

• 结核病耐药专题研究 •

结核分枝杆菌耐丙硫异烟胺相关基因研究进展

谭旒, 张泓

【摘要】 据世界卫生组织(WHO)统计,2017年全球范围内新发利福平耐药结核病患者数量约为55.8万,其中约82%为耐多药结核病(MDR-TB),而约8.5%的MDR-TB患者为广泛耐药结核病(XDR-TB),MDR-TB、XDR-TB的出现使全球结核病防控工作面临着巨大挑战。丙硫异烟胺(Pto)为二线抗结核药物之一,近年来其耐药机制研究尤其是耐药基因研究取得一定进展。本文综述了结核分枝杆菌耐Pto相关基因,旨在为结核分枝杆菌对Pto的耐药机制研究提供参考。

【关键词】 结核分枝杆菌; 结核, 抗多种药物性; 广泛耐药结核; 丙硫异烟胺; 基因; 突变; 综述

【中图分类号】 R 378.911 R 394.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.11.003

谭旒, 张泓. 结核分枝杆菌耐丙硫异烟胺相关基因研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26(11): 11-15. [www.syxnf.net]

TAN N, ZHANG H. Progress on drug resistance related genes of Mycobacterium tuberculosis to prothionamide [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2018, 26(11): 11-15.

Progress on Drug Resistance Related Genes of Mycobacterium Tuberculosis to Prothionamide TAN Ni, ZHANG Hong
The Second Department of Respiratory Medicine, the Affiliated hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China
Corresponding author: ZHANG Hong, E-mail: hzhang23@yahoo.com

【Abstract】 According to the statistics of WHO, the amount of newly diagnosed patients with rifampicin-resistant tuberculosis (RR-TB) was about 558, 000 all of the world in 2017, of which about 82% were MDR-TB, and the proportion of extensively drug-resistant tuberculosis was about 8.5% in patients with MDR-TB. Occurrence of MDR-TB and XDR-TB brings enormous challenge to the global tuberculosis prevention and control efforts. Prothionamide is one of second-line anti-tuberculosis drug, and some progress on its resistance mechanism especially on drug resistance related genes has been made in recent years. This paper reviewed the drug resistance related genes of Mycobacterium tuberculosis to prothionamide, in order to provide a reference for the research on resistance mechanism to prothionamide.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; Tuberculosis, multidrug-resistant; Extensively drug-resistant tuberculosis; Prothionamide; Gene; Mutation; Review

结核病是结核分枝杆菌感染引起的一种“古老”传染病,而目前结核病仍是全球范围内最常见的传染病^[1]。尽管过去20年间人们为遏制结核病流行做出了巨大努力,但耐药结核病尤其是耐多药结核病(MDR-TB)、广泛耐药结核病(XDR-TB)的出现为全球范围内结核病防控带来了巨大挑战。2018年世界卫生组织(WHO)全球结核病调查报告显示,2017年全球范围内新发结核病患者数量约为1 010万,其中我国新发结核病患者数量约占8.9%;2017年全球估算新发利福平耐药结核病(RR-TB)患者数量约为55.8万例,其中82%为MDR-TB,而印度(24%)、中国(13%)和俄罗斯(10%)3个国家新发MDR-TB/RR-TB患者数量约占全球新发MDR-TB/RR-TB患者总数的47%;耐药结核病治疗成功率较低,全球平均耐药结核病治疗成功率约为55%^[2]。

《2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告》^[3]显示,我国结核病患者对异烟肼(INH)耐药率最高,为28.6%,对丙硫异烟胺(Pto)耐药率为12.9%;肺结核患者耐药率前5位药物依次为INH、链霉素(SM)、对氨基水杨酸(PAS)、Pto、氧氟沙星(Ofx),其中初治肺结核患者耐药率前5位药物依次为INH、SM、PAS、Pto、Ofx,复治肺结核患者耐药率前5位药物依次为INH、利福平(RFP)、SM、PAS、Pto;由于初治肺结核患者耐药率前5位药物中包括3种二线抗结核药物,因此我国肺结核患者耐药形势较严峻,需引起重视。

Pto是二线抗结核药物之一,口服进入人体后会被迅速吸收并广泛分布于全身组织、体液,且各组织、脑脊液、血液药物浓度较为接近。近年来,随着结核分枝杆菌对Pto耐药率升高,Pto耐药机制研究尤其是耐药基因研究备受关注。本文通过检索国内外参考文献,综述了结核分枝杆菌耐Pto相关基因,旨在为结核分枝杆菌对Pto的耐药机制研究提供参考。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760003)
563003 贵州省遵义市, 遵义医学院附属医院呼吸二科
通信作者: 张泓, E-mail: hzhang23@yahoo.com

1 作用机制

MDR-TB 指同时对 INH 和 RFP 耐药的结核病, Pto、乙硫异烟胺 (Eto) 结构与 INH 类似, 均属 INH 硫代酰胺类似物, 可导致结核分枝杆菌失去耐酸性及合成霉菌酸的能力, 因此治疗 MDR-TB 时 Pto 与 Eto 可以互换^[4]; 此外, 由于 Pto 与 Eto 具有良好的脑脊液渗透作用, 因此二者常用于治疗药物敏感性结核性脑膜炎、粟粒状结核病等^[4-5]。

Pto 是一种前体药物, 在结核分枝杆菌内被单加氧酶 ethA 活化后与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 结合形成 Pto-NAD 并抑制参与霉菌酸合成途径的烯酰基载体蛋白 (ACP) 还原酶、中断蛋白质合成途径, 继而阻断霉菌酸生物合成并扰乱结核分枝杆菌细胞膜, 最终达到抗结核分枝杆菌的目的^[4]。

研究表明, ethA-ethR 基因座编码单加氧酶, 其中 ethR 属转录调节因子 TetR/CamR 家族阻遏物, 是一种转录调节因子, ethR 的结合域通过与 ethA 启动子区域结合而负调节 ethA 的表达, 因此 ethA-ethR 基因座涉及 Pto 的活化并调控 Pto 的抗酸能力^[6-7]。mshA 基因编码的糖基转移酶参与霉菌生物合成及 N-乙酰半胱氨酸葡萄糖胺肌醇 (MSH) 合成, 而 MSH 可通过 ethA 促进 Pto 活化并抑制结核分枝杆菌^[4, 8]。Ndh 基因通过编码还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶而调节还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) / 氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 比例, 在 NAD⁺ 与 Pto 形成 Pto-NAD 过程中具有重要作用^[9-11]。因此, 调节单加氧酶的 ethR 基因、mshA 基因、ndh 基因对结核分枝杆菌耐 Pto 至关重要。此外, 还有研究发现结核分枝杆菌中存在 Pto 生物活化的其他不依赖 ethR 基因的替代途径如含黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 的单加氧酶 mymA 以剂量依赖方式保留结核分枝杆菌对 Pto 的敏感性^[12]。

2 耐药机制

目前, 结核分枝杆菌的耐药机制研究主要包括靶基因突变、细胞壁通透性变化、外排泵机制、药物降解及失活酶等, 其中靶基因突变是结核分枝杆菌对 Pto 耐药的主要分子作用机制。由于过去几十年多数研究集中于探讨 Eto 而非 Pto 的耐药机制, 因此目前报道 Pto 耐药相关的具有硫代酰胺抗性的基因仅有几个^[4], 而由于 Eto 与 Pto 显示出高度交叉耐药性, 因此既往关于 Eto 的耐药机制研究成为分析 Pto 耐药机制研究的主要依据。目前, 多数学者认为, 结核分枝杆菌对 Pto 耐药主要与 inhA 基因、ethA 基因、ethR 基因、mshA 基因、ndh 基因、mymA 基因突变有关^[9, 12-13], 其中 ethA 基因突变是结核分枝杆菌对 Pto 耐药的主要基因突变类型^[14]。

3 耐药基因

3.1 inhA 基因 既往研究发现, Pto 对 INH 高度耐药的结核分枝杆菌有效, 但对 INH 轻度耐药的结核分枝杆菌的效果则较差。INH 是治疗结核病的有效药物之一, 而 Pto 是治疗 MDR-TB 的二线抗结核药物, INH 与 Pto 均属前体药物, 需不同的酶进行活化, 由于存在共同作用机制而导致二者交叉耐药。MACHADO 等^[15] 研究表明, inhA 基因调控区域的突变组合效应导致 MDR-TB 患者结核分枝杆菌对 INH、Pto 均产生耐药性; 近期研究表明, INH 耐药通常是由 katG 基因、

inhA 基因、inhA 基因启动子区域突变导致的^[16]。katG 基因突变常与 INH 高度耐药有关, katG 基因编码的过氧化氢酶可将 INH 转化为其活性形式, 但由于 katG 基因不参与 Pto 的活化, 因此 Pto 的作用不受 katG 基因突变影响, 而由于 Pto 与 INH 具有相同的最终靶点, 因此 inhA 基因突变可导致 inhA 基因编码产物过表达或修饰而造成 INH 与 Pto 交叉耐药^[15, 17]。inhA 基因突变所致 INH 耐药通常为低水平耐药并可通过加大 INH 剂量而减轻 INH 耐药, 因此临床常经验性使用大剂量 INH 联合 Pto 治疗 MDR-TB, 而对大剂量 INH 耐药且无 inhA 基因突变患者可选择 Pto 代替 INH^[18-20]。除 inhA 基因突变外, Pto 还与 inhA 基因启动子区域、inhA 基因开放阅读框突变^[21] (见表 1) 有关, 其可通过降低 Pto 与 NAD 的亲合力而导致结核分枝杆菌对 Pto 耐药^[15]。

3.2 ethA 基因与 ethR 基因 ethA 基因也称 etaA 基因 (Rv3854c), 其编码的单加氧酶 ethA 是一种含 FAD 的 NADPH 特异性酶, 能够进行 Baeyer-Villiger 氧化反应^[4, 22-24]。Pto 经单加氧酶 ethA 激活后作用方式与 INH 非常相似, 其活性形式与 NAD⁺ 反应产生 Pto-NAD, 进而抑制 inhA 基因及霉菌酸生物合成^[22-23, 25-26]。TAN 等^[14] 研究发现, 对 Pto 耐药的结核分枝杆菌 ethA 基因突变频率为 51.4% (19/37), 其中 ethA 基因第 798 位 AGC-AGG 突变 (丝氨酸 266 精氨酸) 突变频率为 18.9% (7/37), 被认为是与结核分枝杆菌对 Pto 耐药有关的最普遍的基因突变类型 (见表 1)。ethR 基因是 ethA 基因表达的负转录调节因子, ethR 基因突变导致 ethA 基因过度表达时可导致结核分枝杆菌对 Pto 耐药^[6]。此外, ethA 基因启动子区域或其负转录调节因子 ethR 基因结合域内出现突变时可通过以下方式导致 ethA 基因表达下调: (1) 独立于 ethR 基因调节而直接降低 ethA 基因转录; (2) 增加 ethR 基因转录而导致 ethA 基因表达受抑; (3) 影响 ethA 基因与 ethA 基因启动子区域的结合^[27]。

另有研究表明, ethA 基因还可能通过不稳定的氧化亚硫酸中间体活化硫代苯甲酰胺、硫代卡巴肽、硫代乙酰胺、硫代乙酰及其他硫代酰胺药物, 这可能是 INH 与 Pto 交叉耐药的重要原因^[28-29]。

3.3 mshA 基因 (Rv0486) 研究表明, 对 INH 和 Pto 耐药的结核分枝杆菌突变体均存在 mshA 基因突变, mshA 基因编码产物糖基转移酶参与 MSH 的生物合成^[8]。VILCHÈZE 等^[30] 研究发现, 含有单个碱基对修饰的 mshA 基因突变体并导致氨基酸改变的 8 株结核分枝杆菌 MSH 含量从 99.9% 下降至 83.0%, 而对 Pto 的耐药率升高 4-8 倍; 此外, 笔者还发现 mshA 基因的 7 个独立的错义及移码突变, 其中 4 个 mshA 基因突变体具有单个氨基酸突变, 即精氨酸 273 半胱氨酸、甘氨酸 299 半胱氨酸、甘氨酸 356 天冬氨酸、谷氨酸 361 丙氨酸^[8] (见表 1)。因此, mshA 基因缺失、错义及移码将导致结核分枝杆菌产生 MSH 减少及 MSH 通过 ethA 基因促进 Pto 的活化减少, 继而造成结核分枝杆菌对 Pto 耐药。

ANG 等^[12] 研究发现, 单独的 mshA 基因缺失所致 Pto 对结核分枝杆菌的半数最低抑菌浓度 (MIC50) 较 ethA/ethR 基因突变高, 提示对于 Pto 杀灭作用的影响, mshA 基因突变至少与 ethA/ethR 基因突变一样。此外, mshA 基因突变可导致

表 1 已知的 Pto 耐药基因突变位点 (类型)、核苷酸序列改变及氨基酸改变

Table 1 Known drug resistance related gene mutation site (types) to prothionamide, changes of nucleotide sequences and amino acids							
基因突变位点 (类型)	核苷酸序列改变	氨基酸改变	参考文献	基因突变位点(类型)	核苷酸序列改变	氨基酸改变	参考文献
inhA 基因				32G (删除) NA NA RUEDA 等 ^[9]			
C319T	CCG → TCG	Pro107Ser	PROJAHNM 等 ^[13]	965C (删除)	NA	NA	RUEDA 等 ^[9]
T233C	GTC → GCG	Val78Ala	PROJAHNM 等 ^[13]	A1135T	AAC → TAC	Asn379Tyr	RUEDA 等 ^[9]
inhA 基因开放阅读框架				T1121G CTT → CGT Leu374Arg RUEDA 等 ^[9]			
T280G	TCG → GCG	Ser94Ala	MORLOCK 等 ^[21]	T469C	TTC → CTC	Phe157Leu	RUEDA 等 ^[9]
A61G	ATC → GTC	Ile21Val	MORLOCK 等 ^[21]	369C (删除)	NA	NA	RUEDA 等 ^[9]
T62C	ATC → ACC	Ile21Thr	MORLOCK 等 ^[21]	A1342G	AAG → GAG	Lys448Glu	RUEDA 等 ^[9]
ethA 基因				C798G AGC → AGG Ser266Arg TAN 等 ^[14]			
703T (删除)	NA	移码	MORLOCK 等 ^[21]	T205C	TGG → CGG	Trp69Arg	TAN 等 ^[14]
110A (删除)	NA	移码	MORLOCK 等 ^[21]	G680C	CGC → CCC	Arg227Pro	TAN 等 ^[14]
768G (删除)	NA	移码	MORLOCK 等 ^[21]	A940C	ACC → CCC	Thr314Pro	TAN 等 ^[14]
A1174G	ACG → GCG	Thr392Ala	MORLOCK 等 ^[21]	C1175G	ACG → AGG	Thr392Arg	TAN 等 ^[14]
G1154A	GGC → GAC	Gly385Asp	MORLOCK 等 ^[21]	A1120T	AAC → TAC	Leu374Arg	TAN 等 ^[14]
A167C	GAC → GCC	Asp55Ala	MORLOCK 等 ^[21]	A722G	AAG → AGG	Lys241Arg	TAN 等 ^[14]
T1013G	ATC → AGC	Ile338Ser	MORLOCK 等 ^[21]	mshA 基因			
G127A	GGC → AGC	Gly43Ser	MORLOCK 等 ^[21]	T1379G	ATA → AGA	Asn111Ser, Ile460Arg	RUEDA 等 ^[9]
338A (插入)	NA	移码	MORLOCK 等 ^[21]	C1055T	TCC → TTC	Ser352Phe	RUEDA 等 ^[9]
1290C (删除)	NA	移码	MORLOCK 等 ^[21]	C560T	GCA → GTA	Ala187Val	PROJAHNM 等 ^[13]
C668A	GAG → AAG	Glu223Lys	MORLOCK 等 ^[21]	G317C	GGG → GCG	Gly106Ala	PROJAHNM 等 ^[13]
G1238A	GGT → GAT	Gly413Asp	MORLOCK 等 ^[21]	A653C	GAC → GCC	Asp218Ala	PROJAHNM 等 ^[13]
C1387A	CGT → AGT	Arg463Ser	MORLOCK 等 ^[21]	G316A	GGG → AGG	Gly106Arg	PROJAHNM 等 ^[13]
T902G	CTG → CGG	Leu301Arg	RUEDA 等 ^[9] 、TAN 等 ^[14]	A332G	AAC → AGC	Asn111Ser	PROJAHNM 等 ^[13] 、TAN 等 ^[14]
G106C	GAA → CAA	Glu36Gln	RUEDA 等 ^[9] 、TAN 等 ^[14]	C382T	NA	AA128 终止密码子	VILCHÈZE 等 ^[8]
A130G	ACC → GCC	Thr44Ala	RUEDA 等 ^[9]	C817T	CGC → TGC	Arg273Cys	VILCHÈZE 等 ^[8]
C429A	TAC → TAA	Tyr143 终止密码子	RUEDA 等 ^[9]	C991T	NA	AA331 终止密码子	VILCHÈZE 等 ^[8]
T409C	TGC → CGC	Cys137Arg	RUEDA 等 ^[9]	G1067A	GGC → GAC	Gly356Asp	VILCHÈZE 等 ^[8]
T1209G	TGT → TGG	Cys403Trp	RUEDA 等 ^[9]	A1082C	GAG → GCG	Glu361Ala	VILCHÈZE 等 ^[8]
T905C	TTC → TCC	Phe302Ser	RUEDA 等 ^[9]	A1242del	NA	移码	VILCHÈZE 等 ^[8]
G410T	TGC → TTC	Cys137Phe	RUEDA 等 ^[9]	A332G	AAC → AGC	Asn111Ser	VILCHÈZE 等 ^[8]
A842G	CAC → CGC	His281Arg	RUEDA 等 ^[9]	G895T	GGC → TGC	Gly299Cys	VILCHÈZE 等 ^[8]
32G (删除)	NA	NA	RUEDA 等 ^[9]	ndh 基因			
1265C (删除)	NA	NA	RUEDA 等 ^[9]	C948A	AAC → AAA	Asn316Lys	RUEDA 等 ^[9]
755GC (插入)	NA	NA	RUEDA 等 ^[9]	C677A	GCA → GAA	Ala226Glu	RUEDA 等 ^[9]
672G (插入)	NA	NA	RUEDA 等 ^[9]	C533G	GCT → GGT	Ala178Gly	TAN 等 ^[14]
G1227C	ATC → ATC	Met409Ile	RUEDA 等 ^[9]	G485T	AGC → ATC	Ser162Thr	TAN 等 ^[14]
C1019A	ACC → AAC	Thr340Asn	RUEDA 等 ^[9]	T865G	CTT → CGT	Leu289Arg	TAN 等 ^[14]
1141GGG (插入)	NA	NA	RUEDA 等 ^[9]	G1162A	AGC → AAC	Ser388Asn	TAN 等 ^[14]

注: Pro= 脯氨酸, Ser= 丝氨酸, Val= 缬氨酸, Ala= 丙氨酸, Ile= 异亮氨酸, Thr= 苏氨酸, Gly= 甘氨酸, Asp= 天冬氨酸, Glu= 谷氨酸, Lys= 赖氨酸, Arg= 精氨酸, Leu= 亮氨酸, Gln= 谷氨酰胺, Tyr= 酪氨酸, Cys= 半胱氨酸, Trp= 色氨酸, Phe= 苯丙氨酸, His= 组氨酸, Met= 甲硫氨酸, Asn= 天冬氨酸; NA 表示未提及或不详

敲除 ethA/ethR 基因的结核分枝杆菌对 Pto 完全耐药,提示 Pto 杀灭作用中的 MSH 作用可以是独立的,或者至少不限于其与 ethA 基因的相互作用,可能参与 Pto 生物激活的替代途径,但仍需进一步研究证实^[12]。

3.4 ndh 基因 (Rv1854c) ndh 基因编码产物为 II 型还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶,而 II 型还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶可通过将 NADH 氧化成 NAD⁺ 而调节 NADH/NAD 比值。研究表明,ndh 基因突变可导致细胞内 NADH 含量增加并竞争性地抑制 INH-NAD 或 Pto-NAD 及 INH 或 Pto 的结合,继而导致 INH 与 Pto 交叉耐药^[10-11]。TAN 等^[14]在 46 株对 Pto 耐药的结核分枝杆菌中发现 37 株 (80.4%) 存在基因突变,基因突变类别包括 19 种,其中 27 株为单核苷酸突变,10 株为双核苷酸突变,而 27 株单核苷酸突变菌株中 4 株为 ndh 基因非同义突变,分别为 S162T、L289R、G339A、S388N (见表 1),证实 ndh 基因突变可导致结核分枝杆菌对 Pto 耐药。

3.5 mymA 基因 既往研究表明,结核分枝杆菌存在 6 种 Baeyer-Villiger 单加氧酶,而在这 6 种单加氧酶中 ethA 特征最为明显,而 mymA、ethA 则具有最大的序列同源^[26, 31]。GRANT 等^[24]研究发现,单独的 mymA 基因突变可导致结核分枝杆菌对 Pto 低度耐药,而 mymA 基因与 ethA 基因可通过加成方式活化 Pto,这可能是 Pto 活化及抗性的新分子作用机制。ANG 等^[12]研究发现,ethA/ethR 基因删除仅导致结核分枝杆菌对 Pto 耐药性轻微升高,这可能与结核分枝杆菌存在 mymA 基因而保留其对 Pto 的易感性、剂量依赖性药物反应有关。

4 小结与展望

耐药结核病为全球结核病防控工作带来重大挑战,鉴于新型抗结核药物的研发及应用所需时间较长,因此提高现有药物疗效是一种不应忽视的替代策略。目前,基于 Pto 耐药机制研发的具有抗结核分枝杆菌作用的单加氧酶 inhA、ethR 抑制剂等 Pto 增效剂研究已取得一定成果,并有望为抗结核治疗方案提供新的选择^[32-34]; Pto 耐药机制及相关基因突变研究已取得一定进展,已发现多种耐药遗传机制,包括靶基因机构改变、激活前体药物所需酶功能丧失等,证实基因突变及基因转录改变是结核分枝杆菌对 Pto 耐药的重要机制,但由于缺乏系统的全基因组转录对照,因此部分基因转录异常导致结核分枝杆菌对 Pto 耐药的机制仍需进一步深入研究。此外,目前已知的结核分枝杆菌对 Pto 耐药相关突变基因及突变位点仍十分有限,可能还存在尚未发现的基因突变,相信随着不断的探索及新技术的应用,必将逐步发现可能存在的基因突变及基因转录改变对结核分枝杆菌耐药性的影响,继而指导临床制定科学、有效的抗结核治疗方案。

参考文献

- [1] ZEKA A N, TASBAKAN S, CAVUSOGLU C. Evaluation of the Gene Xpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49 (12): 4138-4141. DOI: 10.1128/JCM.05434-11.
- [2] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018 [R]. Geneva: WHO, 2018.
- [3] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告 [J]. 中国防痨杂志, 2012, 34 (8): 485-508.
- [4] THEE S, GARCIA-PRATS A J, DONALD P R, et al. A review of the use of ethionamide and prothionamide in childhood tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2016, 97: 126-136. DOI: 10.1016/j.tube.2015.09.007.
- [5] DONALD P R. Cerebrospinal fluid concentrations of antituberculosis agents in adults and children [J]. Tuberculosis (Edinb), 2010, 90 (5): 279-292. DOI: 10.1016/j.tube.2010.07.002.
- [6] ENGOHANG-NDONG J, BAILLAT D, AUMERCIER M, et al. EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator [J]. Mol Microbiology, 2004, 51 (1): 175-188.
- [7] ANG M L, ZAINUL RAHIM S Z, SHUI G, et al. AnethA-ethR-Deficient Mycobacterium bovis BCG mutant displays increased adherence to mammalian cells and greater persistence in vivo, which correlate with altered mycolic Acid composition [J]. Infect Immun, 2014, 82 (5): 1850-1859. DOI: 10.1128/IAI.01332-13.
- [8] VILCHÈZE C, AVGAY Y, ATTARIAN R, et al. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis [J]. Mol Microbiol, 2008, 69 (5): 1316-1329. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06365.
- [9] RUEDA J, REALPE T, MEJIA G I, et al. Genotypic Analysis of Genes Associated with Independent Resistance and Cross-Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59 (12): 7805-7810.
- [10] VILCHÈZE C, WEISBROD T R, CHEN B, et al. Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (2): 708-720.
- [11] CARDOSO R F, CARDOSO M A, LEITE C Q, et al. Characterization of ndh gene of isoniazid resistant and susceptible Mycobacterium tuberculosis isolates from Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007, 102 (1): 59-61.
- [12] ANG M L T, ZAINUL RAHIM S Z, DE SESSIONS P F, et al. EthA/R-Independent Killing of Mycobacterium tuberculosis by Ethionamide [J]. Front Microbiol, 2017, 25 (8): 710. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00710.eCollection 2017.
- [13] PROJAHN M, KÖSER C U, HOMOLK A S, et al. Polymorphisms in isoniazid and prothionamide resistance genes of the Mycobacterium tuberculosis complex [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55 (9): 4408-4411. DOI: 10.1128/AAC.00555-11.
- [14] TAN Y, SU B, ZHENG H, et al. Molecular Characterization of Prothionamide-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in

- Southern China [J]. *Front Microbiol*, 2017, 30 (8) : 2358. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02358.
- [15] MACHADO D, PERDIGÃO J, RAMOS J, et al. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68 (8) : 1728–1732. DOI: 10.1093/jac/dkt090.
- [16] JAGIELSKI T, BAKULA Z, ROESKE K, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69 (9) : 2369–2375. DOI: 10.1093/jac/dku161.
- [17] LARSEN M H, VILCHÈZE C, KREMER L, et al. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 46 (2) : 453–466.
- [18] MULLER B, STREICHER E M, HOEK K G, et al. *InhA* promoter mutations: a gateway to extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa? [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15 (3) : 344–351.
- [19] SCHAAF HS, VICTOR TC, ENGELKE E, et al. Minimal inhibitory concentration of isoniazid in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from children [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26 (3) : 203–205.
- [20] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2015) [J]. 中国防痨杂志, 2015, 37 (5) : 421–469. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2015.05.001.
- [21] MORLOCK G P, METCHOCK B, SIKES D, et al. *EthA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47 (12) : 3799–3805.
- [22] FRAAIJE M W, KAMERBEEK N M, HEIDEKAMP A J, et al. The prodrug activator *EtaA* from *Mycobacterium tuberculosis* is a Baeyer-Villiger monooxygenase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (5) : 3354–3360.
- [23] VANNELLI T A, DYKMAN A, ORTIZ DE MONTELLANO P R, et al. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (15) : 12824–12829.
- [24] GRANT S S, WELLINGTON S, KAWATE T, et al. Baeyer-Villiger Monooxygenases *EthA* and *MymA* Are Required for Activation of Replicating and Non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* Inhibitors [J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23 (6) : 666–677. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.05.011.
- [25] BAULARD A R, BETTS J C, ENGOHANG-NDONG J, et al. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (36) : 28326–28331.
- [26] DEBARBER A E, MDLULI K, BOSMAN M, et al. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (17) : 9677–9682.
- [27] DE WELZEN L, ELDHOLM V, MAHARAJ K, et al. Whole-Transcriptome and-Genome Analysis of Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Identifies Downregulation of *ethA* as a Mechanism of Ethionamide Resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61 (12) .pii: e01461-17. DOI: 10.1128/AAC.01461-17.
- [28] ISLAM M M, HAMEED H M A, MUGWERU J, et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy [J]. *J Genet Genomics*, 2017, 44 (1) : 21–37. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.10.002.
- [29] ZHANG Y, XU S Q, LI C Y. Mechanisms of drug action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2004, 29 (12) : 712–731.
- [30] VILCHÈZE C, JACOBS W R Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities [J]. *Microbiol Spectr*, 2014, 2 (4) : MGM2-0014–2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.
- [31] BONSOR D, BUTZ S F, SOLOMONS J, et al. Ligation independent cloning (LIC) as a rapid route to families of recombinant biocatalysts from sequenced prokaryotic genomes [J]. *Org Biomol Chem*, 2006, 4 (7) : 1252–1260.
- [32] NIKIFOROV P, BLASZCZYK M, SURADE S, et al. Fragment-Sized *EthR* Inhibitors Exhibit Exceptionally Strong Ethionamide Boosting Effect in Whole-Cell *Mycobacterium tuberculosis* Assays [J]. *Acs Chem Biol*, 2017, 12 (5) : 1390–1396. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00091.
- [33] MODI P, PATEL S, CHHABRIA M T. Identification of some novel pyrazolo [1, 5-a] pyrimidine derivatives as *InhA* inhibitors through pharmacophore-based virtual screening and molecular docking [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2018, 1–14. DOI: 10.1080/07391102.2018.1465852.
- [34] SURESH A, SRINIVASARAO S, AGNIESZKA N, et al. Design and synthesis of 9H-fluorenone based 1, 2, 3-triazole analogues as *Mycobacterium tuberculosis* *InhA* inhibitors [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2018, 91 (6) : 1078–1086. DOI: 10.1111/cbdd.13127.

(收稿日期: 2018-10-14; 修回日期: 2018-11-18)

(本文编辑: 鹿飞飞)