

# 结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药分子特征的初步研究

李超 李桂莲 罗巧 李霜君 王瑞白 楼永良 吕建新 万康林

325035 温州医科大学检验医学院生命科学学院(李超、罗巧、李霜君、楼永良、吕建新、万康林); 102206 北京, 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(李桂莲、王瑞白、万康林)

通信作者: 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.02.021

**【摘要】** 目的 探讨结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药性与 *alrA*、*ddlA* 和 *cycA* 基因突变的关系, 分析环丝氨酸耐药与基因型的关联性。方法 从菌株库中选取 145 株临床分离株, 采用比例法测定菌株对环丝氨酸耐药表型、微孔板刃天青显色法测定最小抑菌浓度, PCR 扩增、DNA 直接测序法测定目的基因全长, 与标准菌株 H37Rv 比对。间隔区寡核苷酸基因分型 (spoligotyping) 进行菌株基因型鉴定, 分析耐药表型与基因型的关系, 采用  $\chi^2$  检验分析差异有无统计学意义。结果 145 株临床分离株中, 环丝氨酸耐药菌株为 24 株, 敏感株为 121 株。24 株耐药菌株中, 3 株 (12.5%) 发生 *cycA* 非同义突变, 涉及的密码子为 188 位、318 位和 508 位, 1 株 (4.2%) 发生 *alrA* 非同义突变, 涉及密码子为 261 位。敏感菌株的目的基因中仅检出同义突变。药敏试验证实, 突变株的最小抑菌浓度均有不同程度的升高。北京基因型为 88 株, 环丝氨酸耐药率为 20.5% (18/88), 非北京基因型为 57 株, 环丝氨酸耐药率为 10.5% (6/57), 两者耐药率差异无统计学意义 ( $\chi^2=2.47, P>0.05$ )。结论 *alrA* 和 *cycA* 单核苷酸非同义基因突变可能是环丝氨酸耐药的机制之一。尚不能确定北京基因型或非北京基因型菌株与环丝氨酸耐药有相关性。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 环丝氨酸; 抗药性; 基因突变

基金项目: 国家科技重大专项 (2013XZ10003002-001)

**A preliminary study on the molecular characteristics of D-cycloserine resistance of *Mycobacterium tuberculosis*** Li Chao, Li Guilian, Luo Qiao, Li Shuangjun, Wang Ruibai, Lou Yongliang, Lyu Jianxin, Wan Kanglin

School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China (Li C, Luo Q, Li SJ, Lou YL, Lyu JX, Wan KL); Tuberculosis Branch, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Li GL, Wang RB, Wan KL)

Corresponding author: Wan Kanglin, Email: wankanglin@icdc.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the relationship between D-cycloserine resistance and the gene mutations of *alrA*, *ddlA* and *cycA* of *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, as well as the association between D-cycloserine resistance and spoligotyping genotyping. **Methods** A total of 145 *M. tuberculosis* strains were selected from the strain bank. D-cycloserine resistant phenotypes of the strains were determined by the proportion method and the minimal inhibitory concentration was determined by resazurin microtiter assay. PCR amplification and DNA direct sequencing methods were used for the analysis of gene mutations. Relationship between the resistance phenotype and genotype was analyzed by *chi*-square test. **Results** Of the 145 clinically collected strains, 24 (16.6%) of them were D-cycloserine resistant and 121 (83.4%) were sensitive. There were only synonymous mutations noticed on *alrA*, *ddlA* and *cycA* in sensitive strains. Of the 24 D-cycloserine resistant strains, 3 (12.5%) isolates' *cycA* and 1 (4.2%) isolates' *alrA* happened to be non-synonymous mutations, in which the codes were 188, 318 and 508 of *cycA*, and 261 of *alrA*, respectively. Results on drug sensitivity tests confirmed the minimal inhibitory concentration of the mutant strains were all increased to some degrees. The D-cycloserine resistant rates of 88 Beijing genotype and 57 non-Beijing genotype strains were 20.5% and 10.5%, respectively, but with no statistically significant difference ( $\chi^2=2.47, P>0.05$ ).

**Conclusions** The non-synonymous mutations of *alrA* and *cycA* might contribute to one of the mechanisms of *M. tuberculosis* D-cycloserine resistance. *M. tuberculosis* Beijing genotype or non-Beijing genotype was not considered to be associated with the D-cycloserine resistance.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Cycloserine; Drug resistance; Genes mutation

**Fund program:** National Science and Technology Major Project of China (2013XZ10003002-001)

由于耐药结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的产生及其引起的耐多药结核病 (multiple drug resistant tuberculosis, MDR-TB) 和广泛耐药结核病 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) 的流行, 一线抗结核药物已不能满足临床的治疗需求, 结核病的预防控制变得更为困难。目前对结核分枝杆菌二线抗结核药物的耐药性研究甚少, 阐述重要二线抗结核药物的耐药分子机制显得较为迫切。环丝氨酸在 50 年前就开始应用于临床, 但因过敏和神经毒性而受到限制。近年, 伊朗、印度等国家采用含有环丝氨酸治疗 MDR-TB 取得了较好疗效<sup>[1-2]</sup>, 但环丝氨酸耐药机制尚不清楚。在结核分枝杆菌中, 丙氨酸消旋酶 (*alr*) 将 L-丙氨酸转化为 D-丙氨酸, 丙氨酸合成酶 (*ddl*) 主要催化 2 分子 D-丙氨酸合成 d-丙氨酰-D-丙氨酸二肽; 环丝氨酸为 D-丙氨酸的结构类似物, 通过抑制结核分枝杆菌的 *alr* 和 *ddl* 两种酶, 进而抑制细菌细胞壁粘肽的形成, 导致结核分枝杆菌细胞壁缺损, 减少其耐酸能力而起到杀菌及抑菌的效果<sup>[3-4]</sup>。已有报道, 结核分枝杆菌 *alrA* 基因的非同义突变与环丝氨酸获得性耐药相关<sup>[5-6]</sup>。*cycA* 属于氨基酸转运家族, 负责 D-丙氨酸、D-丝氨酸的运输, 涉及环丝氨酸的正常吸收<sup>[7]</sup>。*cycA* 基因单一点突变已经在大肠埃希菌环丝氨酸耐药变异株中得到确认<sup>[8]</sup>。*cycA* 编码的运载通透蛋白, 其正常表达影响环丝氨酸的转运吸收。Baisa 等<sup>[9]</sup>发现, 在微量葡萄糖和甘油培养基中大肠埃希菌 *cycA* 基因突变株 K-12 和 CFT073 的环丝氨酸耐药性增加, 表现为最小抑菌浓度 (MIC) 值升高。早期也有报道大肠埃希菌的环丝氨酸耐药性增加也是 *cycA* 点突变导致<sup>[10-11]</sup>。Halouska 等<sup>[12]</sup>的研究认为, 环丝氨酸是通过抑制包括 *ddlA* 基因在内的多种与结核分枝杆菌细胞壁合成相关的蛋白酶从而抑制结核分枝杆菌。此外, 在牛型卡介苗 *cycA* 中发现的一个非同义突变 Gly122Ser 能够部分解释环丝氨酸的固有耐药现象<sup>[7]</sup>。本研究通过对 145 株临床结核分枝杆菌菌株的 *alrA*、*ddlA* 和 *cycA* 基因全长测序, 初步探讨环丝氨酸耐药分子机制和潜在靶点, 并对环丝氨酸耐药与我国结核分枝杆菌北京基因型之间的相关性进行分析。

## 材料与方法

1. 菌株来源: 145 株结核分枝杆菌临床分离株从中国 CDC 传染病预防控制所 (传染病所) 菌株库中选取, 来源于福建、广西、河南、湖南、四川、新疆和西藏等省份的省级结核病防治所或结核病医院, 由传染病所结核室进行菌种鉴定, 并进行药敏试验。标准菌株 H37Rv 由传染病所提供。

2. 比例法: 按照《结核病诊断实验室检验规程》进行, 每批实验均以标准株 H37Rv 做平行对照。环丝氨酸培养基药物折点浓度为 WHO 推荐的 30 μg/ml<sup>[13]</sup>。

3. 微孔板显色法: 具体步骤参照 Hall 等<sup>[14]</sup>报道。采用倍比稀释法配置环丝氨酸药物浓度为 128 ~ 0.063 μg/ml。设置不含药液的微孔板为空白对照, 培养第 4 天加入 70 μl 的显色剂 (刃天青: 5% 吐温 80 为 2: 5) 观察, 当蓝色变粉红色说明细菌已生长, 此时将显色剂加入实验孔中, MIC 为蓝色完全没有发生变化的实验孔的药物浓度。

4. PCR 扩增测序: 采用 Primier 5.0 设计引物, 目的基因分上下两段进行扩增, 各段基因引物序列见表 1。反应采用 25 μl 的体系, 包括 12.5 μl 的 2 × PCR Taq MasterMix (北京康为世纪生物科技有限公司), 9 μl 的双蒸水, 上下游引物各 1 μl, DNA 模板 1.5 μl。反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 退火 1 min (退火温度见表 1), 72 °C 1 min, 35 次循环;

**表 1** 结核分枝杆菌 *alrA*、*ddlA* 和 *cycA* 基因 PCR 扩增相关信息

引物名称	引物序列(5' ~ 3')	退火温度 (°C)	扩增片段 (bp)
<i>alrA</i> 1-F	AACCAACCACCGAGCCACAG	62.6	812
<i>alrA</i> 1-R	TTGCTGATGAGTTCGATAGA		
<i>alrA</i> 2-F	ATTCCATCAACGATGTTCCAGG	61.7	637
<i>alrA</i> 2-R	TCGTCTGCGGATACCCCTCAC		
<i>cycA</i> 1-F	TTCCTACCCAGAAGCTCG	60.5	876
<i>cycA</i> 1-R	ACAAACGGGGACTCGCCACT		
<i>cycA</i> 2-F	GGCGAGTCCCCGTTTGTGA	61.7	827
<i>cycA</i> 2-R	TCGTGGTGATATTGCGGAT		
<i>ddlA</i> 1-F	CGCACCAAGCCCGAATGAGC	61.7	665
<i>ddlA</i> 1-R	CGGTAAGCCCGCCGTTTCGC		
<i>ddlA</i> 2-F	CCGTCGGCATGGACAAGGAG	59.2	661
<i>ddlA</i> 2-R	GCCAATGTCGTCTCGATCAT		

注: *alrA*、*ddlA* 和 *cycA* 目的基因均分前后两段扩增; A1: 对应前半段; A2: 对应基因后半段; F: 正向引物; R: 反向引物

72 °C 10 min。PCR 产物送北京天一辉远生物科技有限公司测序。

5. 间隔区寡核苷酸分型 (spoligotyping): 采用 Kamerbeek 等<sup>[15]</sup> 建立的标准化程序进行。引物 DRa: 5' -GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3', DRb: 5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'。反应条件: 96 °C 3 min; 96 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

6. 数据分析: 基因测序结果采用 SeqMan 7.1.0 进行序列拼接、BioEdit 7.1.10 进行多序列比对。记录 spoligotyping 的 43 个间隔区杂交结果, 间隔区存在用“1”表示, 缺失用“0”表示, 建立 Excel 数据表, 并将其导入 BioNumerics 5.0 软件进行分析。聚类方式用平均连锁聚类法 (UPGMA), 相似系数选用 Dice, 与数据库 SpolDB 4.0 进行比对, 确定各个菌株基因型。spoligotyping 基因型对环丝氨酸耐药率差异采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 药敏结果: 比例法药敏试验结果显示, 145 株所选临床分离株中 24 株对环丝氨酸耐药。微孔板刃天青法显示 24 株耐药菌株中, 5 株 MIC 为 16  $\mu\text{g/ml}$ , 12 株 MIC 为 32  $\mu\text{g/ml}$ , 6 株 MIC 为 64  $\mu\text{g/ml}$ , 1 株 MIC 为 128  $\mu\text{g/ml}$ 。

2. DNA 测序分析: 以标准株 H37Rv 序列为对照, 用 BioEdit 7.1.10 进行多序列比对, 通过测序峰图确认突变位点, 结果显示, *alrA*、*ddlA* 和 *cycA* 基因突变类型均为点突变。环丝氨酸耐药菌株中 *alrA* 突变率为 4.2% (1/24), 突变株 261 位 AGC→AAC (Ser→Asn), 1 株敏感株 *alrA* 基因 337 位 GGT→GGC, 为 Gly 同义突变。耐药菌株中未发现 *ddlA* 突变, 仅 1 株敏感株 92 位 CGT→CGC, 为 Arg 同义突变。环丝氨酸耐药菌株中 *cycA* 突变率为 12.5% (3/24), 分别为 188 位 CCT→GCT (Pro→Ala)、318 位 CGA→CTA (Arg→Leu) 和 508 位 GCA→TCA (Ala→Ser), 无突变热点区域。环丝氨酸敏感株中 *cycA* 存在 2 种同义突变, 分别为 521 位 CGT→CGC (Arg) 和 406 位 TCG→TCA (Ser), 其中 406 位突变有 2 株菌株。见表 2。

3. spoligotyping 基因分析: 对 145 株临床分离株 spoligotyping 的杂交结果指纹图谱进行分析, 与数据库 SpolDB 4.0 进行比对。结果显示, 北京基因型共 88 株, 占 60.7% (88/145), 包括 86 株经典北京基因型 (图谱显示为 35 ~ 43 之间的 9 个间隔区均为

表 2 145 株结核分枝杆菌临床分离株中 *alrA*、*ddlA* 和 *cycA* 基因突变情况

基因	密码子改变	氨基酸变异	数量	药敏表型	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	spoligotyping 基因型
<i>alrA</i>	261 位 AGC→AAC	Ser→Asn	1	R	32	北京
<i>alrA</i>	337 位 GGT→GGC	NM	1	S	8	H3
<i>cycA</i>	521 位 CGT→CGC	NM	1	S	2	北京
<i>cycA</i>	188 位 CCT→GCT	Pro→Ala	1	R	32	北京
<i>cycA</i>	318 位 CGA→CTA	Arg→Leu	1	R	32	北京
<i>cycA</i>	406 位 TCG→TCA	NM	2	S	4~8	NEW, T1
<i>cycA</i>	508 位 GCA→TCA	Ala→Ser	1	R	32	北京
<i>ddlA</i>	92 位 CGT→CGC	NM	1	S	16	北京

注: R: 环丝氨酸耐药菌株; S: 环丝氨酸敏感菌株; NM: 氨基酸同义突变; MIC 为最小抑菌浓度

阳性); 2 株为非典型北京基因型 (图谱显示为 35 ~ 43 之间的 9 个间隔区至少 3 个为阳性且至少 1 个为阴性)。非北京基因型共 57 株, 占 39.3% (57/145)。非北京基因型中, 大部分为 T 家族, 占 35.1% (20/57), 3 株为 CAS1 家族, 占 5.3% (3/57), 6 株为 H3 家族, 占 10.5% (6/57), 6 株为 MANU2 家族, 占 10.5% (6/57), 1 株为 S 家族, 占 1.8% (1/57), 4 株为 U 家族, 占 7.0% (4/57)。17 株为新发现菌株基因型, 占 29.8% (17/57)。

4. 不同基因型的耐药率比较: 88 株北京基因型结核分枝杆菌中, 环丝氨酸耐药 18 株, 耐药率为 20.5% (18/88), 57 株非北京基因型中环丝氨酸耐药 6 株, 耐药率为 10.5% (6/57), 耐药率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.47, P > 0.05$ )。见表 3。

表 3 145 株结核分枝杆菌不同基因型耐药率

组别	环丝氨酸敏感	环丝氨酸耐药	耐药	
			例数	率 (%)
北京基因型	70	18	88	20.5
非北京基因型	51	6	57	10.5
合计	121	24	145	16.6

注: 北京基因型与非北京基因型对环丝氨酸的耐药率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.47, P > 0.05$ )

### 讨 论

本研究对所选菌株的 *alrA*、*ddlA* 和 *cycA* 基因测序发现, 有 1 株 (4.17%) 耐药株 *alrA* 基因发生非同义突变, 3 株 (12.5%) 耐药株 *cycA* 基因发生非同义突变, 而敏感株中未见目的基因的非同义突变。经药敏试验证实, 4 株非同义突变株 MIC 值均有不同程度的升高。本研究结果提示, *alrA* 和 *cycA* 基因发生的单核苷酸非同义突变导致了菌株环丝氨酸耐药性增加。Desjardins 等<sup>[16]</sup> 的研究显示, *alrA* 和 *ald* 突变的结核分枝杆菌临床菌株在体外培养时, 有对环丝氨酸耐药性增加的现象。Fehér 等<sup>[8]</sup> 对大肠埃希菌

环丝氨酸耐药株的研究显示,20株 *cycA* 突变涉及位点均不相同。本研究结果也反映出 *cycA* 突变位点比较分散,未发现基因突变的热点区域,这将不利于单核苷酸突变的分子检测技术建立。从突变情况来看,尚有较大比例的环丝氨酸耐药现象不能被很好地解释,推测环丝氨酸还存在其他耐药靶酶或其他耐药机制,尚待进一步研究。环丝氨酸中枢神经系统的不良反应能够被大多数患者所耐受,环丝氨酸被一些研究者视为治疗 MDR-TB 的基础成分,取得的临床效果不能被忽视。研究环丝氨酸的耐药分子特征有助于实现对耐多药结核病患者更好的治疗,未来还可以环丝氨酸为药物原型,开发新型抗结核药物,协助攻克治疗结核病的难题。

北京基因型菌株与耐药的关系复杂多变,国内外不同国家和地区存在差异,不同药物之间也不一致。在纽约、古巴、爱沙尼亚和越南,北京基因型与耐药高度相关,但是在其他地区暂未发现明显关联性<sup>[17]</sup>。先前的研究发现,在越南和俄罗斯,北京基因型菌株与喹诺酮高水平耐药相关<sup>[18-19]</sup>。本研究未发现北京基因型菌株与环丝氨酸耐药存在较大关联。  
利益冲突 无

#### 参 考 文 献

- [1] Prasad R, Verma SK, Sahai S, et al. Efficacy and safety of kanamycin, ethionamide, PAS and cycloserine in multidrug-resistant pulmonary tuberculosis patients [J]. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 2006, 48(3): 183-186.
- [2] Masjedi MR, Tabarsi P, Chitsaz E, et al. Outcome of treatment of MDR-TB patients with standardised regimens, Iran, 2002-2006 [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 2(7): 750-755.
- [3] Bruning JB, Murillo AC, Chacon O, et al. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* D-alanine: D-alanine ligase, a target of the antituberculosis drug D-cycloserine [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(1): 291-301. DOI: 10.1128/AAC.00558-10.
- [4] Prosser GA, de Carvalho LP. Reinterpreting the mechanism of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* D-alanine: D-alanine ligase by D-cycloserine [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(40): 7145-7149. DOI: 10.1021/bi400839f.
- [5] Köser CU, Bryant JM, Becq J, et al. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis* [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(3): 290-292. DOI: 10.1056/NEJMc1215305.
- [6] Merker M, Kohl TA, Roetzer A, et al. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82551. DOI: 10.1371/journal.pone.0082551.
- [7] Chen JM, Uplekar S, Gordon SV, et al. A point mutation in *cycA* partially contributes to the D-cycloserine resistance trait of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43467. DOI: 10.1371/journal.pone.0043467.
- [8] Fehér T, Cseh B, Umenhoffer K, et al. Characterization of *cycA* mutants of *Escherichia coli*: an assay for measuring *in vivo* mutation rates [J]. *Mutat Res*, 2006, 595(1): 184-190. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.11.004.
- [9] Baisa G, Stabo NJ, Welch RA. Characterization of *Escherichia coli* D-cycloserine transport and resistant mutants [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(7): 1389-1399. DOI: 10.1128/JB.01598-12.
- [10] Wargel RJ, Hadur CA, Neuhaus FC. Mechanism of D-cycloserine action: transport mutants for D-alanine, D-cycloserine, and glycine [J]. *J Bacteriol*, 1971, 105(3): 1028-1035.
- [11] Russell RR. Mapping of a D-cycloserine resistance locus in *Escherichia coli* K-12 [J]. *J Bacteriol*, 1972, 111(2): 622-624.
- [12] Halouska S, Chacon O, Fenton RJ, et al. Use of NMR metabolomics to analyze the targets of D-cycloserine in mycobacteria: role of D-alanine racemase [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(12): 4608-4614. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.11.004.
- [13] World Health Organization. Updated interim critical concentrations for first-line and second-line DST (as of May 2012) [EB/OL]. [2016-08-19]. [http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentration%20table\\_1st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Updated%20critical%20concentration%20table_1st%20and%202nd%20line%20drugs.pdf).
- [14] Hall L, Jude KP, Clark SL, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtiter plate format [J]. *J Vis Exp*, 2011(52). pii: 3094. DOI: 10.3791/3094.
- [15] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(4): 907-914.
- [16] Desjardins CA, Cohen KA, Munsamy V, et al. Genomic and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains implicate *ald* in D-cycloserine resistance [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(5): 544-551. DOI: 10.1038/ng.3548.
- [17] Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(8): 843-849. DOI: 10.3201/eid0805.020002.
- [18] Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(8): 2937-2939. DOI: 10.1128/AAC.00036-08.
- [19] Duong DA, Nguyen TH, Nguyen TN, et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11): 4835-4839. DOI: 10.1128/AAC.00541-09.

(收稿日期:2016-08-20)

(本文编辑:万玉立)