

结核分枝杆菌耐利福平和异烟肼分子机制的研究进展

邓叶华¹, 向延根², 马小华, 范任华, 石国民, 喻容

1.南华大学, 湖南 衡阳 421001; 2.长沙市中心医院检验科, 湖南 长沙 410004

摘要:结核病仍然是当今世界威胁人类健康的主要传染性疾病之一。在结核病的治疗中, 利福平和异烟肼作为抗结核一线药物应用较为广泛, 由于对其使用不当, 导致耐药菌株日益增多, 给结核病的治疗带来了巨大的挑战。目前对结核分枝杆菌耐药分子机制的研究主要集中在药物的作用靶位和相关的突变基因上。异烟肼耐药的分子机制非常复杂, 主要与 kat G、inh A、kas A、oxy R、ndh 等多种基因突变相关; 而利福平主要由 rpo B 基因突变导致耐药, 本文将对近年来与利福平和异烟肼耐药相关的突变基因作一简要综述。

关键词:结核分枝杆菌; 耐药基因; 利福平; 异烟肼¹

Research progress in molecular mechanisms of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

DENG ye-hua¹, XIANG yan-gen², MA xiao-hua, FAN ren-hua, SHI guo-min, YU rong

1 South China University, Hengyang 421001, China; 2 Department of clinical laboratory, Changsha Center Hospital, Changsha 410004, China

Abstract: Tuberculosis, which is one of the major infectious disease, be regarded as a threaten to human's health. Rifampicin and isoniazid is the most widely used anti tuberculosis drugs, but due to improper used, resistant strains are increasing, which bring huge challenge to the treatment of tuberculosis. The study on the molecular mechanism of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* is mainly concentrated in the drug targets and associated mutations in the gene. The molecular mechanism of isoniazid resistance is very complex, involving Kat G, INH A, KAS A, oxy R, ndh and other genes; However rifampin is mainly because of rpo B gene mutation. This review will present the gene mutation of drug resistance of rifampin and isoniazid in recent years.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Resistant gene; isoniazid; rifampicin

作者简介: 邓叶华, 南华大学长沙市中心医院检验科, 410004, E-mail:332744924@qq.com

通讯作者: 向延根, 长沙市中心医院检验科, 410004, E-mail:xiangyangen@126.com

结核病仍然是当今世界威胁人类健康的主要传染性疾病，仅次于艾滋病^[1]。据估计，全球有 1/3 的人已经感染了结核分枝杆菌，每年有 900 万新的感染者，尽管经过适当的治疗，每年仍然有 200 万人死于结核病。结核分枝杆菌的耐药，尤其是耐多药结核杆菌的产生给结核病的治疗和控制带来了巨大的挑战。耐多药结核病（Multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB）是指结核分枝杆菌至少同时对异烟肼和利福平耐药的结核病。目前已有文献报道结核分枝杆菌对链霉素、乙胺丁醇、喹诺酮类、吡嗪酰胺等药物耐药，但是异烟肼（INH）和利福平（RFP）在 DOTS（直接督导下短程化疗）战略中应用广泛，同时也是最重要的一线治疗 MTB 药物，因此，了解结核分枝杆菌对 INH 和 RFP 的耐药情况对结核病的治疗评价变得尤为重要。2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告显示，中国 INH 总耐药率达 28.6%，RFP 总耐药率为 8.9%，相较于 2000 年第四次的调查结果 INH 17.6%，RFP 16.6% 而言，异烟肼耐药涨势较快，利福平虽然有所缓解，但是耐药形势依然非常严峻^[2]。因此，学者们纷纷采用分子生物学方法研究 MTB 对 INH 和 RFP 的耐药的分子机制，期望找到分枝杆菌耐药基因的位置和突变位点，为寻找新的结核病药物提供新的方向。为此，本文将对近年来与利福平和异烟肼耐药相关的突变基因作一简要综述。

1 利福平（RFP）

利福平分子式为 $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ ，结构复杂，属于利福霉素类的半合成广谱抗菌药，自 1971 年被发明以来，一直是结核化疗方案中的关键药物，它是一种快速杀菌剂，可以缩短结核病的疗程，尤其是在短程化疗中起重要作用。利福平主要作用于结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的 β 亚单位，干扰转录的开始及 RNA 延伸，发挥抑菌和杀菌作用^[3]。编码 β 亚单位的基因被命名为 *rpoB*，它含有 3534bp 的开放阅读区，可编码 1178 个氨基酸，是单拷贝基因，序列高度保守。TB 的耐药机制理论上有两种可能：一是 RFP 直接作用于靶分子 RNA 聚合酶亚单位，导致空间构象发生改变，阻止相关部位与 RFP 结合，从而引起 RFP 耐药，目前研究发现 *rpoB* 突变与 TB 对 RFP 耐药相关。其二是细胞壁对药物摄入渗透性的改变。例如鸟胞内分枝杆菌复合群就是由于细胞壁的渗透屏障的改变导致的耐药，检测证明其 *rpoB* 基因并没有位点突变。另外，结核分枝杆菌对利福平耐药的报导中，迄今未见由转座子或质粒介导的耐药。

据报道^[1,4,19]，约有 95% 或更高比例对利福平耐药菌株的突变发生在 *rpoB* 基因 81bp 的热点区域（编码密码子 507 位—533 位），这个区域被称为 RFP 耐药决定区（rifampicin resistance determining region, RRDR），除最常见的点突变外，还包含多位点的联合突变、碱基缺失和短的插入。531 位的丝氨酸转为亮氨酸、526 位的组氨酸转为酪氨酸和 516 位的天冬氨酸转为缬氨酸是最常见的突变位点，因此检验这些位点的突变，可以快速有效的发现耐利福平的结核分枝杆菌菌株。为什么会以 531、526 等位点突变为主，可能是因为这些

位点的突变虽然改变了其氨基酸，却并未对菌株本身造成损害^[1]。绝大部分地区以 531 位突变最为常见，如美国佐治亚州、尼泊尔、中国岳阳和喀麦隆中部地区，某些地方以 516 位为主，如突尼斯中部，而墨西哥则以 450 位变异为主^[1,4,5,6,19]。由上可见，RFP 耐药存在地域差异，地域分布导致的传播不均和药物本身的选择性都是产生这种差异的原因。目前发现的可突变的密码子还有 507、508、510、511、512、517、518、521、522、527、533 和 535 等。526 位点和 531 位点突变对利福平高度耐药（MIC, $\geq 100\mu\text{g/ml}$ ），而 511、514、522、533 等位点的突变造成的却是低水平的耐药，可以说明不同位点突变所引起的耐利福平的程度不一致^[7]。此外，有学者已经证实 508 位和 509 位氨基酸突变与利福平耐药无关，因此，并非所有位点的突变均会导致 RFP 耐药，*rpoB* 不同位点突变与耐药利福平表型之间的关系还需要进一步研究。Bahrmand A R 等^[8]在 *rpoB* 外检测到了 572 位点由异亮氨酸转变成苯丙氨酸，梁庆福等^[9]在 *rpoB* 外也发现了一个未被报导过的新的突变位点，即 569 位点，RRDR 区域外单个位点的突变是否能引起利福平耐药有待进一步确认。研究还发现少数耐利福平菌株并无 *rpoB* 突变，而在少数敏感株组(2.8%)检测到 *rpoB* 基因突变，提示利福平耐药尚有其他机制，如药物主动外排泵等。

2 异烟肼（INH）

异烟肼（Isoniazid, INH）是酰胺类化学合成药物，结构仅一个吡啶环连接一个酰肼基，是一种前体药物，性质稳定，通过被动扩散的形式进入增长时期 MTB，对 MTB 高度敏感。INH 的活化产生一系列的自由基和活性氧，其中自由基既包含活性化物（NO 和过氧化物超氧化物羟基等），又包含活性有机物（异烟酸酰基、ahpC 和 *oxyR* 等），主要攻击细胞壁中的杆菌酸，也可能攻击 DNA 和脂类等 MTB 的多个靶点，破坏其生理功能，最终导致细菌死亡。MTB 对异烟肼耐药的分子机制非常复杂，涉及过氧化氢酶—过氧化物酶 *katG*、烯酰脂酰载体蛋白还原酶 *inhA*、 β -酮酰基酰基运载蛋白合成酶 *kasA*、烷基氢过氧化物还原酶 *oxyR* 和还原型辅酶脱氢酶 *ndh* 等多基因的多位点突变。

2.1 *katG* 基因

1992 年 Zhang 等^[10]研究证实克隆出来的结核分枝杆菌的 *KatG* 基因，可以使 *KatG* 基因缺失的耐 INH 突变株恢复对 INH 的敏感性，因此认为 *KatG* 基因缺失是 MTB 耐 INH 的一种关键机制。*KatG* 基因是 MTB 染色体上的一个功能区段，C+G 比例为 64.4%，含 2223 个氨基酸，编码过氧化氢-过氧化物酶，在细胞内能将异烟肼氧化成异烟酸，参与酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶 I (NAD) 的合成，从而抑制细胞壁中杆菌酸的生物合成作用，损害结核分枝杆菌抗氧化和抗侵袭的功能屏障，最终杀灭细菌。据报道^[11]，50%-95% INH 耐药发生于 *katG* 的突变位点，进一步的研究发现，造成 INH 耐药的主要原因不仅仅是

KatG基因的完全缺失（其完全缺失仅占耐 INH 菌的 7%-24%），点突变、碱基对的插入和部分缺失对于 INH 耐药同样重要。突变时过氧化氢-过氧化物酶活性下降或丧失。最常见的突变位点是密码子 315，从丝氨酸变为苏氨酸（AGC→ACC），除此之外，还可以置换成 ACA(苏氨酸)、ATC(异亮氨酸)、AGA(精氨酸)、AGG(精氨酸)、CGC(精氨酸)、AAC(天冬氨酸)和 GGC(甘氨酸)^[13,15]。密码子 315 的突变频率存在地域差异，这种突变在南非已经存在于 97%的耐 INH 的菌株中^[12]；65%在中国^[13]；大约 38%在意大利^[14]；然而在日本，耐 INH 的突变发生在密码子 315 的比例较小，约占 28%^[15]；比例更低的是芬兰，仅 7%^[12]。这种地域差异可能是标本来源的地域差异，也可能是标本量不足够大所导致的误差。目前发现的突变位点还有104、108、138、148、270、275、328、381、420、463 等。其中大多数位点的突变均可导致 INH 耐药，如 104、108、138、148 和 270 等；同时一直有新的导致耐药的突变位点被发现，如郑文争等^[16]发现的 328 位由色氨酸置换成了苯丙氨酸（CGG→TGG），Ando 等^[17]证实的 420 位蛋氨酸变为苏氨酸（ATG→ACG）。然而，并非所有位点的突变均会导致 INH 耐药。通过定点诱变技术，将 463 位的精氨酸（CGG）置换成亮氨酸（CTG），发现酶活性和 KatG 表达均正常，该突变既出现在突变株中，也存在于敏感株中，提示其为多态性位点，并不参与 INH 耐药^[18]。同样 L587M、A350T 和 S140N 突变并不影响KatG的表达水平和酶活性，可能与 INH 耐药无关。

2.2 inhA 基因

InhA 基因可编码 MTB 分枝菌酸合成途径中的烯酰基还原酶，是 INH 的作用靶点。INH 可阻断其生化合成，从而破坏其细胞壁，使细菌丧失耐酸性和疏水性而亡，因此，inhA 基因与耐药性密切相关。突变（包括点突变，碱基缺失）多出现在调节序列启动子区，极少数出现在编码区，研究发现，InhA 编码基因的突变常见于低耐药菌（MIC=0.2μg/ml）^[19]。inhA 基因突变约占异烟肼耐药株的 10%-35%^[20]。当 inhA 启动子区与 katG 基因联合突变时，细菌的耐药性明显增强，提示对耐药性有协同作用，大约有 80%耐异烟肼的 MTB 的基因突变发生在 inhA 和 katG 这两个基因。Shubladze N 等^[1]研究发现 inhA 的突变 22.6%（143/634）发生在 C(-15)T，1.3%（8/634）发生在 T(-8)C，katG 和 InhA 一起突变的比例是 19.9%（126/634）。除此之外，目前发现的突变位点还有 72、90、94、98、105、280 等。有意思的是，inhA 的变异不仅能引起异烟肼耐药，还能导致跟异烟肼结构相似的乙硫异烟肼耐药^[21]，这可能与位点突变后产生的蛋白对异烟肼及其相似结构的药物有相同的空间位阻效应有关。

2.3 kas A基因

*kasA*基因全长 1251bp，能编码 471 个氨基酸，产生 β -酮酰基酰基运载蛋白合成酶，属于 II 型脂肪酸合酶系统，与 *inh A* 一起参与分枝菌酸的生物合成。*Kas A* 基因突变在耐异烟肼的菌株中约占 10%，已经发现的突变位点有：66、121、269、312、387 等，其中最常见的突变位点是 G312S，但实验亦发现，有一定比例的敏感菌株中也存在 312 位点的变异，由此可以推断其为多态性位点。在耐异烟肼的 MTB 中除了发现 *kas A* 基因突变外，同时还发现了 *kat G* 和 *inh A* 突变，而对异烟肼敏感的菌株中同样有 *kas A* 突变，所以其耐药机制并不明确，有待更进一步的研究^[22]。

2.4 *oxy R* 调节子与 *ahpC* 基因

细菌的 *oxy R* 调节子具有复杂的氧化-应激调节路径，能被环境中的刺激物激活，其表达的 *oxy R* 调节蛋白既是基因转录的活化剂，同时也是感受氧压的感受器。*oxy R* 基因本质是个假基因，并无生物活性，与 MTB 对异烟肼的敏感性无关，但它可控制解毒酶基因 *katG* 和 *ahpC* 的表达，从而对细菌的耐药性产生影响。有学者将 *ahpC* 基因突变作为 *katG* 基因损伤的标志，是因为大多数由 *katG* 基因变异引起的耐异烟肼菌株中可见 *ahpC* 启动子区域突变。*ahp C* 基因突变可导致 *ahp C* 蛋白表达代偿性的增多，来填补由于 *katG* 表达减少，所导致的过氧化氢-过氧化物酶的缺乏，为 MTB 提供额外的抗氧化保护。但二者之间不是简单的因果关系，如 *katG315* 位突变的菌株就少见 *ahpC* 启动子突变，可能是因其残余足够的 *katG* 蛋白活性，无需 *ahpC* 启动子突变启动代偿机制^[23]。研究发现，突变常发生在启动子区域（位于 *ahpC*-*oxy R* 间隔区），目前已证实的可导致 *ahp C* 表达增强的启动子突变位点有 -6、-9、-11、-12、-42 位（相对于转录起始密码子）等。

2.5 *ndh* 基因

Ndh 基因是近年来由 Lee AS 等发现的一个新的与异烟肼耐药相关的突变基因^[24]。其编码还原型辅酶脱氢酶，突变可引起酶活性缺失，NADH 含量增加，NAD⁺含量减少，二者比值升高，抑制异烟肼的过氧化，从而导致细菌耐药。其对乙硫异烟肼同样耐药，具体分子机制仍未见报道，需要进一步探索研究。

3 小结和展望

利福平和异烟肼是应用最广泛同时也是最高效的药物。*rpo B* 是利福平的主要突变基因，异烟肼涉及到 *kat G*、*inh A*、*kas A*、*oxy R*、*ndh*等多种基因，有些基因的作用尚存争议，耐药机制的研究存在盲区：如现有的研究揭示了大部分的耐 MTB 分子机制，但仍有 5%-35%的耐药菌株不存在耐药基因突变，提示可能存在其他耐药机制，需要更进一步的研究。研究基因突变导致耐药的分子机制将为寻找抗结核药物作用的新靶点、耐药 MTB 分子诊

断及个体化用药提供理论依据。目前发现的许多位点突变与药物敏感性改变之间的关系并未完全明确,即无法通过基因型突变来判断表型是否存在突变,因此,未来的研究重心是如何将基因型和耐药表型相匹配,从而给临床工作带来便利。

参考文献:

- [1] Shubladze N, Tadumadze N, Bablishvili N. Molecular patterns of multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Georgia. *Int J Mycobacteriol* [J]. 2013, 2(2): 73-78.
- [2] 王黎霞, 成诗明, 陈明亭, 等. 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, 08: 485-508.
- [3] Yu XL, Wen ZL, Chen GZ, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from south-central in China[J]. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014 , 67(4): 291-7.
- [4] Khadka JB, Rai SK, Shrestha S, et al. Study of rifampicin and isoniazid resistance mutation genes of *M. tuberculosis* isolates in Nepal [J]. *Nepal Med Coll J*. 2011, 13(3): 147-51.
- [5] 周志红, 王华洪. *rpoB* 基因突变与结核分枝杆菌利福平耐药相关性研究[J]. 实用预防医学, 2013, 10: 1189-1191.
- [6] Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico [J]. *J Med Microbiol*. 2004 , 53(Pt 2): 107-13.
- [7] Madania A, Habous M, Zarzour H, et al. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Syria [J]. *Pol J Microbiol*. 2012, 61(1): 23-32.
- [8] Bahrmand AR, Titov LP, Tasbiti AH, et al. High-level rifampin resistance correlates with multiple mutations in the *rpoB* gene of pulmonary tuberculosis isolates from the Afghanistan border of Iran [J]. *J Clin Microbiol*. 2009, 47(9): 2744-50.
- [9] 梁庆福, 陈求扬, 林淑芳, 等. 福建省耐多药结核分枝杆菌利福平耐药 *rpoB* 基因突变特征[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 07: 1649-1651.
- [10] Swanepoel CC, Loots du T. The use of functional genomics in conjunction with metabolomics for *Mycobacterium tuberculosis* research [J]. *Dis Markers*. 2014, 2014: 124218.

- [11] Jagielski T, Grzeszczuk M, Kamiński M, et al. Identification and analysis of mutations in the *katG* gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates [J]. *Pneumonol Alergol Pol.* 2013, 81(4): 298-307.
- [12] Hoshide M, Qian L, Rodrigues C, et al. Geographical differences associated with single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in nine gene targets among resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Microbiol.* 2014, 52(5): 1322-9.
- [13] Zhang M, Yue J, Yang YP, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China [J]. *J Clin Microbiol.* 2005, 43(11): 5477-82.
- [14] Rindi L, Bianchi L, Tortoli E, et al. Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy [J]. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005, 9(1): 94-7.
- [15] Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, et al. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan [J]. *J Clin Microbiol.* 2008, 46(7): 2263-8.
- [16] 郑文争, 张天托, 朱家馨, 等. 结核分枝杆菌 *katG* 基因突变对异烟肼耐药性的影响 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 03: 225-229.
- [17] Ando H, Kondo Y, Suetake T, et al. Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54(5): 1793-9.
- [18] 蔡捷, 刘小香, 李召东, 等. 结核分枝杆菌临床菌株 *katG*、*inhA* 和 *ahpC* 基因突变与异烟肼耐药的相关性研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 06: 1430-1432.
- [19] Tekwu EM, Sidze LK, Assam JP, et al. Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Central Region of Cameroon [J]. *BMC Microbiol.* 2014, 14(1): 113.
- [20] Engström A, Morcillo N, Imperiale B, et al. Detection of first- and second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by pyrosequencing [J]. *J Clin Microbiol.* 2012, 50(6): 2026-33.
- [21] 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): 1728-32.

[22] Piatek AS, Telenti A, Murray MR, et al. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing [J]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 , 44(1): 103-10.

[23] Viader-Salvadó JM , Luna-Aguirre CM, Reyes-Ruiz JM, et al. Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico [J]. *Microb Drug Resist*. 2003, 9(1): 33-8.

[24] 周长凯, 曹婧. 结核分枝杆菌对异烟肼耐药的分子机制[J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 06: 731-732+735.