>Rv1634</i>	15	17	3	0	0	8	2	0	0	0
<i>Rv1819c</i> <sup>a</sup>	14	17	2	0	2	7	1	2	0	0
<i>Rv2209</i> <sup>a</sup>	12	17	4	1	1	7	3	0	0	0
<i>Rv2294</i>	16	17	2	0	0	5	5	0	0	0
<i>Rv2333c</i>	15	10	6	4	0	5	4	1	0	0
<i>Rv2459</i>	19	16	0	0	0	6	4	0	0	0
<i>Rv0933</i>	15	18	2	0	0	6	2	1	1	0
<i>Rv2456</i>	14	19	2	0	0	6	4	0	0	0
<i>Rv2265</i> <sup>a</sup>	14	10	5	1	5	7	3	0	0	0
<i>Rv3239c</i> <sup>a</sup>	19	13	0	1	2	9	1	0	0	0
<i>Rv2938</i> <sup>a</sup>	16	14	4	0	1	6	3	1	0	0
<i>Rv1672</i>	15	18	2	0	0	5	5	0	0	0
<i>Rv0842</i>	17	12	2	4	0	5	5	0	0	0
<i>Rv0876c</i>	20	13	2	0	0	7	3	0	0	0
<i>Rv0037c</i>	14	16	4	1	0	5	5	0	0	0
<i>Rv0191</i> <sup>a</sup>	14	11	2	4	4	5	3	2	0	0

注:<sup>a</sup>耐药菌株中表示高表达基因

基因(*Rv1258c*、*Rv1819c*、*Rv3239c*、*Rv2846c*、*Rv0191*、*Rv2265*、*Rv0849*、*Rv2209*、*Rv2936*、*Rv2937*、*Rv1146*、*Rv2938c*和*Rv3065*)相对表达量差异倍数在部分菌株中>4(即高表达),其中高表达*Rv1258c*的菌株数最多为6株,高表达*Rv2265*和*Rv0849*的各为5株,高表达*Rv2846c*和*Rv0191*的各为4株,高表达*Rv1819c*和*Rv3239c*的各为2株,高表达*Rv2209*、*Rv2936*、*Rv2937*、*Rv1146*、*Rv2938c*和*Rv3065*的各为1株(表3)。35株菌中14株(40.00%)有高表达基因,其中8株(22.86%)有≥2个高表达基因(高表达2、4、5、7个基因分别有4、2、1、1株),6株菌均只高表达1个假定外排泵基因。14株菌中11株携带*katG* 315 AGC-ACC(Ser-Thr)突变、2株携带*inhA*(-15)C-T和1株携带*ahpC*(-88)G-A突变;Beijing型有7株,T1型和U型各2株,T2、H3和新基因型(777737776720771)各1株。高表达ABC家族的*Rv2936*、*Rv2937*和*Rv2938*的菌株均为T1型,且相对

表达量差异倍数也接近。6株菌只有1株高表达基因*Rv3065*的相对表达量差异倍数最高为13.15;高表达*Rv0191*的菌株有4株,平均表达量差异倍数次之(12.05);*Rv2209*表达量差异倍数最低为4.10(表4)。

**表 4** 结核分枝杆菌高表达假定药物外排泵基因相应菌株的特征

基因	高表达菌株数(%)	表达量差异倍数	基因型	MIC (μg/ml)	突变位点
<i>Rv2209</i>	1(2.90)	4.10	H3	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv2936</i>	1(2.90)	4.30	T1	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv2937</i>	1(2.90)	5.02	T1	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv1146</i>	1(2.90)	5.50	Beijing	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv2938c</i>	1(2.90)	6.89	T1	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv3065</i>	1(2.90)	13.15	T1	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv1819c</i> <sup>a</sup>	2(5.71)	5.08±0.80	H3	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	1	<i>inhA</i> -15
<i>Rv3239c</i> <sup>a</sup>	2(5.71)	11.02±9.84	H3	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv2846c</i> <sup>a</sup>	4(11.43)	9.39±4.76	T1	2	<i>katG</i> 315
			T1	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv0191</i> <sup>a</sup>	4(11.43)	12.05±6.77	T1	2	<i>katG</i> 315
			T1	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
			T2	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv2265</i> <sup>a</sup>	5(14.29)	6.07±1.79	H3	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	1	<i>inhA</i> -15
			U	2	<i>katG</i> 315
			U	4	<i>ahpC</i> -88
<i>Rv0849</i> <sup>a</sup>	5(14.29)	8.82±4.92	Beijing	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
			T1	2	<i>katG</i> 315
			T2	2	<i>katG</i> 315
<i>Rv1258c</i> <sup>a</sup>	6(17.14)	5.21±0.80	Beijing	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	2	<i>katG</i> 315
			Beijing	1	<i>inhA</i> -15
			H3	2	<i>katG</i> 315
			777737776720771	1	<i>katG</i> 315

注:<sup>a</sup> $\bar{x} \pm s$

### 讨 论

异烟肼暴露可引起结核分枝杆菌选择性出现*katG*基因突变或缺失并趋于稳定,同时伴有药物外排泵活性持续增加<sup>[10]</sup>,表明除了基因突变导致的异烟肼耐药外,外排泵的激活是导致异烟肼耐药的另一机制。通过对35株单耐异烟肼和10株全敏结核分枝杆菌采用异烟肼诱导培养前后27个假定外排

泵基因(5个ABC家族、21个MFS和1个不确定的家族)表达量进行研究,分析其对异烟肼耐药中发挥药物外排作用的基因及可能导致基因高表达的原因,为进一步了解细菌耐药外排泵的机制奠定基础。

本研究结果显示共在14株菌(40.00%)中发现13个基因高表达(差异倍数>4),这与DeMarco等<sup>[11]</sup>研究金黄色葡萄球菌外排泵基因中有49.14%(114/232)的菌株高表达外排基因较接近,但高于Gupta等<sup>[2]</sup>报道8.33%(5/60)的菌株高表达外排泵基因。同时高表达13个基因的菌株均携带*katG315* AGC-ACC (Ser-Thr)突变,其中高表达*Rv2265*、*Rv0849*和*Rv1258c*基因的菌株还有携带*inhA*(-15) C-T和*ahpC*(-88)G-A突变。

1. MFS家族:是最大的膜转运家族之一<sup>[12]</sup>。本研究中属于MFS家族高表达的基因有*Rv2846c*、*Rv0849*、*Rv1258c*、*Rv0191*、*Rv2265*和*Rv3239c*。Sharma等<sup>[13]</sup>报道*Rv1258c*是结核分枝杆菌的假定外排泵基因,另一项研究证明一株耐多药临床分离菌在利福平或异烟肼药物作用下*Rv1258c*均出现高表达<sup>[14]</sup>。本研究中高表达*Rv1258c*的菌株数为6株,平均表达倍数为5.21,同时有报道*Rv1258c*也是四环素药物的外排泵基因<sup>[15]</sup>。BLASTP分析假定外排泵基因*Rv3239c*和*Rv0849*具有典型的MFS转运蛋白编码序列A和B及典型的药物逆向运输蛋白编码序列C<sup>[15]</sup>。Balganesh等<sup>[16]</sup>报道*Rv0849*所编码的外排泵能够介导药物的排出,但是其程度较轻。本研究高表达*Rv0849*的菌株有5株,平均表达差异倍数为8.82,由此可见该基因在异烟肼诱导下可起到药物外排作用。根据H37Rv的全基因组序列,Wilson等<sup>[17]</sup>利用基因芯片杂交技术和诱导基因表达方法,发现异烟肼和乙硫异烟胺诱导可增加*efpA*(*Rv2846c*)基因的表达,其差异倍数只有2.5倍,而本研究检测的4株高表达菌均>5倍,最高可达16.24倍;此外还发现*Rv2846c*基因表达差异倍数(9.3倍)高于Fu和Shinnick<sup>[18, 19]</sup>报道(分别为4~倍和3.2倍)。由此推断*Rv2846c*可能是引起结核分枝杆菌对异烟肼耐药的原因。本研究的*Rv3239c*在2株菌中高表达,差异倍数平均为11.20,证明其可能为药物外排泵基因。同时还通过实验证实*Rv2265*在5株菌中高表达,差异倍数平均值为6.07,提示*Rv2265*有药物外排作用。De Rossi等<sup>[15]</sup>报道假定外排泵基因*Rv0191*属于MFS家族,但尚无相关数据证实其在结核菌中起到药物外排作用。本研究发现4株菌高表达该基因,且平均倍数高达12.05,因此首次证明

*Rv0191*可能为外排泵基因。

2. ABC家族:编码ABC家族的基因大约占结核分枝杆菌基因组的2.5%<sup>[20]</sup>。本研究中属于ABC家族高表达基因有*Rv2936*、*Rv2937*、*Rv2938*和*Rv1819*。结核分枝杆菌中开放阅读框*drrA*(*Rv2936*)和*drrB*(*Rv2937*)编码ABC型转运,研究发现*drrAB*在耻垢分枝杆菌中表达时表现出对利福平、四环素、红霉素等临床常用抗生素耐药,提示它可能在结核分枝杆菌抗生素耐药中起作用。本研究中*Rv2936*和*Rv2937*两个基因均高表达,且表达差异倍数接近,同时相应的菌株MIC均为2 μg/ml,基因分型均为T1型且突变位点均为*katG315*,由此可见两个基因之间确实存在一定的相关性。*Rv2938*(*drrC*)也属于ABC家族转运蛋白*drrABC*操纵子组成部分,有文献报道其在乙胺丁醇诱导下表达量差异倍数为4.09<sup>[21]</sup>,本研究在异烟肼诱导下其同样高表达(6.89倍),说明该基因有不同的作用底物。此外,分别高表达*Rv2936*、*Rv2937*和*Rv2938*基因的3株菌的基因型均为T1型,说明*drrABC*基因的高表达可能与菌株基因型有关。假定外排泵基因*Rv1819*的相对表达量差异倍数为5.08倍,与Gupta等<sup>[2]</sup>报道的4.14倍接近。

3. SMR家族和RND家族:本研究中属于SMR家族的高表达基因有*Rv3065*,属于RND家族的高表达基因有*Rv1146*。*Rv3065*是SMR家族的外排泵基因,可外排多种抗生素<sup>[21]</sup>,Rodrigues等<sup>[22]</sup>报道2株异烟肼诱导的菌株表达量差异倍数分别为3.1和31.1,本研究同样证明其外排作用(差异倍数为13.15)。结核分枝杆菌两个相邻的同源基因*Rv1145*和*Rv1146*,在耻垢分枝杆菌中被发现形成一个单一的开放阅读框架<sup>[23]</sup>,并且实验证明破坏该开放阅读框架并未改变菌株对药物的敏感性,在本研究中两者的表达水平不一样,*Rv1145*未发现高表达而*Rv1146*在1株菌中高表达。此外,*Rv2209*不确定属于哪个家族,Gupta等<sup>[2]</sup>已经证明*Rv2209*在结核分枝杆菌中对氧氟沙星起到外排的作用,本研究在1株菌中发现它对异烟肼起到外排的作用,表达量差异倍数为4.10。

综上所述,本研究未发现高表达假定药物外排泵基因与菌株的基因型有特定的关联性,只是个别基因高表达(如*drrABC*基因)可能与菌株基因型有关,仍需进一步验证。此外,研究中还发现一半的假定外排泵基因没有高表达,如*Rv2459*和*Rv1410c*等,但Gupta等<sup>[1]</sup>报道在异烟肼诱导下*Rv2459*差异倍数

为 5.15, Rodrigues 等<sup>[22]</sup>报道 *Rv1410c* 在 2 株菌中表达量增加倍数分别为 12.4 和 12.5, 这可能是由于在临床和实验室不同环境压力的影响下, 部分外排泵基因对于抗生素的诱导表现高表达似乎是一个普遍的应激反应, 而不是某个特定外排泵的具体反应。因此, 在异烟肼的诱导下外排泵基因的激活可能取决于菌株的基因型, 而非被诱导的药物; 或者可能是由于菌株本身的特性, 使其对同种药物的反应不一致, 导致其外排泵基因的激活程度不同。

本研究还发现异烟肼耐药菌株中存在多个与异烟肼外排有关的基因, 引起假定药物外排泵基因激活并高表达的原因可能有: 一是假定外排泵基因的诱导物如异烟肼导致其激活而高表达; 二是本研究选取的大多数为突变菌株, 且以 *katG* 突变为主, 从高表达假定外排泵基因的菌株基因突变情况分析, 基因突变可能与药物外排泵的激活有一定相关性, 而 *katG315* 位突变与药泵基因的激活关系更密切。相关文献报道表明, 发生耐药基因突变的菌株在异烟肼药物诱导下生长时可很快激活外排泵, 并导致基因高表达<sup>[10]</sup>; 李桂莲等<sup>[24]</sup>研究证明某些药物外排泵基因与耐药相关基因突变导致的耐药共存; Rodrigues 等<sup>[22]</sup>认为很多耐药菌株是由于药物外排泵基因而非基因突变; 但也有报道认为外排泵机制作为促进协同其他耐药机制(如细胞壁的抗渗性和耐药菌株的突变)作用而导致耐药<sup>[25]</sup>。基因突变与外排泵之间的关系究竟如何, 还需进一步验证。

### 参 考 文 献

- [1] Gupta AK, Reddy VP, Lavania M, et al. *jeftA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. *Indian J Med Res*, 2010, 132 (2): 176-188.
- [2] Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, et al. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb Drug Resist*, 2010, 16(1): 21-28.
- [3] WHO. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. Geneva: World Health Organization, 2008.
- [4] Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(2): 406-409.
- [5] Li GL, Zhang JR, Zhao XQ, et al. Correlation between levels of isoniazid and rifampicin resistance and targeted gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chin J Antituberc Assoc*, 2012, 34(6): 360-365. (in Chinese)  
李桂莲, 张敬蕊, 赵秀芹, 等. 结核分枝杆菌对异烟肼和利福平的耐药水平与其耐药基因突变的相关性研究. *中国防痨杂志*, 2012, 34(6): 360-365.
- [6] Dong HY, Lv B, Zhang YY, et al. Introduction to the standard operation program of spoligotyping on *Mycobacterium tuberculosis* in China. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(4): 384-387. (in Chinese)  
董海燕, 吕冰, 张媛媛, 等. 中国结核分枝杆菌菌间隔区寡核苷酸分型方法标准化操作程序的探讨. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(4): 384-387.
- [7] Li GL, Zhang JR, Zhao XQ, et al. Rapid detection on resistance of rifampicin and isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by microplate Alamar Blue assay. *Chin J Zoonose*, 2012, 28(4): 18-22. (in Chinese)  
李桂莲, 张敬蕊, 赵秀芹, 等. 微孔板 Alamar Blue 显色法检测结核分枝杆菌临床分离株利福平和异烟肼耐药性的研究. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(4): 18-22.
- [8] Pang Y, Li GL, Wang YF, et al. Study on the molecular mechanism of mono-rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chin J Antituberc Assoc*, 2012, 34(5): 275-279. (in Chinese)  
逢宇, 李桂莲, 王玉峰, 等. 单耐利福平结核分枝杆菌耐药分子机制研究. *中国防痨杂志*, 2012, 34(5): 275-279.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] Machado D, Couto I, Perdigo J, et al. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 2012, 7(4): 1-12.
- [11] DeMarco CE, Cushing LA, Frempong-Manso E, et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(9): 3235-3239.
- [12] De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(1): 36-52.
- [13] Sharma S, Kumar M, Nargotra A, et al. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8): 1694-1701.
- [14] Jiang X, Zhang W, Zhang Y, et al. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist*, 2008, 14(1): 7-11.
- [15] De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, et al. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily (MFS) in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med*, 2002, 8(11): 714-724.
- [16] Balganes M, Dinesh N, Sharma S, et al. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(5): 2643-2651.
- [17] Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, et al. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *PNAS*, 1999, 96(22): 12833-12838.
- [18] Fu LM. Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affimatrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis*, 2006, 86(2): 134-143.
- [19] Fu LM, Shinnick TM. Understanding the action of INH on a highly INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain using gene chips. *Tuberculosis*, 2007, 87(1): 63-70.
- [20] Braibant M, Gilot P, Content J, et al. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(4): 449-467.
- [21] De Rossi E, Branzoni M, Cantoni R, et al. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *J Bacteriol*, 1998, 180(22): 6068-6071.
- [22] Rodrigues L, Machado D, Couto I, et al. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(4): 695-700.
- [23] Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(7): 2415-2423.
- [24] Li GL, Wang XX, Xie T, et al. Association of drug efflux pump gene expression with *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance. *Chin J Lab Med*, 2011, 34(7): 605-611. (in Chinese)  
李桂莲, 王擷秀, 谢彤, 等. 药物外排泵基因表达与结核分枝杆菌耐药关系的探讨. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(7): 605-611.
- [25] Pedro EAS, Andrea VG, Anandi M, et al. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011, 63(1): 1-9.

(收稿日期: 2012-12-05)

(本文编辑: 张林东)