

部分抗结核分枝杆菌药物的耐药机理研究进展

丁海榕 秦川 占玲俊

【摘要】 结核病是危害严重的重大传染病之一,抗结核药物的应用在治疗结核病的过程中具有重要意义。然而抗结核药物治疗不当会引起耐多药和广泛耐药结核分枝杆菌的出现,导致结核病抬头。结核的耐药多与耐药基因突变有关,笔者总结了常见抗结核药物的耐药分子机制的研究进展,为耐药结核的诊断和治疗提供分子依据。

【关键词】 抗结核药; 抗生素类,抗结核; 抗药性,细菌

Advances in research on *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance mechanism DING Hai-rong, QIN Chuan, ZHAN Ling-jun. Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science; Peking Union Medical College Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China

【Abstract】 Tuberculosis was one of most serious infectious diseases that were harmful to human health. Antibiotics was effective treatment against this bacterium. But the emergency of multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*(Mtb) were occurred frequently when the use of antibiotics was unproper. Drug-resistant phenotype was due to mutations in drug resistant related genes, this paper will state the progress in mechanism study of drug resistant Mtb, which will guide the diagnosis and treatment of drug resistant Mtb.

【Key words】 Antitubercular agents; Antibiotics, antitubercular; Drug resistance, bacterial

结核病是全球严重的公共卫生问题,每年因结核病死亡患者达 130 万例。中国是全球 5 个结核病高负担地区之一。2010 年 15 岁及以上人群活动性肺结核的患病率为 459/10 万,涂阳肺结核患病率为 66/10 万^[1]。结核分枝杆菌是结核病的病原体,已与人类共同进化上万年^[2],为抗酸阳性棒状杆菌。抗结核药物的发现在治疗结核病的过程中具有里程碑的意义,然而结核分枝杆菌像其他病原微生物一样,在人类接受治疗过程中通过自然选择获得耐药,而耐多药和广泛耐药结核分枝杆菌的出现使全球应对结核病的任务更加艰巨。

结核分枝杆菌因无法通过质粒的介导从其他细菌获得耐药性,所以染色体介导的耐药是结核分枝杆菌产生耐药的主要分子基础,除此之外,结核分枝杆菌细胞壁结构与组成的变化、自身的药物外排系统也参与了结核分枝杆菌的耐药形成。结核分枝杆菌耐药与染色体上耐药基因编码区和启动子区突变有关,目前某些抗结核药物的耐药分子机制已明确,新的机制也一直在研究中^[3]。笔者着重总结结核分枝杆菌染色体介导的耐药机理研究进展,以下分别就抗结核药异烟肼,利福平,吡嗪酰胺,乙胺丁醇和氨基糖苷类,氟喹诺酮类和新大环内酯类的耐药机理研究进展进行介绍。

一、一线抗结核药物

异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇和链霉素因其疗效好、不良反应小、患者较易耐受而归为一线抗结核药物。

(一)异烟肼

异烟肼对结核分枝杆菌具有极强的杀灭作用,其价格低廉,是治疗结核病必不可少的药物。结核分枝杆菌耐异烟肼涉及的基因变化:*katG*,*inhA*,*kasA*,*ndh*,*sigI* 及 *oxyR-ahpC* 基因连接区。

1. *katG* 基因:*katG* 基因是结核分枝杆菌染色体中的一个功能区段,编码过氧化氢-过氧化物酶,结核分枝杆菌内的过氧化氢-过氧化物酶活化异烟肼,活化产物作用于 enoyl-ACP 还原酶(属于脂肪酸合成酶Ⅱ系统,能促进短链脂肪酸合成脂肪酸),抑制分枝菌酸和细胞壁生物合成。引起异烟肼耐药的主要原因是 *katG* 基因的点突变、缺失、插入。*katG* 基因常见的点突变是 315 位 AGC→ACC,还可见 463 位 CGG→CTG、88 位 Gln→Arg 和 155 位 Tyr→Ser,此外还发现 *katG* 基因 104、108、138、148 位等突变^[4-5]。有研究表明,异烟肼耐药的临床分离株中有 44%~64%检测到 315 位 AGC→ACC 的氨基酸置换^[6-7],Rouse 等^[8]的研究表明,结核分枝杆菌中 *katG* 基因完全缺失可导致结核分枝杆菌对异烟肼高度耐药。Lee、Marttila 等^[4、9]发现 *katG* 基因 463 位 CGG→CTG 的突变不能作为结核分枝杆菌对异烟肼耐药重要的分子标记,也有研究认为 463 位是 *katG* 基因的重要功能区段,决定着产物酶的活性^[10]。

2. *inhA* 基因:*inhA* 基因编码烯酰基乙酰载体蛋白(enoyl-ACP)还原酶 *inhA*,此酶参与分枝菌酸的生物合成,而分枝菌酸是结核分枝杆菌细胞壁的重要组成部分。活化

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2012ZX10004501)
作者单位:100021 北京协和医学院 中国医学科学院医学实验动物研究所 卫生部人类疾病比较医学重点实验室 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室
通信作者:占玲俊, Email: zhanlj@cnilas.org

的异烟肼与酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)结合,形成高亲和力的共价化合物,是 *inhA* 酶的有效抑制物^[11-13],从而阻止了分枝菌酸的生物合成,进而发挥抗菌作用。*inhA* 基因发生突变或基因的结构发生改变时,可导致结核分枝杆菌对异烟肼耐药。突变包括点突变,碱基或部分 DNA 链缺失。突变多出现在启动子区,少数突变出现在编码区(编码 *inhA*, *acpM*, *kasA*),出现上述突变的临床分离株中表现为对异烟肼低水平耐药^[14]。某些 *inhA* 结构基因发生突变时,表现为对异烟肼高度耐药,最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为 8 mg/ml^[15]。Ano 等^[16]发现 *inhA* 的变异约 48.9% 发生在启动子-15 区的 C→T,约 4.3% 发生在-8 区的 T→A 的点突变。当 *inhA* 启动子区的突变伴随 *katG* 基因突变时,细菌的耐药性明显增强^[17],而大部分的耐异烟肼的结核分枝杆菌的基因突变发生在 *katG* 和 *inhA* 这两个基因。*inhA* 的突变不仅引起异烟肼耐药,还会引起结构相近的二线抗结核药物乙硫异烟肼的耐药^[18]。

3. *kasA* 基因和 *ndh* 基因:*kasA* 基因编码 β-酮酰基载体蛋白合成酶,参与分枝菌酸生物合成,全长 1251 bp,编码 471 个氨基酸,其中最常见的是第 312 位点。*kasA* 基因突变在异烟肼耐药中作用机制并不明确,因为对异烟肼敏感的菌株同样有 *kasA* 的突变,而耐异烟肼的结核分枝杆菌中也发现有 *katG* 或 *inhA* 基因的突变^[19-20]。*ndh* 基因编码 NADH 脱氢酶,它的突变引起酶活性的缺失,从而导致 NADH/NAD⁺ 比例升高,抑制异烟肼的过氧化,同时对异烟肼和乙硫异烟肼都耐药^[21],具体耐药机制还未见报道。

4. *sigI* 基因:*sigI* 是一个调节基因,结核分枝杆菌的基因组共编码 13 个 sigma 因子(绝大部分 sigma 因子参与调节毒力),*sigI* 是其中一个,结核分枝杆菌利用这些 sigma 因子的调控以适应各种环境变化。

Nature Communications 上最新研究表明:*sigI* 在静止期和热休克期转录水平升高,*sigI* 又直接作用 *katG* 启动子区从而调节 *katG* 的转录表达,因此 *sigI* 基因突变会抑制 *katG* 的转录从而引起异烟肼的耐药,而过度表达 *sigI* 会增加结核分枝杆菌对异烟肼的敏感性。一般地,耐药会引起细菌适应性的降低^[22],而 *sigI* 突变株并没有引起适应性的降低,毒力相比野生株增强,缺乏 *sigI* 的结核分枝杆菌毒力也并未减弱反而增强^[23]。可见,异烟肼耐药不仅与常见耐药直接相关基因突变有关,还与调控耐药基因表达的调控基因突变有关。

5. *oxyR-ahpC* 基因连接区:*oxyR* 基因调节分枝杆菌氧化-应激反应,既是氧压感应器又是基因转录的活化剂,本质上是个假基因,与结核分枝杆菌对异烟肼敏感性无关,但 *oxyR* 控制编码解毒酶基因如 *katG* 和 *ahpC* 基因的表达。*ahpC* 基因编码烷基-氢过氧化物还原酶,与细菌对氧化压力的反应有关,某些 *katG* 突变的耐异烟肼分离株 *ahpC* 启动子存在突变, *ahpC* 表达增强来补偿触酶-过氧化物酶的表达缺乏,从而抵抗宿主巨噬细胞的氧化。*ahpC* 基因突变可作为 *katG* 基因突变的标志,但两者不是简单直接的因果

关系^[24-25]。

(二) 利福平

利福平对结核分枝杆菌有很强的杀灭作用,是继异烟肼之后最为有效的抗结核药,也是初治肺结核治疗方案中不可缺少的组成药物。利福平作用于结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶,抑制 mRNA 的转录,发挥抑菌和杀菌作用。结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶有 α/β/γ 3 个亚基,分别由 *rpoA*, *rpoB* 和 *rpoC* 编码。β 亚基编码的氨基酸序列中 507aa-534aa、567aa-574aa、687aa 3 个区域突变与利福平耐药有关^[26]。*rpoB* 基因的突变又以 81bp 的利福平耐药决定区(由 507-533 位的 27 个氨基酸组成)突变为主,突变类型包括点突变、小的缺失和短的插入等,81 bp 上最常见的突变(65%~86%)是引起 526 位氨基酸的碱基 CAC 突变为 TAC 和 531 位氨基酸的碱基 TCG 突变为 TTG,并导致对利福平高水平的耐药(MIC>32 μg/ml),发生在 511,516,518 和 522 位的突变导致对利福平和利福喷丁低水平耐药,但仍然对其他两种利福霉素:利福布丁和利福拉齐(rifalazil)敏感^[27-28]。最新研究发现:某些利福平耐药株除了有 *rpoB* 突变外,还存在 *rpoA*, *rpoC* 的突变;少数耐利福平的菌株无 *rpoB* 基因突变,同时少数敏感株中检测到 *rpoB* 基因突变,说明结核分枝杆菌对利福平耐药还有一些机制未明确^[29]。

(三) 吡嗪酰胺

吡嗪酰胺对细胞内或静止状态下的结核分枝杆菌具有特殊杀灭作用。在酸性环境下吡嗪酰胺酶将吡嗪酰胺转化成具有活性的吡嗪酸而发挥杀菌作用。吡嗪酰胺酶失活导致吡嗪酰胺不能转化为吡嗪酸,从而引起结核分枝杆菌对吡嗪酰胺耐药。吡嗪酰胺耐药多由于编码吡嗪酰胺酶的 *pncA* 基因发生突变所致^[30]。*pncA* 基因全长 561 bp,突变主要发生在结构基因和启动子区。目前在二级结构上也已经明确吡嗪酰胺酶活性位点(D8、A134、C138)和金属结合位点(D49、H51、H71)对酶活性影响最大且基因突变发生率高^[31-32]。突变以碱基置换为主,还可见插入突变(单个碱基变化如 421 插入 C、47 插入 G,多个碱基变化如 390 插入 GG、185 插入 CC、258 插入 GGAC)和缺失突变(如 421 缺失 C)^[33]。

Cuevas-Córdoba 等^[34]首次报道从墨西哥收集的 2007—2010 年临床耐药株中,对吡嗪酰胺耐药的菌株中发现了 D63A、F94S、K96R、V125F、A143P 和 T160K 的突变,碱基的缺失引起氨基酸缺失和读码框的改变以及 141 位、375 位核苷酸的插入突变。

大部分吡嗪酰胺耐药的结核分枝杆菌含有 *pncA* 突变,但一部分耐药株却未发现此突变,Shi 等^[35]研究发现吡嗪酸的一个新的作用靶点:核糖体蛋白 S1(RpsA),此蛋白参与结核分枝杆菌蛋白翻译和反式翻译过程中核糖体的释放,他们发现吡嗪酸与 RpsA 结合,抑制其与 tmRNA 结合,然后抑制反式翻译(反式翻译与压力生存、细菌毒力和营养缺乏的恢复相关,在细菌活动生长条件下是非必须的,但在压力环境下解除翻译过程中受阻滞的核糖体或损伤的 mRNA 和蛋白却很重要),因此 RpsA 过量表达能引起吡嗪酰胺耐药,

但对其他药物如异烟肼、利福平、链霉素、卡那霉素和诺氟沙星没有影响。某些吡嗪酰胺耐药的临床分离株中并无 *pncA* 突变而存在 RpsA 蛋白结构的改变:编码 RpsA 的 *rpsA* 基因 1314 位 GCC 缺失导致 RpsA 的 C 末端丙氨酸的缺失,从而影响了吡嗪酸与 RspA 结合,导致耐药的发生。

(四)乙胺丁醇

乙胺丁醇对结核分枝杆菌有抑制作用,特别是对已耐异烟肼、链霉素的结核分枝杆菌仍有抑制作用。乙胺丁醇是一种阿拉伯糖类似物,作用于结核分枝杆菌阿拉伯糖基转移酶,抑制阿拉伯糖基聚合入阿拉伯半乳糖,影响细胞壁分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-蛋白聚糖复合物形成,发挥抗菌作用。阿拉伯糖基转移酶编码基因 *emb* 的操纵子突变导致耐药,该操纵子由 *embA*、*embB* 和 *embC* 三个基因组成,而 *embB* 基因(约 3246 bp)突变改变了阿拉伯糖基转移酶结构,影响其与药物结合产生耐药,尤其是 306 位密码子的错位突变最为常见(约 48.3% 乙胺丁醇耐药株和 32.5% 乙胺丁醇敏感但对其他一线药耐药的菌株都有此突变,而泛敏感的菌株未检测到此突变,因此 *embB* 基因 306 位密码子的突变不能有效预测 EMB 耐药,特别是耐多药结核分枝杆菌菌株)^[36],其为 Met→Val、Ile、Leu 置换。还有 285 位 Phe→Leu、330 位 Phe→Val 和 630 位 Thr→Ile 置换^[37]。

二、注射用抗结核药物

(一)链霉素

链霉素属于氨基糖苷类抗生素,是初治肺结核强化期(开始 2 个月)化疗方案组成药物之一,对结核分枝杆菌有明显杀菌作用。

研究认为大多数结核分枝杆菌耐链霉素是由于核糖体蛋白 S12 编码基因 *rpsL* 和 16SrRNA 编码基因 *rrs* 突变所致^[38],*rpsL* 基因编码的核糖体蛋白 S12 除了自身与链霉素结合外,还介导链霉素和 16SrRNA 结合,增强其亲和力。*rpsL* 基因突变是结核分枝杆菌耐链霉素的主要分子机制,其常见的突变位点为 43 位及 88 位 AAG→AGG,*rrs* 最常见的突变位点发生在 530 环区(如 419C→T、513A→C、516C→T)和 915 区,512、513 位的碱基突变可导致高水平的耐药。最近有研究者发现编码 7-甲基鸟苷酸(m7G)甲基转移酶的 *gidB* 基因突变与链霉素低水平耐药有关,*gidB* 基因突变导致 16SrRNA 的 530 环中 G527 不能得到修饰而引起链霉素耐药^[39]。

(二)卡那霉素

氨基糖苷类抗生素卡那霉素、阿米卡星是治疗耐多药结核病的核心二线药物。主要是与核糖体结合,抑制蛋白质的合成,从而发挥杀菌作用。

卡那霉素主要与核糖体 30S 亚基 16SrRNA 结合,抑制结核分枝杆菌蛋白质合成。*rrs* 基因的突变能导致对卡那霉素高水平耐药(MIC≥80 μg/ml),而且一些突变能引起结核分枝杆菌对其他一些二线药交叉耐药,如阿米卡星、卷曲霉素^[40],最常见的突变是 1401 位 A→G,少数为 1402 位 C→T/A,1484 位 C→T。最近研究发现大约 80% 耐卡那霉素的临床分离株对卡那霉素有低水平耐药(5 μg/ml<MIC<

80 μg/ml),该耐药株未出现 *rrs* 突变并且无交叉耐药,取而代之的是 Eis 蛋白的过度表达,Eis 是一种氨基糖苷乙酰转移酶,能乙酰化卡那霉素和阿米卡星(乙酰化卡那霉素的效率高于阿米卡星),并有助于提高结核分枝杆菌在细胞内生存。编码 Eis 的 *eis* 基因(Rv2416c)起始密码子上游 14 bp C→T 突变使 *eis* 转录水平明显增高,Eis 蛋白表达增多,氨基糖苷乙酰转移酶活性大大增强,从而导致卡那霉素耐药(这些耐药株中也存在其他突变:37 bp G→T 和 10 bp G→A 突变也能引起 *eis* 转录水平增高,乙酰转移酶活性增强,但都明显低于 14 bp C→T 突变)。

虽然 *eis* 的突变也能提高阿米卡星的 MIC 值,但实验证实突变株仍对阿米卡星敏感。在 42 株临床分离株中,33 株(79%)*eis* 启动子区有突变,4 株对卡那霉素敏感的菌株 *eis* 启动子区也有突变:C→12T(*eis* 转录水平轻度增高,氨基糖苷乙酰转移酶的活性在最低水平),A→13G(*eis* 转录水平与 H37Rv 无异,氨基糖苷乙酰转移酶的活性检测不到或者在最低水平)^[41]。

(三)卷曲霉素

卷曲霉素和紫霉素结构相似,属于环肽类抗生素,由 4 个结构相似的活性化合物——I A, I B, II A 和 II B 组成,其中 I A 和 I B 含量占 80%~90%,是发挥疗效的主要成分,对耐药菌和持留菌有很好的疗效,主要与核糖体 30S 亚基 16SrRNA 结合,抑制蛋白质合成。耐药的产生一般是由于:(1)编码 rRNA 修饰酶(2'-O-甲基转移酶修饰 16SrRNA 上的核苷 C1409 和 23SrRNA 的核苷 C1920)。*tlvA* 基因突变是耐药性产生的重要原因,*tlvA* 基因突变不会引起卡那霉素、阿米卡星耐药,但可引起卷曲霉素和紫霉素交叉耐药。(2)*rrs* 基因突变。有 A1401G、C1402T 和 G1484T 等位点突变,临床菌株中以 A1401C 突变最常见,且这种突变菌株多数对卷曲霉素呈低度至中度耐药,部分菌株对卷曲霉素仍敏感,A1401G 突变是卡那霉素和阿米卡星与卷曲霉素部分交叉耐药的分子基础;C1402T 和 G1484T 位点突变均可导致结核分枝杆菌对卷曲霉素高度耐药,C1402T 突变与卡那霉素、卷曲霉素和紫霉素交叉耐药有关,G1484T 突变导致卡那霉素、阿米卡星、卷曲霉素和紫霉素同时耐药。(3)结核分枝杆菌本身存在的药物作用靶标发生改变^[42]。

三、氟喹诺酮类

氟喹诺酮类(fluoroquinolones, FQs)药物在抗菌作用的同时表现出良好的抗结核分枝杆菌的活性,与一线和二线抗结核药物联合组成抗结核方案,为 MDR-TB 的治疗开拓了广阔的前景。WHO 于 2008 年推出的耐药结核病治疗指南把 MDR-TB 治疗的药品分为 5 组,其中第三组是氟喹诺酮类药品(氧氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星),并将氟喹诺酮类药物作为耐药结核病治疗中最主要的药物,其抗结核作用莫西沙星>左氧氟沙星>氧氟沙星。

氟喹诺酮类药物主要作用于细菌的 DNA 旋转酶,DNA 旋转酶由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码的 2 个 A 亚单位和 2 个 B 亚单位组成,*gyrA* 基因突变与药物浓度和结构相关,*gyrB* 基因突变可能改变了胞内药物的蓄积,而呈低水平耐药。

gyrA 基因编码的 A 亚基是氟喹诺酮类药物的主要作用位点,使 DNA 解旋和复制受阻,编码的 *gyrA* 基因突变导致药物结合位点构象改变,从而产生耐药。突变位点大部分为 94 位 GAC→GCC/CAC/TAC,90 位 GCC→GTG,多发生在 *gyrA* 基因保守区 67-106 位密码子区^[43]。*gyrA* 基因 90 位、91 位、94 位和 88 位突变作为氟喹诺酮类药物耐药分子标记在结核分枝杆菌。氟喹诺酮类药物敏感性快速基因检测方法中已得到应用。除了 *gyrA* 90 位、91 位、94 位密码子的所有单碱基突变形式,*gyrB* GAC500AAC 突变,发现了新的与耐药相关的 *gyrA* GCG90AAG 双碱基突变形式和 *gyrB* GGG551AGG 突变,新发现的突变位点在耐药中的作用还需进一步研究^[44]。

MfpA(fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis*)是在研究氟喹诺酮类的外排泵时从耻垢分枝杆菌基因组中克隆出来的蛋白,介导一种新的氟喹诺酮耐药机制,可导致耻垢分枝杆菌对环丙沙星和司帕沙星低水平耐药。结核分枝杆菌中发现有 MfpA 蛋白的类似物,此蛋白含有 183 个氨基酸残基,由 *Rv3361c* 基因编码,与含有 192 个氨基酸残基的 MfpA 蛋白有 67% 的相似性,MfpA 属于细菌五肽重复家族中的一员,每隔 4 个氨基酸有一个亮氨酸或苯丙氨酸,MfpA 是一种能够模拟 DNA 的蛋白质,与 DNA 旋转酶 A 结合而抑制其活性^[45]。

四、疗效尚不确切的抗结核药物

(一)新大环内酯类

新大环内酯类抗生素包括 14 元环(红霉素、克拉霉素)、15 元环(阿奇霉素)、16 元环(螺旋霉素、交沙霉素、泰沙星、卡波霉素)3 大类。新大环内酯类药物对结核分枝杆菌的抗菌活性较弱,对耐药菌有一定的抗菌活性,其中罗红霉素抗菌作用最强,且与异烟肼或利福平有协同作用,其他如甲红霉素、阿奇霉素主要用于非结核分枝杆菌病的治疗。

现认为新大环内酯类药物可结合到 50S 亚基 23SrRNA 的特殊靶位,阻止肽酰基 tRNA 从 mRNA 的 A 位移向 P 位,使氨酰基 tRNA 不能结合到 A 位,抑制蛋白质的合成。*erm* 基因编码产生的酶能将 23SrRNA 甲基化,阻止药物与核糖体结合。*ermMT(erm37)* 基因属于编码 23SrRNA 甲基转移酶的 *erm* 基因家族,它存在所有结核分枝杆菌复合群(某些 BCG 菌株此基因部分缺失),高度保守,*ermMT* 基因的存在是结核分枝杆菌复合群(某些 BCG 菌株除外)对大环内酯类天然耐药的主要原因^[46]。

(二)利奈唑胺

噁唑烷酮类化合物是新一代全合成的抗菌药物,此类药物可阻止细菌蛋白质的早期合成反应(主要作用靶位是核糖体 50S 亚基的 23SrRNA),与其他蛋白质合成抑制剂类抗菌药物无交叉耐药性,体内外对许多临床耐药菌有强烈的抗菌活性。

利奈唑胺是第一个应用于临床的噁唑烷酮类药物,其与核糖体 50S 亚基结合,抑制 mRNA 与核糖体结合,阻止 50S 与 30S 亚基结合成 70S 核糖体,影响蛋白质合成。它的作用靶位为 23SrRNA、核糖体 L4 和 L22、Erm-37 甲基转移酶以

及 whiB7 调节蛋白等,与其他类别的抗菌药物无交叉耐药,可能由于靶位接近的缘故,利奈唑胺耐药性的产生常伴有四环素类耐药性的消失。细菌对利奈唑胺自然耐药的发生率低,研究者们用只有一个 rRNA 功能基因的耻垢分枝杆菌实验株进行诱导,得到的耐利奈唑胺菌株分 2 类:一类对利奈唑胺的 MIC $\geq$ 64 mg/L,23SrRNA 的 V 区有突变;一类 MIC 为 4~8 mg/L,无 23SrRNA 突变,说明可能存在其他耐药机制。用利奈唑胺敏感的结核分枝杆菌(MIC $\leq$ 1 mg/L)诱导产生的耐药株发现了 G2061T 和 G2576T 突变,MIC 分别为 32 mg/L 和 16 mg/L,但 MIC 在 4~8 mg/L 之间的耐药株 23SrRNA 基因未发现任何突变^[47]。

此外,结核分枝杆菌细胞壁结构和组成的变化,菌体自身的药物外排泵系统也参与了耐药的形成。菌体的外排泵包括耐受小节分裂区家族(RND)的 MmpL,小耐多药性家族(SMR)的 Mmr,易化超家族(MFS)的 LfrA、Rv1634、EfpA、Tet(V)、P55、Tap、Rv1258c 和 ATP 结合区超家族(ABC)的 DrrAB、Pst、Rv2686e-Rv2687e-Rv2688c 等,这些药物外排泵蛋白转运氟喹诺酮类、四环素、氨基糖苷类药物和其他化合物。

结核分枝杆菌耐药机制复杂,对不同的抗生素有不同的耐药机制,而一种抗生素耐药机制又是多样的。新型抗生素的不断开发使用,也会导致出现新的耐药。因此结核耐药机制还存在许多盲区,需要积极开展耐药机制的研究,指导临床早期分子诊断和抗生素的合理使用,对控制耐药结核的病情、感染扩散和传播意义重大。

参 考 文 献

- [1] 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. 中国防痨杂志,2012,34(8):485-508.
- [2] Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLoS Pathog, 2008, 4(9):e1000160.
- [3] Motiwala AS, Dai Y, Jones-López EC, et al. Mutations in extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* that do not code for known drug-resistance mechanisms. J Infect Dis, 2010, 201(6):881-888.
- [4] Marttila HJ, Soini H, Eerola E, et al. A Ser315 Thr substitution in *katG* is predominant in genetically heterogeneous multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(9):2443-2445.
- [5] Coll P, Aragón LM, Alcaide F, et al. Molecular analysis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Barcelona. Microb Drug Resist, 2005, 11(2):107-114.
- [6] Haas WH, Schilke K, Brand J, et al. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(7):1601-1603.
- [7] Musser JM, Kapur V, Williams DL, et al. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J Infect Dis, 1996, 173(1):196-202.
- [8] Rouse DA, Morris SL. Molecular mechanisms of isoniazid re-

- sistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. Infect Immun, 1995, 63(4):1427-1433.
- [9] Lee AS, Tang LL, Lim IH, et al. Lack of clinical significance for the common arginine-to-leucine substitution at codon 463 of the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. J Infect Dis, 1997, 176(4):1125-1126.
- [10] Cockerill FR 3rd, Uhl JR, Temesgen Z, et al. Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*KatG*) gene associated with isoniazid resistance. J Infect Dis, 1995, 171(1):240-245.
- [11] Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 1994, 263(5144):227-230.
- [12] Dessen A, Quémar A, Blanchard JS, et al. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 1995, 267(5204):163-1641.
- [13] Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, et al. Modification of the NADH of the isoniazid target (*inhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 1998, 279(5347):98-102.
- [14] Zhang Y, Young D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother, 1994, 34(3):313-319.
- [15] Morlock GP, Metchock B, Sikes D, et al. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12):3799-3805.
- [16] Ano H, Matsumoto T, Nangi T, et al. Resistance-conferring mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains with low level resistance to isoniazid. Kekkaku, 2006, 81(12):709-713.
- [17] Guo H, Seet Q, Denkin S, et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 11):1527-1531.
- [18] Larsen MH, Vilch  ze 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*. Mol Microbiol, 2002, 46(2):453-466.
- [19] Lee AS, Lim IH, Tang LL, et al. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(8):2087-2089.
- [20] 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. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(1):103-110.
- [21] Lee AS, Teo AS, Wong SY. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7):2157-2159.
- [22] Enne VI, Delsol AA, Roe JM, et al. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(2):203-207.
- [23] Lee JH, Ammerman NC, Nolan S, et al. Isoniazid resistance without a loss of fitness in *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Commun, 2012, 3(753):1-8.
- [24] Viader-Salvad   JM, Luna-Aguirre CM, Reyes-Ruiz JM, et al. Frequency of mutations in *ropB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. Microb Drug Resist, 2003, 9(1):33-38.
- [25] Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, et al. High prevalence of *KatG* Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(5):1417-1424.
- [26] 熊札宽. 结核病实验诊断学. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 54-68.
- [27] Moghazeh SL, Pan X, Arain T, et al. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifamin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(11):2655-2657.
- [28] Ohno H, Koga H, Kohno S, et al. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(4):1053-1056.
- [29] 徐瑛. 耐多药结核病研究进展. 预防医学情报杂志, 2008, 24(4):290-292.
- [30] Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(1):6-21.
- [31] Unissa AN, Selvakumar N, Hassen S. Insight to pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by molecular docking. Bioinformation, 2009, 4(1):24-29.
- [32] Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, et al. Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. PLoS One, 2011, 6(1):1-8.
- [33] 洪创跃, 刘小立, 桂静, 等. 耐多药结核分枝杆菌 *pncA* 基因突变特征及与吡嗪酰胺耐药相关性研究. 中华预防医学杂志, 2012, 46(5):436-439.
- [34] Cuevas-C  rdoba B, Xochihua-Gonz  lez SO, Cuellar A, et al. Characterization of *pncA* gene mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexico. Infect Genet Evol, 2013, pii: S1567-1348(12)00395-4.
- [35] Shi W, Zhang X, Jiang X, et al. Pyrazinamide inhibits translation in *Mycobacterium tuberculosis*. Science, 2011, 333(6049):1630-1632.
- [36] Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, et al. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. J Clin Microbiol, 2002, 40(10):3810-3813.
- [37] Ramaswamy SV, Amin AG, G  ksel S, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium Tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(2):326-336.
- [38] Dobner P, Bretzel G, R  sch-Gerdes S, et al. Geographic variation of the predictive values of genomic mutations associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Probes, 1997, 11(2):123-126.
- [39] Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, et al. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. Mol Microbiol, 2007, 63(4):1096-1106.
- [40] Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8):3192-3197.
- [41] Zaunbrecher MA, Sikes RD Jr, Metchock B, et al. Over expression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(47):20004-20009.
- [42] 刘雪梅, 谢建平. 卷曲霉素作用机制和耐药机制的功能基因组学研究进展. 药学报, 2008, 43(8):788-792.
- [43] Giannoni F, Iona E, Sementilli F, et al. Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of *gyrA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7):2928-2933.
- [44] 李国利, 陈澎, 孙昌文, 等. 结核分枝杆菌对左氧氟沙星与莫西沙星的交叉耐药性及 *gyrA* 和 *gyrB* 基因突变分析. 中国防痨杂志, 2010, 32(10):616-621.
- [45] Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, et al. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. Science, 2005, 308(5727):1480-1483.
- [46] Buri  nkov   K, Doucet-Populaire F, Dorson O, et al. Molecu-

lar basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48 (1):143-150.

[47] Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. *In vitro*-selected linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* mutants. Antimi-

crob Agents Chemother, 2008, 52(2):800-801.

(收稿日期:2013-03-26)

(本文编辑:张晓进)

结核病和呼吸疾病诊治进展及治疗中肝损害专题研讨会简讯

2013 年 6 月 6—10 日,由中国防痨协会《中国防痨杂志》和《结核病与肺部健康杂志》编委会与江西省医学会结核病学分会联合举办的首届“结核病和呼吸疾病诊治进展及治疗中肝损害专题研讨会”在南昌市隆重召开。本次研讨会邀请到了 20 余位国内相关领域的专家进行专题报告,内容紧贴国内外本专业前沿,结合我国临床实践、探讨解决实际问题的方法与途径。

来自全国各地的参会代表达 160 余人。中国防痨协会副理事长兼秘书长万利亚、大会名誉主席肖和平教授,以及大会主席雷建平、孙永昌、唐神结、陈效友、吴雪琼教授,大会秘书长李亮、宗佩兰教授和大会学术委员会委员卢水华、陈晓红、杜娟、侯代伦、宋言峥、林明贵等 40 余位专家教授出席了此次会议。

会议开幕式由大会名誉主席肖和平教授主持。大会主席吴雪琼教授致开幕词,指出“此次会议的召开是两刊发展的一个崭新的起点”,并预祝大会圆满成功。非常遗憾的是,防痨协会理事长王撝秀教授因事务繁忙未能出席此次大会,但王教授亲自撰写了贺词,并由编辑部范永德副编审在大会进行了宣读,贺词中深切的表达出王教授对此次大会的支持,也充分肯定了此次大会的积极意义,并预祝大会圆满成功。

之后,江西省医学会办公室缪健主任致辞,缪主任对于与会的各位专家及代表表示热烈的欢迎,对江西省医学会进行了简要的介绍:江西省医学会在成立 75 年以来,2012 年被评选为全省先进学会,其所主办的期刊被评选为华东地区优秀期刊。她希望大家、尤其是江西省的代表要好好珍惜这次学习和交流的机会。

此次大会主席雷建平教授也做了热情洋溢的大会发言,指出,此次大会的目的是促进学术交流和推广新技术,尤其是对于已日益成为结核病防治界的热点——抗结核药物使用过程中所出现的肝损害问题,要深入、广泛地进行交流和讨论,为制定相关的专家共识做好充分的酝酿与准备。

《中国防痨杂志》期刊社薛爱华主任在大会发言中呼吁各位专家,要像爱护眼睛一样爱护和培育我们的《中国防痨杂志》和《结核病与肺部健康杂志》,团聚优秀的编委和作者参加到两刊的工作中来。同时请各位专家教授关注并积极参加两刊编委会主办的、以组织高水平重点号为目的之一的各类专题学术会议,营造良好的学术氛围,为中国防痨与期刊事业贡献力量。

此次会议的协办单位天津天士力医药营销集团有限公司黄水珠经理和沈阳双鼎制药有限公司王冕经理也在开幕

式上致辞,热烈祝贺会议的胜利召开,表示要紧跟学术与临床前进的步伐,建立标准化现代化的新型制药企业,为我国的防痨事业不断贡献力量。

中国防痨协会副理事长兼秘书长万利亚代表中国防痨协会致辞,表示非常高兴参加此次会议。同时也感慨地提到,中国防痨协会是整个防痨界同仁的家,是为防痨界服务和交流的平台,希望与会专家和学者多多参与“家”事,为了“家庭”的共同繁荣而努力奋斗。

此次会议中,肖和平、陈效友、周新华、林明贵、侯代伦、唐神结、谭守勇、卢水华、宋言峥、吴雪琼、雷建平、丁卫民、陈晓红、李亮、杜鹃、朱敏、张齐龙等教授分别就各自研究领域的成果及进展做了精彩的大会报告。

本次研讨会不仅从基础研究、抗结核药物的研究进展、结核病与呼吸疾病临床诊断及治疗进展等各方面都进行了精彩的专题报告,许多专家还将最新的研究成果和科学数据都拿出来与与会代表共同分享和交流,使得与会代表受益匪浅。同时,与会讲座教授严谨的演讲态度,前沿和实践并举的精彩报告内容、熟练的台风,都深深地吸引了与会代表。

肖和平教授对此次会议进行了总结性发言。肖教授对此次研讨会的成功举办表示非常高兴。指出,这次会议内容丰富多样,亮点纷呈。不仅重温了各种结核病相关的定义,并且都结合实际工作而使之升华,基础研究与实际应用并举。特别提到李亮教授关于结核病防治工作中感染防控的演讲非常精彩,且贴近广大结核病防治工作者,呼吁国家能够对于结核病防治工作人员的防护和防疫工作更加予以重视。肖教授还特别对与会代表认真的、聚精会神的参会态度表示由衷的赞叹;与会代表在事业心和为老百姓服务的心的激励下,认真聆听、踊跃提问,坚持全程参加会议,令人非常感动。最后指出,此次大会的成功举办为与会的同道搭建了一个分享经验、学习新技术新进展的良好平台,希望在各位专家同道和《中国防痨杂志》、《结核病与肺部健康杂志》编委会的共同努力和奋斗下,在以后的工作中常沟通、多交流,为更好的避免抗结核药物治疗中各种不良反应和肝损害的发生,提供及时完善的交流平台,将此次会议的主题和交流常态化,以更好地为我国结核病防治工作者与广大患者服务。

在此,编辑部对全体与会专家及资助公司表示衷心感谢!编辑部还将继续组织类似的以组织重点号、优秀论文为目的之一的专题学术会议,并将有些具有结核病防治实际意义的专题会议力争办成“精品学术会议”、“品牌学术会议”。

(两刊编辑部)