

• 结核病耐药专题研究 •

结核病分枝杆菌耐环丝氨酸相关基因研究进展

何兴, 陈玲

【摘要】 耐多药结核病(MDR-TB)需采用二线抗结核药物治疗,是目前全球范围内结核病防控工作面临的主要挑战。环丝氨酸抗结核分枝杆菌作用较强,世界卫生组织(WHO)于2011年推荐环丝氨酸作为MDR-TB的二线核心口服抗结核药物之一,但近年来结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药增多且具体耐药机制尚未完全明确。本文综述了结核分枝杆菌耐环丝氨酸相关基因,旨在为结核分枝杆菌对环丝氨酸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; 环丝氨酸; 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.1008-5971.2018.11.006

何兴, 陈玲. 结核分枝杆菌耐环丝氨酸相关基因研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26(11): 25-27, 31. [www.syxnf.net]

HE X, CHEN L. Progress on drug resistance related genes of Mycobacterium tuberculosis to cycloserine [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2018, 26(11): 25-27, 31.

Progress on Drug Resistance Related Genes of Mycobacterium Tuberculosis to Cycloserine HE Xing, CHEN Ling
The Second Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China
Corresponding author: CHEN Ling, E-mail: lingjuncd@163.com

【Abstract】 MDR-TB requires second-line anti-tuberculosis drugs, which is the main challenge for tuberculosis prevention and control all of the world. Due to fairly strong anti-tuberculosis effect, cycloserine was recommended as one of second-line core oral anti-tuberculosis drugs by WHO in 2011, but drug resistance to cycloserine gradually increased in recent years, and the resistance mechanism is not completely understood so far. This paper reviewed the drug resistance related genes of Mycobacterium tuberculosis to cycloserine, to provide a reference for the research on resistance mechanism to cycloserine.

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

耐多药结核病(MDR-TB)指同时对利福平和异烟肼耐药的结核病。据统计,2017年全球范围内MDR-TB患者数量约为160 684例,其中广泛耐药结核病(XDR-TB)患者数量约占8.5%^[1],MDR-TB成为全球范围内结核病防控工作面临的主要挑战。环丝氨酸是1952年研发的一种抗生素,具有较强的抗结核分枝杆菌作用,因而WHO于2011年推荐环丝氨酸作为治疗MDR-TB的二线核心口服抗结核药物之一^[2-4]。与其他抗结核药物相比,环丝氨酸耐药率较低,但近年来结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药增多。有研究者于1993—2007年对荷兰131例MDR-TB患者进行药敏试验发现,仅1例患者对环丝氨酸耐药,耐药率为0.8%^[5];2005年俄罗斯结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药率为7.4%;1995—2011年中国香港结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药率为8.6%^[6]。在结核病治疗新药匮乏情况下,2012年5月国家食品药品监督管理局批准我国“全球基金耐多药结核病项目”开展地区使用环丝氨酸^[7]。目前,结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药的具体机制尚未完全明

确,本文综述了结核分枝杆菌耐环丝氨酸相关基因,旨在为结核分枝杆菌对环丝氨酸的耐药机制研究提供参考。

1 作用机制

环丝氨酸具有广谱抗菌作用,对多数革兰阴性菌及革兰阳性菌均具有一定抑制作用,对结核分枝杆菌具有较强的抑制作用并有利于防止结核分枝杆菌对丙硫异烟胺产生耐药^[8]。自1999年以来,伊朗、土耳其、印度等国家采用含环丝氨酸抗结核化疗方案治疗MDR-TB并取得良好效果。伊朗学者曾报道,采用含环丝氨酸抗结核化疗方案治疗的MDR-TB患者可达到治愈效果^[9];土耳其学者曾报道,采用含环丝氨酸抗结核化疗方案治疗的MDR-TB患者治愈率为77%^[10];日本学者曾报道,采用含环丝氨酸、吡嗪酰胺、乙胺丁醇等抗结核化疗方案治疗MDR-TB孕妇疗效确切^[11];西班牙学者曾报道,采用环丝氨酸、左氧氟沙星治疗的17例MDR-TB患者中12例达到治愈效果,且无复发或死亡患者^[12];印度学者曾报道,采用含环丝氨酸抗结核化疗方案治疗的39例MDR-TB患者中29例治疗6个月后痰菌转阴并维持到治疗结束^[13]。

环丝氨酸抗结核分枝杆菌的血药浓度参考范围为1.5~30.0 mg/L^[14],其对体外H37Rv菌株的最低抑菌浓度(MIC)

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: 陈玲, E-mail: lingjuncd@163.com

为 25.0 mg/L^[15], 环丝氨酸剂量为 250.0~500.0 mg/次时血药峰浓度可维持在 20.0~35.0 mg/L, 不仅可发挥良好的抗结核分枝杆菌作用, 还有利于减少不良反应的发生, 因此血药峰浓度 <15.0 mg/L 时需增加环丝氨酸剂量, 血药峰浓度 >40.0 mg/L 需减少环丝氨酸剂量^[16]。

结核分枝杆菌细胞壁是一种网状复杂结构, 主要由肽聚糖、霉菌酸、阿拉伯半乳糖等物质通过共价键连接而成, D-丙氨酸是结核分枝杆菌细胞壁中肽聚糖的重要成分^[17], 丙氨酸消旋酶 (Alr) 是结核分枝杆菌细胞壁合成过程中必不可少的成分^[5], 且 Alr 以磷酸吡哆醛 (PLP) 为辅酶催化 L-丙氨酸和 D-丙氨酸的转化; 此外, 在丙氨酸合成代谢途径中, 丙氨酸连接酶催化二分子 D-丙氨酸合成 D-丙氨酸二聚体 (ddl), 因此丙氨酸连接酶在丙氨酸合成代谢中发挥着重要作用。环丝氨酸为 D-丙氨酸结构类似物, 主要通过抑制丙氨酸合成代谢途径中 alr 基因编码的 Alr、ddlA 基因编码的丙氨酸连接酶而减少肽聚糖的产生, 继而抑制结核分枝杆菌细胞壁形成并减弱其耐酸能力, 达到抗结核分枝杆菌的目的^[18-19]。

2 耐药机制

目前已知的结核分枝杆菌耐环丝氨酸基因包括 ald 基因 (Rv2780)、alr 基因 (Rv3423C)、cycA 基因 (Rv1704C)、ddlA 基因 (Rv2981C, ddl) 等。

2.1 ald 基因 ald 基因 ID 为 888493, 全长 1 116 bp, 编码 L-丙氨酸脱氢酶并参与丙氨酸代谢。研究发现, ald 基因缺失的结核分枝杆菌无法将 L-丙氨酸转化成丙酮酸并导致 L-丙氨酸含量增加, 而 L-丙氨酸是环丝氨酸竞争性抑制物质前体, L-丙氨酸含量增加可能会导致 Alr、丙氨酸连接酶持续活动而降低环丝氨酸的竞争性抑制作用, 最终造成结核分枝杆菌产生大量肽聚糖并对环丝氨酸产生耐药性^[19-20]。药敏试验结果证实, ald 基因缺失与结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药有关, 而补充 ald 基因后部分结核分枝杆菌会保存对环丝氨酸的敏感性^[19-20]。

2.2 alr 基因 alr 基因 ID 为 887634, 全长 1 227 bp, 编码 Alr 并参与丙氨酸代谢途径中 L-丙氨酸向 D-丙氨酸的转化。研究发现, alr 基因启动子突变的结核分枝杆菌对环丝氨酸的耐药性较高 (MIC>60 μg/ml)^[19]; D-丙氨酸消旋酶 (alrA) 过度表达可导致牛型分枝杆菌卡介苗对环丝氨酸产生耐药^[21], 同时过量产生的突变体 alrA 启动子出现 G-T 置换可导致 B-半乳糖苷酶基因表达^[22]。DESIGARDINS 等^[23]研究发现, 体外培养的 alrA 基因突变的结核分枝杆菌对环丝氨酸的耐药性增加。此外, 还有研究证实结核分枝杆菌 alrA 非同义突变与环丝氨酸耐药表型有关^[24-25], 有学者在 24 株耐环丝氨酸结核分枝杆菌中发现 1 株 alrA 同义突变, 1 株非同义突变, 涉及的突变位点及氨基酸改变为 261 位丝氨酸-天冬酰胺, 而对环丝氨酸敏感的结核分枝杆菌 337 位发生 GGT-GGC, 为甘氨酸同义突变^[26] (见表 1)。

2.3 cycA 基因 cycA 基因 ID 为 888812, 全长 1 671 bp, 编码 D-丝氨酸、D-丙氨酸等运载通透蛋白并参与环丝氨酸的转运吸收^[27]。BAISA 等^[28]研究发现, 在甘油培养基和微量葡萄糖中大肠埃希菌 cycA 基因突变株 CFT073 和 K-12 对环

丝氨酸的耐药性增加。目前研究已证实耐环丝氨酸大肠埃希菌变异株存在 cycA 基因单一位点突变^[29], 早期曾有文献报道 cycA 基因点突变可导致大肠埃希菌对环丝氨酸的耐药性增加^[30-31], 而在牛型分枝杆菌卡介苗中发现 cycA 基因非同义突变 (Gly122Ser) 可以解释部分环丝氨酸固有耐药现象^[27]; FÉHERT 等^[29]对 20 株耐环丝氨酸大肠埃希菌进行研究发现, 其 cycA 基因突变位点均不相同。此外, 还有研究在 24 株耐环丝氨酸结核分枝杆菌中发现 3 株 cycA 基因同义突变, 3 株 cycA 基因非同义突变, 其中非同义突变包括第 188 位 CCT-GCT [(脯氨酸-丙氨酸)、第 318 位 CGA-CTA [精氨酸-亮氨酸] 及第 508 位 GCA-TCA (丙氨酸-丝氨酸), 但并未发现突变热点区域; 在对环丝氨酸敏感的结核分枝杆菌中发现 cycA 基因第 406 位 TCG-TCA (丝氨酸) 及第 521 位 CGT-CGC (精氨酸), 均为同义突变^[26] (见表 1)。

2.4 ddlA 基因 ddlA 基因 ID 为 888415, 全长 1 122 bp, 编码丙氨酸连接酶并催化二分子 D-丙氨酸合成 ddl、参与丙氨酸代谢。20 世纪 70 年代, 有学者对耐环丝氨酸结核分枝杆菌突变体进行分离发现, ddlA 基因对环丝氨酸的抗结核分枝杆菌作用影响极小, 但后续研究发现 ddlA 基因、alr 基因同时过度表达可导致结核分枝杆菌对环丝氨酸的耐药性增加^[32]。有研究在 24 株耐环丝氨酸结核分枝杆菌中发现 1 株 ddlA 基因同义突变, 为第 92 位 CGT-CGC 突变 (精氨酸) (见表 1)^[26]。

表 1 已知的环丝氨酸耐药基因突变类型、氨基酸改变及 MIC
Table 1 Known drug resistance related gene mutation types to cycloserine, changes of amino acids and the MIC

基因突变类型 (氨基酸改变)	突变频率 (n/N)	MIC (μg/ml)	参考文献
alr 基因			
第 261 位 AGC-AAC (Ser-Asn) ^a	1/24	32	李超等 ^[26]
第 337 位 GGT-GGC (Gly) ^b	1/24	8	李超等 ^[26]
CTG-ATG (Leu-Met) ^a	NA	NA	MURRAY ^[22]
cycA 基因			
第 188 位 CCT-GCT (Pro-Ala) ^a	1/24	32	李超等 ^[26]
第 318 位 CGA-CTA (Arg-Leu) ^a	1/24	32	李超等 ^[26]
第 406 位 TCG-TCA (Ser) ^b	2/24	4-8	李超等 ^[26]
第 508 位 GCA-TCA (Ala-Ser) ^a	1/24	32	李超等 ^[26]
第 521 位 CGT-CGC (Arg) ^b	1/24	2	李超等 ^[26]
ddlA 基因			
第 92 位 CGT-CGC (Arg) ^b	1/24	16	李超等 ^[26]

注: n/N= 基因突变菌株 / 检测菌株, MIC= 最低抑菌浓度, Ser= 丝氨酸, Asn= 天冬酰胺, Gly= 甘氨酸, Leu= 亮氨酸, Met= 甲硫氨酸, Pro= 脯氨酸, Ala= 丙氨酸, Arg= 精氨酸; NA 表示未提及或无相关数据; ^a 为非同义突变, ^b 为同义突变

3 小结与展望

综上所述, 环丝氨酸作为二线核心抗结核口服药物, 具有独特的结构及作用机制, 治疗耐药结核病的前景广阔, 但其耐药现象不容忽视, 应深入研究其耐药机制以减少耐药的

发生。近年来随着对结核分枝杆菌耐药机制的研究深入,发现耻垢分枝杆菌中 *Alr* 及丙氨酸连接酶过表达会产生对环丝氨酸的耐药性,且 *Alr* 对环丝氨酸耐药性的影响程度较丙氨酸连接酶高^[33],而 *alr* 基因、*ddlA* 基因突变与结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药有关^[21, 34-35];此外,卡介苗丝氨酸运载体突变也可导致结核分枝杆菌对环丝氨酸产生耐药性^[27, 33]。

目前,基因突变可以解释部分结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药,其中 *ald* 基因、*alr* 基因、*cycA* 基因、*ddlA* 基因突变导致结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药已达成一定共识,但各研究中所涉及的突变位点均不相同,因此还可能存在着其他突变位点、耐药靶酶等,因此,结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药的具体机制等仍需进一步研究证实。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018 [R]. Geneva: WHO, 2018.
- [2] 宋艳华, 郭少晨, 高孟秋, 等. 环丝氨酸治疗耐多药结核病的血药浓度及不良反应监测 [J]. 中国防痨杂志, 2014, 36 (5): 399-401. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2014.05.021.
- [3] FALZOU D, JARAMILLO E, SCHUNEMANN H J, et al. WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update [J]. Eur Respir J, 2011, 38 (3): 516-528. DOI: 10.1183/09031936.00073611.
- [4] KAM K M, YIP C W. Surveillance of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to Second-line drugs in Hong Kong, 1995-2002, after the implementation of DOTS-plus [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2004, 8 (6): 760-766.
- [5] VAN INGEN J, BOEREE M J, WRIGHT A, et al. 荷兰不同来源耐多药结核病例中二线耐药情况 [J]. 刘青译. 国际结核病与肺部疾病杂志 (中文版), 2009, 4 (2): 47-51.
- [6] 肖和平. 环丝氨酸治疗耐多药结核病 [C] // 中华医学会结核病学分会 2012 年学术大会论文集. 上海: 上海肺科医院, 2012: 58-61.
- [7] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南 (2009) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33 (7): 485-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2010.07.004.
- [8] 缪昌东, 姜继军. 环丝氨酸致精神异常一例 [J]. 中国防痨杂志, 2013, 35 (6): 480.
- [9] MASJEDI M R, 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, 12 (7): 750-755.
- [10] TAHAOGLU K, TÖRÜN T, SEVİM T, et al. The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in turkey [J]. N Engl J Med, 2001, 345 (3): 170-174. DOI: 10.1056/NEJM200107193450303.
- [11] TAKASHIMA T, DANNO K, TAMURA Y, et al. Treatment outcome of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis during pregnancy [J]. Kekkaku, 2006, 81 (6): 413-418.
- [12] ESCUDERO E, PENAJ M, ALVAREZ-SALA R, et al. Multidrug-resistant tuberculosis without HIV infection: success with individualized therapy [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10 (4): 409.
- [13] PRASAD R, VERMA S K, 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.
- [14] 鄂宇红. 环丝氨酸的药物有效性评价和在结核病的使用 [J]. 健康导报: 医学版, 2014 (7): 194.
- [15] Handbook of anti-tuberculosis agents. Cycloserine [J]. Tuberculosis (Edinb), 2008, 88 (2): 100-101.
- [16] PELOQUIN C A. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis [J]. Drugs, 2002, 62 (15): 2169-2183.
- [17] 刘晓琴, 石亚伟. 抗菌药物治疗疾病的新靶位—丙氨酸消旋酶 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26 (2): 104-108.
- [18] BRUNING J B, MURILLO A C, 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.
- [19] DESJARDINS C A, COHEN K A, 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.
- [20] WIAME J M, PIÉRARD A. Occurrence of an L (+)-Alanine-Dehydrogenase in Bacillus subtilis [J]. Nature, 1955, 176 (4492): 1073-1075.
- [21] CÁCERES N E, HARRIS N B, WELLEHAN J F, et al. Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in Mycobacterium smegmatis [J]. J Bacteriol, 1997, 179 (16): 5046-5055.
- [22] MURRAY F J A. A PILOT study of cycloserine toxicity; a United States Public Health Service Cooperative Clinical Investigation [J]. Am Rev Tuberc, 1956, 74 (2): 196-209.
- [23] DESIGARDINS C A, COHEN K A, 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.
- [24] KÖSER C U, BRYANT J M, BECG 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.
- [25] MERKER M, KOHL T A, 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.