

分类号: R183.3  
学 号: 2011109034

密 级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 结核杆菌 PhoPR 双组分系统与新疆地区耐药 结核杆菌临床分离株耐药性的相关性研究

学 位 申 请 人	李文娟
指 导 教 师	张万江 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	免疫学
研 究 方 向	感染免疫
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2014 年 5 月

分类号: R183.3  
学 号: 2011109034

密 级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 结核杆菌 PhoPR 双组分系统与新疆地区耐药 结核杆菌临床分离株耐药性的相关性研究

学 位 申 请 人	李文娟
指 导 教 师	张万江 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	免疫学
研 究 方 向	感染免疫
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2014 年 5 月

**Correlation study between Mycobacterium tuberculosis PhoPR  
two-component system and drug resistance clinical isolates of  
Mycobacterium tuberculosis in Xinjiang region**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of

**Master of Medicine**

**By**

**LI Wen-juan**

**(Immunology)**

Dissertation Supervisor: Prof. ZHANG Wan-jiang

May, 2014

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明


本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 

时间： 2014 年 06 月 10 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 

时间： 2014 年 06 月 10 日

导师签名： 

时间： 2014 年 06 月 10 日

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
英汉缩略语名词对照 .....	V
前 言.....	1
材料与方法.....	4
结 果.....	17
讨 论.....	25
结 论.....	28
参考文献.....	30
文献综述.....	33
致 谢.....	39
作者简介 .....	40
导师评语 .....	41

## 摘 要

### 目的:

通过比较分析不同耐药性的结核分枝杆菌临床分离株 PhoP 基因和 PhoR 基因表达水平的差异,探讨研究结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统与新疆地区广泛流行的耐药结核杆菌耐药性是否具有相关性。

### 方法:

以新疆地区广泛流行的耐药结核分枝杆菌临床分离株为研究对象,分别提取结核分枝杆菌临床分离药物敏感菌株、单纯耐异烟肼的结核分枝杆菌临床分离株(INH-MTB)、单纯耐利福平的结核分枝杆菌临床分离株(RFP-MTB)、单纯耐链霉素的结核分枝杆菌临床分离株(SM-MTB)、单纯耐乙胺丁醇的结核分枝杆菌临床分离株(EB-MTB)、耐多药的结核分枝杆菌临床分离株的结核分枝杆菌菌株(MDR)的总 RNA,并进行纯度鉴定。运用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 的方法,分别检测各组结核分枝杆菌菌株原始状态下的 PhoP 基因和 PhoR 基因的表达,比较分析不同耐药性的结核分枝杆菌临床分离株 PhoP 基因和 PhoR 基因表达水平的差异。检测比较分析各组结核分枝杆菌在 INH、RFP、SM、EB 抗结核药物选择压力下,各组结核分枝杆菌菌株的 PhoP 基因和 PhoR 基因表达的变化;检测比较分析各组结核分枝杆菌在复制的感染小鼠动物模型的肺脏、肝脏和脾脏内,各组结核分枝杆菌菌株的 PhoP 基因和 PhoR 基因表达的变化。

### 结果:

1. 在原始状态下,耐药性结核分枝杆菌临床分离株的 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平比临床分离药物敏感菌株显著升高,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ );
2. 在抗结核药物 (INH、RFP、SM、EB) 选择压力作用下,结核分枝杆菌 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平均较各组结核分枝杆菌在原始状态下表达上调,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ );
3. 在各组结核分枝杆菌感染小鼠动物模型的肺脏、肝脏和脾脏内,各组耐药结核分枝杆菌临床分离株的 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平比各组结核分枝杆菌在原始状态下显著升高,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

### 结论:

1. 在结核分枝杆菌临床分离药物敏感菌株、INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB、EB-MTB 和 MDR 中,结核分枝杆菌 PhoP 和 PhoR 基因的表达有差异;
2. 在抗结核药物 (INH、RFP、SM、EB) 选择压力作用下,各组耐药结核分枝杆菌临床分离株的 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平比各组结核分枝杆菌在原始状态下显著升高;
3. 在各组结核分枝杆菌感染小鼠动物模型的肺脏、肝脏和脾脏内,各组耐药结核分枝杆菌临床分离株的 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平比各组结核分枝杆菌在原始状态下显著升高;

综上所述:结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统与新疆地区广泛流行的耐药结核分枝杆菌的耐药性具有相关性。

**关键词:** 结核分枝杆菌; 耐药性; PhoPR 双组分系统

**论文类型:** A (基础研究)

## Abstract

### **Objective :**

Through a comparative analysis PhoP and PhoR differences levels of gene expression in different the drug-resistance of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolate strains , to explore the correlation between *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system and drug-resistance of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolate strains with wide prespread in Xinjiang region.

### **Methods:**

Under its original state, under antibiotic pressure conditions, under animal models in mice after infection, total RNA of MTB was extracted from the original drug resistance MTB and at different concentrations of the drug-containing culture medium MTB, and then its purity was identified. Reverse transcription was further completed. The expressing levels of PhoP and PhoR genes were quantified using SYBR Green I qRT-PCR, which aimed at finding the differential expressions of PhoP and PhoR genes between drug resistant strains and drug-susceptible strains.

### **Results:**

1. In its original state, mRNA expression levels of genes in PhoP and PhoR resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates was significantly higher than the drug-sensitive clinical isolates, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ).
2. Under the influence of anti-TB drugs (INH, REP, SM, EB) is, mRNA expression levels of genes in PhoP and PhoR resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates was significantly higher than the drug-sensitive clinical isolates, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ).
3. After the mice were infected animal models of lung, liver and spleen, mRNA expression levels of genes in PhoP and PhoR resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates was significantly higher than the drug-sensitive clinical isolates, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

### **Conclusions:**

1. In its original state, mRNA expression levels of genes in PhoP and PhoR resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates was significantly higher than the drug-sensitive clinical isolates.
2. Under the influence of anti-TB drugs (INH, REP, SM, EB) is, mRNA expression levels of genes in PhoP and PhoR resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates was significantly higher than the drug-sensitive clinical isolates.
3. After the mice were infected animal models of lung, liver and spleen, mRNA expression levels of genes in PhoP and PhoR resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates was significantly higher than the drug-sensitive clinical isolates.

In summary: *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component systems and the Xinjiang region of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates resistant have relevance.

**Key words:** *Mycobacterium Tuberculosis*; drug-resistant; PhoPR two-component system;

**Type of thesis:** A(Basic research)

## 英汉缩略语名词对照表

(List of Abbreviations)

缩略语	英文全名	中文全称
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	结核分枝杆菌
TB	Tuberculosis	结核病
MDR-TB	Mutiple drugs resistant Bacillus tuberculosis	耐多药结核病
TCS	Two-component systems	双组分系统
HK	Histidine kinase	膜结合的组氨酸激酶感应蛋白
RR	Response regulator	胞质内的反应调节蛋白
HPt	His-containing phosphotransfer	含有 His 残基的磷酸转移蛋白
INH	Isonicotinic acid hydrazide	异烟肼
RFP	Rifampicin	利福平
SM	Streptomycin	链霉素
EB	Ethambutol	乙胺丁醇
MDR	Multiple drug resistance	多重耐药性
MIC	Minimum inhibitory concentration	最低抑菌浓度
CFU	Colony-Forming Units	菌落形成单位
Ct	Cycle threshold	循环阈值
L-J	Lowenstein-Jensen Medium	改良罗氏培养基
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcript polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
qRT-PCR	Real-time quantitative PCR	实时定量荧光 PCR
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
DEPC	Diethypyrocar-bonate	焦碳酸二乙酯

OD	Optical Density	光密度
dNTP	Deoxy-ribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
WHO	World health organization	世界卫生组织
pH	pH value	pH 值
bp	Base pair	碱基对
TE	Tris-Ethylene diamine tetraacetic acid	三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
μg	Microgram	微克
°C	centigrade	摄氏度
min	minutes	分钟
rpm	rotation per minute	转/分钟
S	second	秒
ml	Milliliter	毫升

## 前 言

### ( Introduction)

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由 MTB (*Mycobacterium Tuberculosis*) 引起的一种世界性传染病, 也是单一致病菌感染导致死亡率最高的感染性疾病。近年来结核分枝杆菌单纯耐一线抗结核药物和多重耐药等现象严重, 致使我国结核病流行现状复杂化。在全球、中国及新疆地区结核病的高耐药率和结核分枝杆菌耐多药菌株不断扩散, 而结核分枝杆菌的耐药机制尚不清楚, 这给结核病的有效防治造成了极大困难。因此, 对结核分枝杆菌产生耐药的调控机制的研究, 将为控制由耐药结核分枝杆菌导致的结核病提供理论依据。

结核分枝杆菌的耐药机制十分复杂, 包括结核分枝杆菌细胞壁结构与组成变化、结核分枝杆菌自身的药物外排泵系统、结核菌药物靶编码基因发生突变。

细胞壁结构与组成变化, 使细胞壁通透性改变结核分枝杆菌耐药有着密切的关系, 因基因突变而导致 MTB 细胞壁结构发生改变从而使 MTB 耐药的基因有 *katG*、*inhA*、*ahpC*、*oxyR*、*kasA*、*ndh*、*embC*、*embA*、*embB*、*alrA*、*gadA*。药物外排泵系统在 MTB 中非常活跃, 外排泵能将菌体内药物泵出, 使得胞内药物浓度不能有效抑制或杀死结核分枝杆菌, 从而产生耐药性。结核分枝杆菌存在药物主动外排泵的表达, 并被视为是 MTB 药物靶分子突变机制外的一个重要耐药机制。近期的研究结果显示, 即结核分枝杆菌主要通过改变菌体内药物作用的靶位而产生耐药, 而药物作用靶位的改变可由相应的基因突变所引起。部分耐单药结核分枝杆菌的基因突变已得到证实, 如编码过氧化氢酶-过氧化物酶的 *KatG* 基因和编码烯酰胺还原酶的 *inhA* 基因的突变是结核分枝杆菌耐异烟肼 (isoniazid, INH) 的主要分子机制<sup>[1]</sup>; 编码 RNA 聚合酶  $\beta$  亚单位的 *rpoB* 基因的突变是 95% 以上的结核分枝杆菌耐利福平 (rifampicin, RIF) 的分子机制<sup>[2]</sup>。80% 耐链霉素的结核分枝杆菌临床分离株可见 *rpsL* 或 *rrs* 基因突变<sup>[3]</sup>。结核分枝杆菌耐药性的产生多见于其基因组上编码药物标靶的基因或药物活性有关的酶基因突变所造成, 即基因型耐药。基因型耐药的基础是在大量结核分枝杆菌群中存在天然抗药突变株, 这些突变株在药物的选择压力下保留并繁殖。基因型耐药菌株能够将耐药特性传递给后代菌株, 后代菌株能保持并遗传其耐药性。

MTB 的耐药机制极为复杂, 对不同的抗生素存在着不同的耐药机制, 而且对同一种抗生素往往也是几种耐药机制共同作用的结果。对结核分枝杆菌耐多药的分子机制, 目前也尚缺乏足够研究。近期还有研究结果显示, 结核病耐药机制除了与在治疗过程中使用抗结核药物等药物因素引起结核分枝杆菌菌株染色体上某些基因发生突变等有关外, 还与非药物因素如细菌的滞留性、细菌主动外排系统的功能、宿主体内复杂的微环境等有关, 这些非药物因素也是导致结核分枝杆菌耐药发生的重要原因。这些研究结果进一步提示, 结核分枝杆菌耐药机制复杂。

典型的双组份系统由两个组分构成: 膜结合的组氨酸激酶感应蛋白 (Histidine

kinase, HK) 和胞质内的反应调节蛋白 (Response regulator, RR)。HK 感知胞外刺激后, HK 激酶结构域被激活使保守的组氨酸残基发生依赖于 ATP 的自磷酸化, 将一个磷酰基转移到 RR 保守的天冬氨酸残基上, 接着 RR 再引发下游通路的特异反应<sup>[4]</sup>。RR 通过构象的改变调节基因的表达和蛋白的功能, RR 的磷酸化水平控制其活性。HK 蛋白包括一个输入结构域 (input domain), 通常与膜结合负责感应外界信号; 还有一个传递结构域 (transmitted domain), 将信号传递给与其相连的 RR。RR 的结构域包括一个接收区域 (receive domain) 用来接收与其相连的 HK 传递的信号; 还有一个典型的转录调节蛋白的输出结构域(output domain)。HK 的传递结构域通常包括高度保守的短氨基酸序列, 在其结构域中包含一个不变的组氨酸残基, 依赖于 ATP 发生自磷酸化。RR 的接收结构域作为磷酸基团的接收区域, 在其中心位置有一天冬氨酸残基。除此之外, 还有一个含有 His 残基的磷酸转移蛋白 (His-containing phosphotransfer, HPt) 在从 HK 转移磷酸基团到 RR 的过程中具有重要的作用<sup>[5]</sup>。

除了 HK 和 RR 蛋白本身, 还有许多系统包含辅助的调控蛋白。所有的调控方式都取决于 RR 磷酸化的水平。典型的 RR 具有自磷酸化酶的活性, 限制磷酸化过程。在一些情况下, 辅助的磷酸酯酶或蛋白增强 RR 的自磷酸化酶活性, 从而促进 RR 的去磷酸化。许多 HK 除了向 RR 提供磷酸基团之外, 也具有 RR 的磷酸酶活性。HK 的磷酸转移和磷酸酶活性都可以直接通过外界信号刺激 (通过跨膜感应区域) 或间接通过与辅助蛋白的结合 (通过细胞质内的区域) 而被调控。还有一个更复杂的调控模式, 即多个 HK 与一个 RR 结合, 或一个 HK 与多个 RR 结合。

PhoPR 双组分系统对结核分枝杆菌的毒力及持留性有重要作用。PhoPR 双组分系统由感受器 PhoR 和效应器 PhoP 组成。在结核分枝杆菌中敲除 PhoPR 双组分系统, 其突变株菌落形态、索状因子性质及对碱性染料中性红的反应都有显著改变, 而这些结核分枝杆菌的内在性质已经被确认和毒力有关, 突变株的性质改变可能与其细胞外膜成分的改变有关<sup>[6]</sup>。双组分系统是通过感受外界环境的刺激来调控基因的表达, 以此来适应环境的变化。细胞壁或细胞膜的结构改变使 PhoR 感受信号, 对外界环境的刺激作出反应。通过和标准株 H37Rv 相比, PhoP 突变株对万古霉素更敏感。这可能是万古霉素对结核分枝杆菌细胞壁或细胞膜的作用, 引起结核分枝杆菌中 PhoP R 双组分系统的激活, 导致结核分枝杆菌对万古霉素的抵抗。而 PhoP 突变株中由于 Pho PR 双组分系统缺陷, 出现了对万古霉素更敏感的现象, 所 PhoPR 双组分系统有可能成为潜在的抗结核药物的候选靶位。

PhoPR 双组份系统包括两个蛋白,膜相关的 HK 以及 HK 同源磷酸化的 RR。双组分系统中同源的感受器和效应器只能彼此互相作用。研究表明结核分枝杆菌的 PhoR 和 PhoP 来源于同一类型、互相作用的同源对, 因为他们的结构基因是紧密相关的。PhoP 基因位 PhoR 基因的上游, 由 744 个碱基对组成, 共编码 248 个氨基酸。PhoP 基因位 PhoR 基因的上游, 由 1458 个碱基对组成, 共编码 485 个氨基酸。Chesne- Seck<sup>[7]</sup> 等证明 PhoP 在 219 位的突变(TCG 突变 TTG)是 H37Ra 缺失 SL ( Sulfolipids)、DAT(Diacy ltr ehaloses)

和 PAT(Polyacyltrehaloses)的主要原因。根据结核分枝杆菌 PhoP 羧基末端结构域序列的相似性,把 PhoP 归入 OmpR( Outer Membrane Protein Receptor ) 家族,这个家族以一个有翼的螺旋作为 DNA 结合区为特征<sup>[8]</sup>。PhoP 和其他的 OmpR 家族成员一样,由氨基末端的磷酸化结构域和羧基末端的 DNA 结合区组成。

双组分系统是通过感受外界环境的刺激来调控基因的表达,以此来适应环境的变化。Walters 等<sup>[9]</sup>发现结核分枝杆菌 PhoP 突变株,不能在低浓度的  $Mg^{2+}$ 条件下生长。通过分析结核分枝杆菌国际标准强毒株 H37Rv 株和其 PhoP 突变株在高、低浓度  $Mg^{2+}$ 中的生长情况,结果表明与  $Mg^{2+}$ 转运有关基因的表达在不同浓度中没有差别,结核分枝杆菌 PhoP 突变株的生长需要高浓度  $Mg^{2+}$ 的原因尚不清楚,可能与  $Mg^{2+}$ 能稳定受损的细胞膜结构有关<sup>[10]</sup>。细胞壁或细胞膜结构改变使 PhoR 感受信号,对外界环境的刺激作出反应<sup>[11]</sup>。通过和结核分枝杆菌国际标准强毒株 H37Rv 株相比,结核分枝杆菌 PhoP 突变株对万古霉素更敏感。这可能是万古霉素对结核分枝杆菌细胞壁或细胞膜的作用,引起结核分枝杆菌中 PhoPR 双组分系统的激活,导致结核分枝杆菌对万古霉素的抵抗和耐药<sup>[12]</sup>。而结核分枝杆菌 PhoP 突变株中由于 PhoPR 双组分系统缺陷,出现了对万古霉素更敏感的现象,所以 PhoPR 双组分系统有可能与结核分枝杆菌的耐药性相关,PhoPR 双组分系统有可能成为潜在的抗结核药物的候选靶位。

本研究旨在通过比较分析结核分枝杆菌药物敏感菌株、INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB、EB-MTB 和 MDR 的 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平的差异,探讨研究结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统与新疆地区广泛流行的耐药结核分枝杆菌耐药性是否具有相关性,希望为进一步研究结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统对结核分枝杆菌耐药性调控作用机制奠定基础。

## 材料和方法 (Materials & Methods)

### 1. 材料

#### 1.1 菌株:

结核分枝杆菌标准菌株 (H37Rv) 来源于中国药物生物制品检定所, 本实验室培养传代保存。30株结核分枝杆菌临床分离株由本实验室采集样本保存并鉴定, 包括结核分枝杆菌临床分离药物敏感菌株、单纯耐异烟肼的结核分枝杆菌临床分离株 (INH-MTB)、单纯耐利福平的结核分枝杆菌临床分离株 (RFP-MTB)、单纯耐链霉素的结核分枝杆菌临床分离株 (SM-MTB)、单纯耐乙胺丁醇的结核分枝杆菌临床分离株 (EB-MTB)、耐多药的结核分枝杆菌临床分离株的结核分枝杆菌株 (MDR)。

#### 1.2 小鼠

昆明种小鼠雌雄各半共 50 只, 由石河子大学实验动物中心提供。

#### 1.3 主要试剂

RNeasy Plus Universal Mini Kit	德国 QIAGEN 公司
QuantiTect Reverse Transcription Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)	德国 QIAGEN 公司 美国 Thermo Scientific 公司
Difco™ Middlebrook 7H9 Broth	美国 BD 公司
异烟肼	美国 Sigma 公司
利福平	美国 Sigma 公司
链霉素	美国 Sigma 公司
乙胺丁醇	美国 Sigma 公司
PCR 引物	上海生物工程有限责任公司
DEPC	美国 Sigma 公司
溶菌酶	北京索莱宝科技有限公司
SDS (十二烷基硫酸钠)	美国 Sigma 公司
蛋白酶 K	美国 Sigma 公司
氯仿	上海生物工程有限责任公司
谷氨酸钠	北京索莱宝科技有限公司
磷酸二氢钾	天津市福尘化学试剂厂
硫酸镁	天津市福尘化学试剂厂
柠檬酸镁	天津市登科化学试剂有限公司
丙三醇	天津永晟精细化工有限公司
孔雀绿	天津市天达净化材料精细化工厂

琼脂糖	Promega 公司
Gelview	Takara 公司
无水乙醇	西安化学试剂厂产品
甲醇	天津市福晨化学试剂厂产品
Tris	美国 Sigma 公司
Tween-80	天津化学试剂厂
5×TBE	上海生物工程有限责任公司
TE	上海生物工程有限责任公司
PBS	上海生物工程有限责任公司
氯化钡	天津市福晨化学试剂厂
<b>1.4 主要实验仪器设备</b>	
SYBR Green I 实时定量 PCR 仪	罗氏公司
TC3000 PCR 仪	英国 Techne 公司
Gel Doc2000 凝胶成像系统	美国 Bio-RAD 公司产品
紫外分光光度计 Nanodrop 2000	美国 Thermo 公司
生物安全柜	Thermo Electron Corporation
22SWG 标准接种环	北京玻璃仪器厂
SHH.W21 电热恒温水浴箱	上海精宏实验设备有限公司
HJ-4 多头磁力搅拌器	江苏金坛市医疗仪器厂
磨菌管	北京玻璃仪器厂
XW-80A 涡旋震荡期	上海精科实验有限公司
CO <sub>2</sub> 培养箱：型号 S/N27709-1462	美国 Forma 公司
水平电泳仪	Biorad 公司
冰箱（4℃和-20℃）	青岛海尔公司
冰箱（-80℃）	美国 Thermo 公司
SW-CJ-2FD 超净工作台	中国苏净集团安泰公司
低温高速离心机	美国 Thermo 公司
普通离心机	长沙湘仪离心机仪器有限公司产品
电子天平	上海天平仪器厂
旋涡混合器	江苏金坛市医疗器械厂
移液管	沧州复康医药用品公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司产品
高压消毒锅	日本 SANYO 公司

YLD-2000 型电热恒温干燥箱	湖北恒丰医疗器械有限公司
TYK-4021 型超纯水机	乌鲁木齐超纯水机厂
791 型磁力搅拌器	上海南汇电讯器械厂

## 1.5 主要试剂配制

### 1.5.1 麦氏比浊管的配制

1%BaCl<sub>2</sub> 0.1ml, 1%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 9.9ml, 封口, 室温下放暗处保存, 比浊前摇匀。有效期为 6 个月。

### 1.5.2 2%孔雀绿水溶液

孔雀绿 2g, 溶于 100ml 蒸馏水中。加温溶解后, 121℃, 15min, 4℃冰箱保存备用。

### 1.5.3 125mg/ml 溶菌酶

1ml 灭菌超纯水中加入溶菌酶 0.125g。

### 1.5.4 20mg/ml 蛋白酶 K

500μl 灭菌超纯水中加入蛋白酶 K 0.01g。

### 1.5.5 1%SDS

SDS	1 g
超纯水定容至	100 ml

50℃水浴溶解, 于室温保存。(如长期保存出现沉淀, 水浴溶解后可继续使用)

### 1.5.6 2%琼脂糖凝胶

称取琼脂糖1.6g, 加入0.5×TBE定容至80mL, 加热溶解, 待温度降至50℃~60℃, 加入8μl核酸染料, 慢慢摇匀, 倒入凝胶槽, 置于0.5×TBE溶液内保存。

### 1.5.7 20%Tween80

Tween80	20 ml
蒸馏水至	100 ml

充分混匀后, 于4℃保存。

### 1.5.8 Middlebrook 7H9 液体培养基 (Difco)

培养基的配制

7H9培养基	4.7g
Milli Q 水	900ml

加热溶解, 并分装成 5 瓶, 每瓶 180ml。

121℃灭菌 10 分钟。

冷却至45℃后, 于无菌超净台内, 每瓶加入20ml ADC(albumin-dextrose-catalase enrichment)营养添加剂备用。

### 1.5.9 分枝杆菌分离培养基—酸性罗氏培养基<sup>[13]</sup>

表 1-1 酸性罗氏培养基的配制  
Table 1-1 Roche formulated acidic culture medium

成分	用量
谷氨酸钠 (纯度 95%以上)	7.2 g
磷酸二氢钾 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	14 g
硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.24 g
柠檬酸镁	0.6 g
蒸馏水	600 ml
新鲜鸡卵液	1000 ml
2%孔雀绿水溶液	20 ml
丙三醇	12ml

制备方法:

(1) 基础液的制备: 量取蒸馏水 600 ml, 加入已经称量好的谷氨酸钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、柠檬酸镁和丙三醇, 加热使其溶解至透明糊状, 自然冷却。

(2) 新鲜鸡卵液的制备: 首先清理鸡蛋表面, 将已洗净的鸡蛋浸泡至 70%乙醇中或其他消毒液中 20-30 min; 取出, 擦干, 开口, 收集鸡卵液, 充分混匀, 通过 6—8 层无菌纱布过滤。

(3) 将上述 600ml 基础液和 1000ml 新鲜鸡卵液混匀。加入已制备好的 2%孔雀绿水溶液 20ml, 搅拌至充分混匀, 静置 1 小时后, 将其分装至 2.3cm×8cm(30ml)聚丙烯螺旋口标准无菌培养管或灭菌试管中, 每管约 7 ml; 倾斜放置于水浴锅架上, 调整培养基斜面倾斜至约 30 度, 使培养基斜面占试管的 2/3, 经蒸汽凝固灭菌器 85 °C凝固灭菌 50 min, 间歇灭菌两次; 制备的培养基颜色应呈绿色, 表面光滑湿润, 有一定韧性和酸碱缓冲能力。

(4) 将已制备的培养基 37 °C恒温做无菌试验 24 小时, 检查培养基是否有污染, 证实无污染后, 放置 4 °C冰箱避光保存, 使用期限为 1 个月。

#### 1.5.10 分枝杆菌药敏试验培养基—改良罗氏培养基<sup>[13]</sup>

制备方法:

(1) 基础液的制备: ①精确称取各盐类成分, 加蒸馏水 600 ml, 沸水浴溶解, 待冷却后, 加入丙三醇和 2%孔雀绿, 混匀。②将新鲜鸡卵洗净, 用 75%酒精纱布擦拭消毒后打碎, 搅匀, 经消毒纱布过滤, 定量至 1000ml。③将过滤后的鸡卵液加入各盐类成分中, 充分混匀, 静置约 1 小时。

(2) 药物储存液的制备<sup>[14,15]</sup>: ①在无菌容器内称取少量粉末, 按不同药物出厂标定的效价精确计算其有效含量。②分别计算每种药物应加入的溶剂体积, 使的 4 种一线抗结核药物的浓度分别为: INH 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , RFP 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SM 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , EMB 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。除 RFP 先用少量的二甲基酰胺溶解后加灭菌蒸馏水外, 其余药物均用灭菌蒸馏水溶解。

③制备后的药物储存液分装至无菌试管，每管 5-10ml，封口，-20℃冻存备用，3 个月内用完。

表 1-2 改良罗氏培养基的配制  
Table 1-2 Lowenstein-Jensen medium preparation

成分	用量
谷氨酸钠（纯度 95%以上）	7.2 g
磷酸二氢钾 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	14 g
硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.24 g
柠檬酸镁	0.6 g
蒸馏水	600 ml
新鲜鸡卵液	1000 ml
2%孔雀绿水溶液	20 ml
丙三醇	12ml

（3）含药培养基的制备：每次制备含药培养基前取出 1 管储存液，室温融化，按实际需要量每 100ml 培养基中加入 1ml 药物储存液，充分混匀，分装至螺旋盖无菌培养管，每管约 7ml，斜置培养基蒸汽凝固灭菌器内，85℃凝固 50min，即制成含药培养基。②含药培养基中的药物终浓度分别为：低浓度结核药物（INH 的浓度为 1μg/ml，RFP 的浓度为 50μg/ml，SM 的浓度为 10μg/ml，EB 的浓度为 5μg/ml）和高浓度抗结核药物（INH 的浓度为 10μg/ml，RFP 的浓度为 250μg/ml，SM 的浓度为 100μg/ml，EB 的浓度为 50μg/ml）。③凝固灭菌后的培养基自然冷却后，置 37℃无菌试验 24 小时。检查培养基污染情况，证实无污染后置 4℃避光保存，1 个月内用毕。

## 2 方法

### 2.1 菌株的培养和药物敏感性试验

#### 2.1.1 菌株的培养

结核分枝杆菌标准菌株（H37Rv）来源于中国药物生物制品检定所，本实验室培养传代保存。30 株结核分枝杆菌临床分离株由本实验室采集样本并保存，包括结核分枝杆菌临床分离药物敏感菌株 5 株、单纯耐异烟肼的结核分枝杆菌临床分离株（INH-MTB）5 株、单纯耐利福平的结核分枝杆菌临床分离株（RFP-MTB）5 株、单纯耐链霉素的结核分枝杆菌临床分离株（SM-MTB）5 株、单纯耐乙胺丁醇的结核分枝杆菌临床分离株（EB-MTB）5 株、耐多药的结核分枝杆菌临床分离株的结核分枝杆菌株（MDR）5 株。分别接种于罗氏固体培养基上，放置 37℃恒温隔水式培养箱培养，3-4 周后观察结核分枝杆菌生长状况，以上全部实验操作需在生物安全柜内进行。

## 2.1.2 药物敏感性试验<sup>[13]</sup>

### 2.1.2.1 准备待测细菌

凡经过临床分离培养的分枝杆菌的新鲜培养物（初生长 2 周）无需 2 次传代即可做药物敏感测定，初生长 2 周后和贮存培养物须在改良罗氏培养基上进行 2 次传代后生长 2~3 周的亚培养物方可试验。

### 2.1.2.2 菌悬液的制备

（1）磨菌器法：磨菌器底部为磨砂状、体部透明，便于比浊。将上述培养物（需刮取斜面各个部分的培养物）以 0.5%吐温-80 生理盐水磨菌，直至其浊度与标准麦氏比浊管（MacFarland No.1）一致，即可得到湿重 1mg/ml 的菌液。

（2）玻璃棒磨菌法：用玻璃棒刮取 2~3 周的新鲜菌落，放入 18mm×180mm 试管壁上，插入磨菌棒捻动，使呈乳酪样并混于管内的 0.5%吐温-80 生理盐水中，与标准麦氏比浊管（MacFarland No.1）一致，即可得到湿重 1mg/ml 的菌液。

### 2.1.2.3 菌液稀释和接种

（1）菌液稀释：静置片刻，使菌液中的颗粒或菌块沉淀后，用刻度吸管或标准接种环将 1mg/ml 的菌液上清逐步稀释至  $10^{-2}$ mg/ml 和  $10^{-4}$ mg/ml。稀释方法：用 22SWG 标准接种环沾取 2 满环 1mg/ml 的菌液，移至 2ml 灭菌生理盐水中，即稀释成  $10^{-2}$ mg/ml 的菌液；同样的方法再进行 100 倍稀释，即成  $10^{-4}$ mg/ml 菌液。

（2）用 22SWG 标准接种环沾取 2 满环（即 0.01ml） $10^{-2}$ mg/ml 和  $10^{-4}$ mg/ml 的菌液，用划线法均匀接种至对照及含药培养基表面，应注意使菌液尽可能均匀分散于培养基斜面。最终接种菌量为  $10^{-4}$ mg/ml 和  $10^{-6}$ mg/ml。

（3）接种后的培养基置于 37℃培养，至四周后报告结果。

### 2.1.2.4 药敏结果判定

（1）分别记录接种  $10^{-2}$ mg/ml 和  $10^{-4}$ mg/ml 菌液的培养基上菌落的生长情况，按下表结果。

表 2-1 分枝杆菌培养报告方式

Table 2-1 Reporting form of Mycobacterium culture results

报告方式	菌落生长情况
实报菌落数	少于 50 个菌落
+	50-100 个菌落
++	100-200 个菌落
+++	大部分融合（200-500 个菌落）
++++	融合（大于 500 个菌落）

（2）计算耐药百分比

$$\text{耐药百分比} = \frac{\text{含药培养基上生长的菌落数}}{\text{对照培养基上生长的菌落数}} \times 100$$

### 2.1.2.5 标准对照

若高稀释度菌液 ( $10^{-4}$ mg/ml) 在对照培养基上生长的菌落数少于 20 个菌落, 则应从对照管传代培养, 重复试验。每批药物敏感性试验以结核分枝杆菌参考菌株 (H37RV)  $10^{-3}$ mg/ml 检测含药培养基的质量。

## 2.2 在结核分枝杆菌临床分离株原始状态下, 检测 PhoP 和 PhoR 基因的表达

### 2.2.1 结核分枝杆菌的培养

将结核分枝杆菌标准菌株 (H37Rv)、结核分枝杆菌临床分离药物敏感菌株、单纯耐异烟肼的结核分枝杆菌临床分离株 (INH-MTB)、单纯耐利福平的结核分枝杆菌临床分离株 (RFP-MTB)、单纯耐链霉素的结核分枝杆菌临床分离株 (SM-MTB)、单纯耐乙胺丁醇的结核分枝杆菌临床分离株 (EB-MTB)、耐多药的结核分枝杆菌临床分离株的结核分枝杆菌株 (MDR) 同时分别接种于罗氏固体培养基上, 放置 37°C 恒温隔水式培养箱培养。培养期间注意观察结核分枝杆菌生长状况和恒温培养箱的温度。3-4 周后选取生长良好的结核分枝杆菌用于实验。以上全部实验操作需在生物安全柜内进行。

### 2.2.2 结核分枝杆菌总 RNA 的提取

按照 RNA 抽提试剂盒 RNeasy Plus Universal Midi Kit 的说明书提取上述培养的结核分枝杆菌总 RNA, 具体操作步骤如下:

准备工作: Buffer RWT 加入 2 体积的乙醇 (96-100%)

Buffer RPE 加入 4 体积的乙醇 (96-100%)

将离心机预冷至 4°C; 水浴箱预热至 37°C

(1) 收集 4-5 次铂金环结核分枝杆菌于含 175 $\mu$ l 的 TE 缓冲液 (0.01M tris-HCl, pH 8.0, 0.001M EDTA), 于 2.0 ml 无酶 EP 管中。加入 25 $\mu$ l 的 100mg/ml 溶菌酶使其最终浓度为 10mg/ml, 37°C 温浴过夜。

(2) 次日加入终浓度为 1% SDS, 37°C 温浴 15 分钟, 彻底混匀后, 加入 2.5 $\mu$ l 的 0.2g/ml 蛋白酶 K 使其最终浓度为 200 $\mu$ g/ml, 45°C 温浴 15 分钟。

(3) 加入 1 毫升 QIAzol 裂解试剂, 强力混匀。

(4) 将含有均质化裂解液的离心管室温 (15-25°C) 放置 5 min。(这一步可以使核蛋白解离。)

(5) 加入 100  $\mu$ l gDNA Eliminator Solution, 盖上管盖, 强力混匀 15 s。(加入的 gDNA Eliminator Solution 可以有效地降低液相中 genomic DNA 的污染, 不需要进一步用 DNase 处理了。)

(6) 加入 180  $\mu$ l 氯仿, 盖上管盖, 强力混匀 15 s。(彻底混匀对后期的分相非常重要。)

(7) 将含有均质化裂解液的离心管室温 (15-25°C) 放置 2~3 min。

(8) 12,000 x g, 4°C 离心 15 min。如果使用同一台离心机, 离心结束后, 将离心机的温度恢复到室温 (15-25°C)。(离心之后, 样品将分为 3 相: 上层无色液相包含 RNA;

白色中间相；下层红色有机相。如果是含有高脂肪的组织样品，在红色有机相之下还可能形成另外一个清楚的相层。无色液相的体积大约在 3 ml。)

(9) 将上层液相(通常为 600  $\mu$ l)转移至一个新的离心管中(自备)。

(10) 加入 1 体积(约 600  $\mu$ l)的 70%乙醇，枪头吹打彻底混匀，不要离心，立即进入步骤 11。

(11) 注意：由于均质化和离心步骤，裂解液的体积可能会少于 600  $\mu$ l，在加入乙醇以后可能会形成沉淀。通过彻底混匀使沉淀完全重悬，立即进入步骤 11。

(12) 将约 700  $\mu$ l 样品加入到置于 2 ml 收集管中的 RNeasy Mini spin column 粉色(试剂盒提供)上。轻盖上管盖，室温(15–25  $^{\circ}$ C)， $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$ rpm) 离心 15s。弃流出液，第 12 步 重复使用收集管。

(13) 将剩余的样品重复进行第 11 步，弃流出液，第 13 步重复使用收集管。

(14) 在 RNeasy spin column 中加入 700  $\mu$ l Buffer RWT，轻盖上管盖，室温(15–25  $^{\circ}$ C)， $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$ rpm)离心 15s 洗膜。弃流出液，第 14 步重复使用收集管。离心之后，小心将 RNeasy spin column 从收集管中取下，不要接触到流出液。保证收集管中的液体已经倾倒完全。注意：Buffer RWT 是以浓缩液的形式提供的，在使用之前保证乙醇已经 添加到 Buffer RWT 中：Buffer RWT 加入 2 体积的乙醇(96-100%)

(15) 在 RNeasy spin column 加入 500  $\mu$ l Buffer RPE，轻盖上管盖，室温(15–25  $^{\circ}$ C)， $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$ rpm)离心 15s 洗膜。弃流出液，第 15 步重复使用收集管。注意：Buffer RPE 是以浓缩液的形式提供的，在使用之前保证乙醇已添加到 Buffer RWT 中：Buffer RPE 加入 4 体积的乙醇(96-100%)

(16) 在 RNeasy spin column 加入 500  $\mu$ l Buffer RPE，室温(15–25  $^{\circ}$ C)， $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$ rpm)离心 2 min，洗膜。长时间的离心，可以将膜干燥，保证在 RNA 洗脱时没有乙醇残留。残余的乙醇会干扰下游的反应。注意：离心之后，小心将 RNeasy spin column 从收集管中取出，不要接触到流出液，否则会沾带上乙醇。

(17) 将 RNeasy spin column 至于一个新的 2 ml 收集管(试剂盒提供)中。直接向旋转柱膜中加入 30-50  $\mu$ l 的无 RNase 的水。轻轻地合上盖子。为了洗脱 RNA，等待 1min，然后在 $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10000$ rpm)下离心 1 分钟。

(18) 再用 另一体积的 RNase-free 水重复第 16 步，或者将第 16 步的洗脱液再加入到膜上。(如果需要得到高浓度的 RNA，重复使用第 16 步的收集管。如果使用第 16 步的洗脱液，RNA 产量会比第二次使用 RNase-free water 的产量少 15–30%，但 RNA 的浓度却会更高。)得到的 RNA 保存在-80 $^{\circ}$ C，防止降解。

### 2.2.3 总 RNA 的反转录反应

按照反转录试剂盒 QuantiTect Reverse Transcription 的说明书反转录上述结核分枝杆菌总 RNA，具体操作步骤如下：

(1) 冰上溶解模板 RNA。室温(15–25  $^{\circ}$ C)溶解 gDNA Wipeout Buffer、Quantiscript、

Reverse Transcriptase、Quantiscript RT Buffer、RT Primer Mix 和 RNase-free water。轻弹离心管，让每一管中的液体混匀。短离心一下，收集管壁上的液体，置于冰上。

(2) 按照表 2-2 冰上准备 gDNA 去除反应体系。然后按照 RNA 模板进行分装。保持冰上操作。

**表 2-2. 基因组 DNA 消除反应的组成**  
**Table 2-2. Genomic DNA elimination reaction components**

组成	体积	终浓度
gDNA Wipeout Buffer,7×	2 $\mu$ l	1×
Template RNA	Variable(up to 1 $\mu$ g)	
RNase-free water	Variable	
总体积	14 $\mu$ l	

(3) 42  $^{\circ}$ C 孵育 2 min, 后立即置于冰上。(注意: 42  $^{\circ}$ C 孵育的时间不要超过 10 min。)

(4) 按照表 2-3 准备反转录反应体系, 混匀置于冰上。这个反转录 master mix 包含所有合成第一链 cDNA 所需的成分(除模板 RNA 之外), 然后按照 RNA 模板进行分装。保持冰上操作。

(5) 将第 3 步的模板 RNA(14  $\mu$ l)加入到每一管反转录反应 master mix 中, 混匀置于冰上。

(6) 42  $^{\circ}$ C 孵育 15 min。

(7) 95  $^{\circ}$ C 孵育 3 min, 使反转录反应酶失活。

**表 2-3 反转录反应的组成**  
**Table 2-3 Reverse-transcription reaction components**

组成	体积	终浓度
<b>Reverse-transcription master mix</b>		
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l	
Quantiscript RT Buffer,5×	4 $\mu$ l	1×
RT Primer Mix	1 $\mu$ l	
<b>Template RNA</b>		
Entire genomic DNA	14 $\mu$ l(add at step 5)	
Elimination reaction(step 3)		
总体积	20 $\mu$ l	

#### 2.2.4 引物的设计及合成

(1) 通过 NCBI GeneBank 查找结核分枝杆菌 H37Rv 菌株 PhoP 基因和 PhoR 基因以及内参基因 SigA 基因的序列。

(2) 通过使用 Primer 5 和 Oligo 6 软件设计 PhoP 基因和 PhoR 基因以及内参基因 SigA 寡核苷酸引物, 具体引物序列如下:

表 2-4 PhoP 和 PhoR 基因及内参基因 SigA 的引物序列  
Table 2-4 PhoP and PhoR gene and reference gene SigA primer sequences

基因	引物	扩增产物长度	退火温度
PhoR	上游引物 (F): 5'-GGACCCCTACCCTGGTCATA -3'	108bp	55°C
	下游引物 (R): 5'-ATGGCAGTGTGTCGTTGAG -3'		
PhoP	上游引物 (F): 5'-AACCCCAGGCGAAAACAC -3'	353bp	55°C
	下游引物 (R): 5'-CGACCTCCTCCAAACTGAAG -3'		
SigA	上游引物 (F): 5'-TCGAGGTGATCAACAAGCTG -3'	254bp	55-60°C
	下游引物 (R): 5'-CTGCAGCAAAGTGAAGGACA -3'		

### 2.2.5 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR

#### (1) 反应体系

试剂	50 $\mu$ l 反应体系	终浓度
2 $\times$ UltraSYBR Mixture	2.5 $\mu$ l	1 $\times$
Forward Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M (1)
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M (1)
Template DNA	2 $\mu$ l	
RNase-Free Water	up to 50 $\mu$ l	

#### (2) 反应条件

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	10 min <sup>1)</sup>	
变性	95°C	15 s	40 个循环
退火/延伸 <sup>2)</sup>	60°C	1 min	
融解曲线分析 <sup>3)</sup>	95°C	15 s	
	60°C	1 min	
	60°C	15 s	

#### (3) 数据采集

每次试验对照株和耐药株 PhoP 基因和 PhoR 基因 cDNA 各设 3 个平行反应孔。采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 仪配套的 SDS2.1 软件完成数据采集。

### 2.2.6 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。对敏感菌株和耐药菌株的  $\Delta \Delta Ct$  值进行正态性检

验以及方差齐性检验，采用  $\bar{x} \pm s$  表示。比较敏感菌株和耐药菌株 PhoP 基因和 PhoR 基因相对表达量六个组组间是否有统计学差异，采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析，进一步采用 S-N-K 法做两两比较（S-N-K 法结果说明：在表格的纵向上各组均数由小到大排序，然后在表格的横向上被分成了若干个亚组，每个亚组只列一对 P 值大于 0.05 的分组均数，其差异无统计学意义；不在亚组内的 P 值小于 0.05，具体值不给出，即差异有统计学意义）。

## 2.3 在抗生素压力条件下，检测 PhoP 和 PhoR 基因的表达

### 2.3.1 结核分枝杆菌的培养

将单纯耐异烟肼的结核分枝杆菌临床分离株（INH-MTB）、单纯耐利福平的结核分枝杆菌临床分离株（RFP-MTB）、单纯耐链霉素的结核分枝杆菌临床分离株（SM-MTB）、单纯耐乙胺丁醇的结核分枝杆菌临床分离株（EB-MTB）、耐多药的结核分枝杆菌临床分离株的结核分枝杆菌株（MDR）同时分别接种于含药培养基上，放置 37℃ 恒温隔水式培养箱培养。培养期间注意观察结核分枝杆菌生长状况和恒温培养箱的温度。3-4 周后选取生长良好的结核分枝杆菌用于实验。以上全部实验操作需在生物安全柜内进行。

含药培养基中的药物终浓度分别为：低浓度结核药物（INH 的浓度为 1μg/ml，RFP 的浓度为 50μg/ml，SM 的浓度为 10μg/ml，EB 的浓度为 5μg/ml）和高浓度抗结核药物（INH 的浓度为 10μg/ml，RFP 的浓度为 250μg/ml，SM 的浓度为 100μg/ml，EB 的浓度为 50μg/ml）。

### 2.3.2 结核分枝杆菌总 RNA 的提取

提取上述培养的结核分枝杆菌总 RNA，按照 RNA 抽提试剂盒 RNeasy Plus Universal Midi Kit 的说明书操作，方法同 2.2.2。

### 2.3.3 总 RNA 的反转录反应

反转录上述结核分枝杆菌总 RNA，按照反转录试剂盒 QuantiTect Reverse Transcription 的说明书操作，方法同 2.2.3。

### 2.3.4 引物的设计及合成

（1）通过 NCBI GeneBank 查找结核分枝杆菌 H37Rv 菌株 PhoP 基因和 PhoR 基因以及内参基因 SigA 基因的序列。

（2）通过使用 Primer 5 和 Oligo 6 软件设计 PhoP 基因和 PhoR 基因以及内参基因 SigA 寡核苷酸引物，具体引物序列同 2.2.4。

### 2.3.5 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR

（1）反应体系同 2.2.5

（2）反应条件同 2.2.5

（3）数据采集

每次试验对照株和耐药株 PhoP 基因和 PhoR 基因 cDNA 各设 3 个平行反应孔。采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 仪配套的 SDS2.1 软件完成数据采集。

### 2.3.6 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。对敏感菌株和耐药菌株的  $\Delta \Delta Ct$  值进行正态性检验以及方差齐性检验, 采用  $\bar{x} \pm s$  表示。比较敏感菌株和耐药菌株 PhoP 基因和 PhoR 基因相对表达量六个组组间是否有统计学差异, 采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析, 进一步采用 S-N-K 法做两两比较, 方法同 2.2.6。

## 2.4 构建结核分枝杆菌感染小鼠的动物模型

### 2.4.1 菌液制备

将 6 组的结核分枝杆菌菌株分别接种于改良罗氏培养基上, 37 °C 保湿培养 21 天。刮取生长良好的干菌落研磨, 加入 0.05 % 的吐温 80 生理盐水研磨成 1mg/ml 的细菌悬液, 每毫升悬液含约  $1 \times 10^8$  CFU 活菌。菌液接种于罗氏培养基上用于浓度确定, 培养 21 天后确定菌液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/ml。

### 2.4.2 接种动物

50 只小鼠随机分为 7 组:

- ①生理盐水空白对照组
- ②药物敏感菌株组
- ③单纯耐异烟肼菌株组
- ④单纯耐利福平菌株组
- ⑤单纯耐链霉素菌株组
- ⑥单纯耐乙胺丁醇菌株组
- ⑦耐多药菌株组

其中生理盐水空白对照组 7 只、药物敏感菌株组 7 只、单纯耐异烟肼菌株组 7 只、单纯耐利福平菌株组 7 只、单纯耐链霉素菌株组 7 只、单纯耐乙胺丁醇菌株组 7 只和耐多药菌株组 7 只。每组分别取 0.1 ml 菌液通过尾静脉注射法注射入小鼠体内。每只小鼠注射菌量约为  $1 \times 10^7$  CFU。每组至少 5 只注射成功。接种后的小鼠在动物生物安全三级实验室, IVC 笼具中饲养, 观察小鼠体重和生存情况。空白对照组尾静脉注射等量生理盐水。

### 2.4.3 组织荷菌量检测

于接种后四周脱颈处死小鼠, 无菌取脾、肺和肝组织, 将左侧整叶肺组织、1/2 脾组织、1/2 肝组织放入乳钵研磨碎, 缓慢加入 1 ml 生理盐水, 继续研磨均匀, 再加入 4% 硫酸 1 ml 作用 15 min, 再用生理盐水漂洗, 加 1ml 生理盐水用玻璃匀浆器研磨, 组织悬液经生理盐水按照 1 : 10 进行梯度稀释, 取  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  三个稀释度的组织稀释液 100 $\mu$ l 接 L-J 斜面, 每个稀释度平行接种 3 管, 37 °C 培养 3 周后进行菌落计数。

### 2.4.4 结核分枝杆菌的分离培养

将下面 7 组小鼠

- ①生理盐水空白对照组
- ②药物敏感菌株组
- ③单纯耐异烟肼菌株组
- ④单纯耐利福平菌株组

⑤单纯耐链霉素菌株组

⑥单纯耐乙胺丁醇菌株组

⑦耐多药菌株组

无菌取脾、肺和肝组织，将左侧整叶肺组织、1/2脾组织、1/2肝组织研磨均匀，再加入4%硫酸和生理盐水进行漂洗，加生理盐水进行稀释，取稀释度为 $10^{-3}$ 的组织稀释液100 $\mu$ l分别接种于罗氏固体培养基上，每个脏器平行接种3管，放置37 $^{\circ}$ C恒温隔水式培养箱培养。培养期间注意观察结核分枝杆菌生长状况和恒温培养箱的温度。3-4周后选取生长良好的结核分枝杆菌用于实验。以上全部实验操作需在生物安全柜内进行。

#### 2.4.5 结核分枝杆菌总 RNA 的提取

提取上述培养的结核分枝杆菌总RNA，按照RNA抽提试剂盒RNeasy Plus Universal Midi Kit的说明书操作，方法同2.2.2。

#### 2.4.6 总 RNA 的反转录反应

反转录上述结核分枝杆菌总RNA，按照反转录试剂盒QuantiTect Reverse Transcription的说明书操作，方法同2.2.3。

#### 2.4.7 引物的设计及合成

(1) 通过NCBI GeneBank查找结核分枝杆菌H37Rv菌株PhoP基因和PhoR基因以及内参基因SigA基因的序列。

(2) 通过使用Primer 5和Oligo 6软件设计PhoP基因和PhoR基因以及内参基因SigA寡核苷酸引物，具体引物序列同2.2.4。

#### 2.4.8 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR

(1) 反应体系同2.2.5

(2) 反应条件同2.2.5

(3) 数据采集

每次试验对照株和耐药株PhoP基因和PhoR基因cDNA各设3个平行反应孔。采用SYBR Green I实时荧光定量PCR仪配套的SDS2.1软件完成数据采集。

#### 2.4.9 统计学分析

采用SPSS17.0软件进行统计学分析。对敏感菌株和耐药菌株的 $\Delta\Delta$ Ct值进行正态性检验以及方差齐性检验，采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。比较敏感菌株和耐药菌株PhoP基因和PhoR基因相对表达量六个组组间是否有统计学差异，采用One-Way ANOVA单因素方差分析，方法同2.2.6。

## 结 果 (Results)

### 一、菌株的培养

将结核分枝杆菌国际标准强毒株 H37Rv 株、药物敏感菌株、四种单一耐药菌株及耐多药菌株分别接种于罗氏固体培养基上，37℃温箱培养，生长至对数生长期时生长状态，菌落呈颗粒、结节或花菜状，乳白色或米黄色，不透明。

### 二、上述各种情况下各组 MTB 总 RNA 的提取

使用 Nanodrop2000 紫外分光光度计测量，吸光度比值 (A260/A280) 处于 1.7-2.0 之间，且 A260 大于 1；此外，利用 1.2% 的普通琼脂糖凝胶电泳对提取的总 RNA 进行鉴定，23SRNA 和 16SRNA 均清晰可见，说明总 RNA 完整、无降解和污染。

### 三、原始状态下各组结核分枝杆菌 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 水平的相对表达量

#### 1. 各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的 mRNA 水平的相对表达量

(1) 与结核分枝杆菌药物敏感菌株相比，结核分枝杆菌 PhoP 基因在 RFP-MTB 中的表达上调 1.48 倍，在 MDR 中的表达上调 2.74 倍 (图 3-1)，差异有统计学意义(P<0.05)；

(2) 分别相互比较结核分枝杆菌 PhoP 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 EB-MTB 中的表达，在 RFP-MTB 中的表达分别是 INH-MTB 的 1.47 倍，是 SM-MTB 的 1.55 倍，是 EB-MTB 的 2.80 倍，差异有统计学意义(P<0.05)；

(3) 结核分枝杆菌 PhoP 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 EB-MTB 中的表达与在 MDR 中的表达相比较，表达下调 0.70、0.50、0.25 和 0.21 倍，差异有统计学意义(P<0.05)。(表 3-1、3-2)

#### 2. 各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的 mRNA 水平的相对表达量

(1) 与结核分枝杆菌药物敏感菌株相比，结核分枝杆菌 PhoR 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 EB-MTB 中的表达分别上调 6.33、4.56、2.34和1.85倍，在 MDR 中的表达上调 9.06 倍 (图3-2)，差异有有统计学意义(P <0.05)；

(2) 分别相互比较结核分枝杆菌 PhoR 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 EB-MTB 中的表达，在 INH-MTB 中的表达分别是 RFP-MTB 的 1.39 倍，是 SM-MTB 的 2.83 倍，是 EB-MTB 的 3.43 倍，在 RFP-MTB 中的表达分别是 SM-MTB 的 2.04 倍，是 EB-MTB 的 2.47 倍，差异有统计学意义(P<0.05)；

(3) 结核分枝杆菌 PhoR 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 EB-MTB 中的表达与在 MDR 中的表达相比较，表达下调 0.36、0.54、0.35 和 0.19 倍，差异有统计学意义(P<0.05)。(表3-3、3-4)

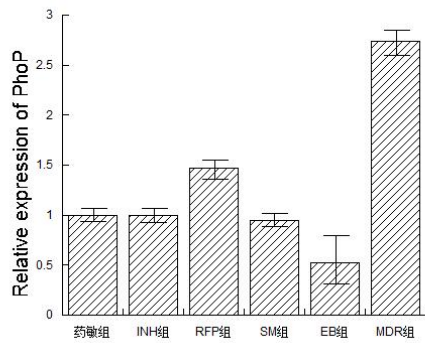


图 3-1 原始状态下 PhoP 基因的 mRNA 表达水平

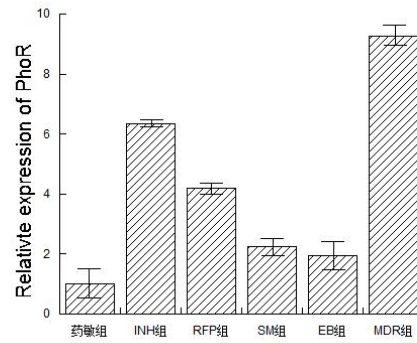


图 3-2 原始状态下 PhoR 基因的 mRNA 表达水平

表 3-1 PhoP 基因在不同菌株中的  $\Delta \Delta Ct$  检测结果  
Table 3-1 PhoP gene in different strains of  $\Delta \Delta Ct$  test results

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	-0.46 $\pm$ 0.07		
单纯耐 INH 菌株组	-0.46 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>		
单纯耐 RFP 菌株组	-1.02 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	39.641	0.000 < 0.05
单纯耐 SM 菌株组	-0.39 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>		
单纯耐 EB 菌株组	0.47 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>		
MDR 菌株组	-1.92 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>		

n=5。<sup>a</sup>P<0.05, 与药物敏感菌株组比较; <sup>b</sup>P<0.05, 与 MDR 菌株组比较

表 3-2 PhoP 基因在四组单纯耐药菌株中的  $\Delta \Delta Ct$  两两比较结果  
Table 3-2 PhoP gene in four group were resistant strains of  $\Delta \Delta Ct$  pairwise comparison results

组别	n	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Student-Newman-Keuls	单纯耐 RFP 菌株组	-1.0167		
	单纯耐 INH 菌株组		-0.4567	
	单纯耐 SM 菌株组		-0.3867	
	单纯耐 EB 菌株组			0.4667
Sig.		1.000	0.728	1.000

**表 3-3 PhoR 基因在不同菌株中的 $\Delta\Delta Ct$  检测结果**  
**Table 3-3 PhoR gene in different strains of  $\Delta\Delta Ct$  test results**

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	0.60 $\pm$ 0.93		
单纯耐 INH 菌株组	0.14 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>		
单纯耐 RFP 菌株组	-0.42 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	56.145	0.00<0.05
单纯耐 SM 菌株组	0.35 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>		
单纯耐 EB 菌株组	1.07 $\pm$ 0.94 <sup>ab</sup>		
MDR 菌株组	-1.32 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>		

n=5。<sup>a</sup>P<0.05, 与药物敏感菌株组比较; <sup>b</sup>P<0.05, 与 MDR 菌株组比较

**表 3-4 PhoR 基因在四组单纯耐药菌株中的 $\Delta\Delta Ct$  两两比较结果**  
**Table 3-4 PhoR gene in four group were resistant strains of  $\Delta\Delta Ct$  pairwise comparison results**

组别	n	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Student-Newman-Keuls	单纯耐 INH 菌株组	5	-2.8200	
	单纯耐 RFP 菌株组	5		-2.3467
	单纯耐 SM 菌株组	5		-1.3200
	单纯耐 EB 菌株组	5		-1.0433
Sig.		1.000	1.000	0.200

#### 四、抗结核药物的选择压力作用下, 各组结核分枝杆菌 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 的相对表达量

##### 1. 各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的 mRNA 水平的相对表达量

(1) 在低浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB, 与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, PhoP 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 2.19、2.04、1.72、2.73 倍, 差异有统计学意义(P<0.05); 在 EB-MTB 组中的表达下调 0.75, 差异无统计学意义(P>0.05);

(2) 在高浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB, 与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, PhoP 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB、EB-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 1.79、1.44、2.10、1.27和1.97倍, 差异有统计学意义(P<0.05);

(3) 在高浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB, 与低浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB 结核分枝杆菌相比, PhoP 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 MDR 组中的表达分别下调0.82、0.71、0.82和 0.72倍, 差异有统计学意义(P<0.05); 在 EB-MTB 组中的表达上调1.70倍, 差异无统计学意义(P>0.05)。(图3-3; 表3-5)

##### 2. 各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的 mRNA 水平的相对表达量

(1) 在低浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB, 与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, PhoR 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调

1.57、2.57、1.56和 2.83倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在 EB-MTB 组中的表达上调 1.11 倍,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );

(2) 在高浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB,与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比,PhoR 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 1.05、1.91、1.76和 2.13倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在 EB-MTB 组中的表达下调 0.74,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );

(3) 在高浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB,与低浓度抗结核药物条件下培养的各组 MTB 结核分枝杆菌相比,PhoR 基因在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 MDR 组中的表达分别下调 0.67、0.75、0.88和 0.59 倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在 EB-MTB 组中的表达上调1.10倍,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(图3-4; 表3-6)

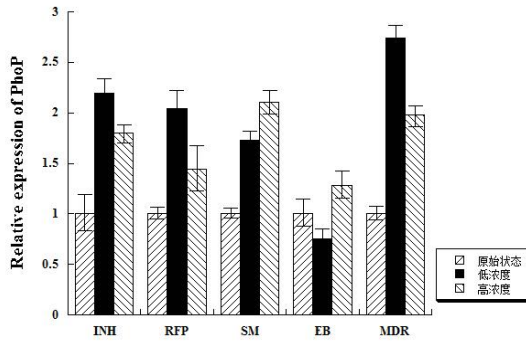


图 3-3 抗生素压力下 PhoP 基因的 mRNA 表达水平

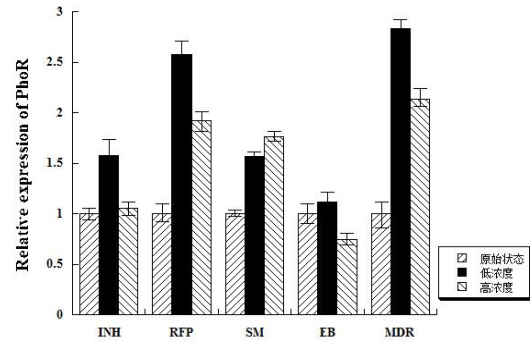


图 3-4 抗生素压力下 PhoR 基因的 mRNA 表达水平

表 3-5 PhoP 基因在不同菌株中的 $\Delta\Delta Ct$  检测结果

Table 3-5 PhoP gene in different strains of  $\Delta\Delta Ct$  test results

组别	INH	RFP	SM	EB	MDR
原始状态	1.14±0.32	-0.42±0.05	0.21±0.04	1.07±0.27	-0.98±0.06
低浓度	0.30±0.26	-0.94±0.32	-0.86±0.23	-0.71±0.15	-1.97±0.24
高浓度	-20.89±0.16	-1.45±0.44	-0.58±0.18	1.48±0.27	-2.44±0.21
P	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

表 3-6 PhoR 基因在不同菌株中的 $\Delta\Delta Ct$  检测结果

Table 3-6 PhoR gene in different strains of  $\Delta\Delta Ct$  test results

组别	INH	RFP	SM	EB	MDR
原始状态	-2.46±0.11	-1.98±0.18	-0.96±0.01	-0.68±0.21	0.69±0.24
低浓度	-2.53±0.33	-2.92±0.28	-1.78±0.05	-0.25±0.22	0.07±0.21
高浓度	-3.11±0.12	-3.35±0.22	-1.61±0.08	-0.83±0.09	-0.81±0.18
P	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

## 五、在复制的各组结核分枝杆菌感染小鼠动物模型的肺脏、肝脏和脾脏内, 各组结核分枝杆菌 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 的相对表达量

### 1. 各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的 mRNA 水平的相对表达量

(1) 在肺脏中各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的相对表达量与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, 在 RFP-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 1.59 和 1.40 倍, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图3-5);

(2) 在肝脏中各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的相对表达量与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, 在 RFP-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 1.25 和 1.62 倍, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图3-7);

(3) 在脾脏中各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的相对表达量与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, 在 MDR 组中的表达分别上调 1.21 倍, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图3-9)。

### 2. 各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的 mRNA 水平的相对表达量

(1) 在肺脏中各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的相对表达量与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, 在 INH-MTB、RFP-MTB、EB-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 1.24、1.64、1.27 和 1.50 倍, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图3-6);

(2) 在肝脏中各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的相对表达量与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, 在 INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 1.40、1.26 和 1.58 倍, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图3-8);

(3) 在脾脏中各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的相对表达量与原始状态下结核分枝杆菌临床分离株相比, 在 RFP-MTB、EB-MTB 和 MDR 组中的表达分别上调 1.59、1.32 和 1.43 倍, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ) (图3-10)。

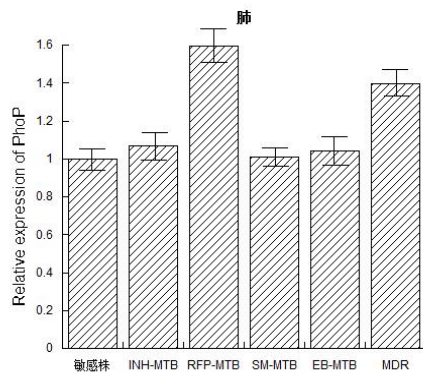


图 3-5 肺脏中各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的 mRNA 表达水平

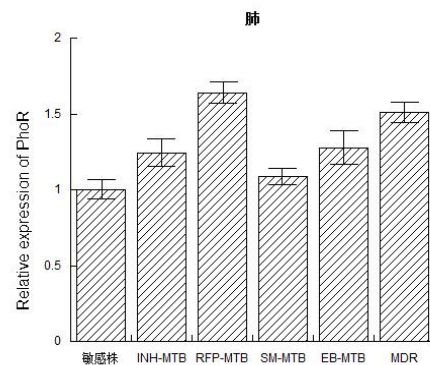


图 3-6 肺脏中各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的 mRNA 表达水平

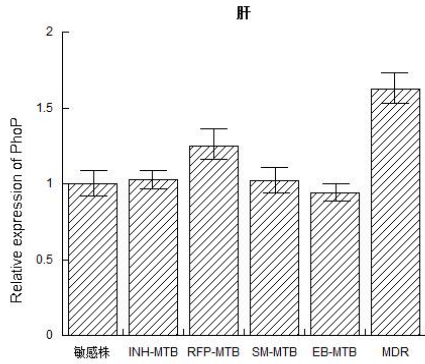


图 3-7 肝脏中各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的 mRNA 表达水平

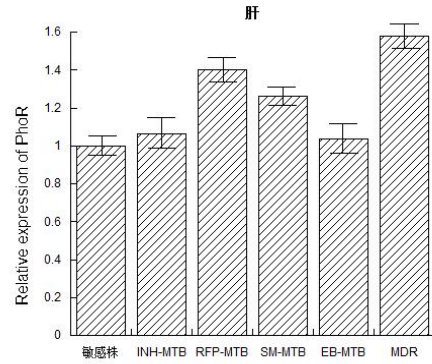


图 3-8 肝脏中各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的 mRNA 表达水平

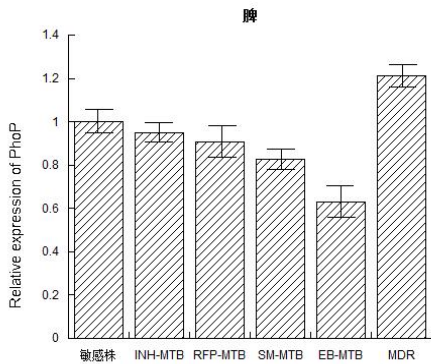


图 3-9 脾脏中各组结核分枝杆菌 PhoP 基因的 mRNA 表达水平

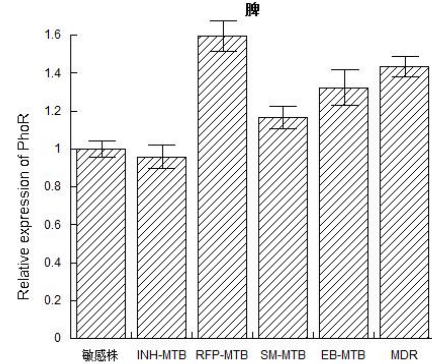


图 3-10 脾脏中各组结核分枝杆菌 PhoR 基因的 mRNA 表达水平

表 3-7 在肺脏中 PhoP 基因的  $\Delta\Delta Ct$  检测结果

Table 3-7  $\Delta\Delta Ct$  test results of PhoP gene in lung

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	-0.03 $\pm$ 0.23	14.04	0.017 < 0.05
单纯耐 INH 菌株组	-0.13 $\pm$ 0.38		
单纯耐 RFP 菌株组	-1.70 $\pm$ 0.20*		
单纯耐 SM 菌株组	-0.29 $\pm$ 0.15		
单纯耐 EB 菌株组	-0.09 $\pm$ 0.22		
MDR 菌株组	-0.51 $\pm$ 0.26*		

n=5。\*P<0.05, 与药物敏感菌株组比较

**表 3-8 在肝脏中 PhoP 基因的 $\Delta\Delta$  Ct 检测结果**  
**Table 3-8  $\Delta\Delta$  Ct test results of PhoP gene in liver**

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	0.33 $\pm$ 0.09	26.907	0.047<0.05
单纯耐 INH 菌株组	0.19 $\pm$ 0.37		
单纯耐 RFP 菌株组	0.28 $\pm$ 0.11*		
单纯耐 SM 菌株组	0.23 $\pm$ 0.36		
单纯耐 EB 菌株组	-0.56 $\pm$ 0.18		
MDR 菌株组	0.14 $\pm$ 0.26*		

n=5。\*P<0.05，与药物敏感菌株组比较

**表 3-9 在脾脏中 PhoP 基因的 $\Delta\Delta$  Ct 检测结果**  
**Table 3-9  $\Delta\Delta$  Ct test results of PhoP gene in spleen**

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	-0.29 $\pm$ 0.02	18.86	0.015<0.05
单纯耐 INH 菌株组	0.05 $\pm$ 0.41		
单纯耐 RFP 菌株组	0.12 $\pm$ 0.69		
单纯耐 SM 菌株组	0.25 $\pm$ 0.24		
单纯耐 EB 菌株组	0.65 $\pm$ 0.17		
MDR 菌株组	-0.30 $\pm$ 0.22*		

n=5。\*P<0.05，与药物敏感菌株组比较

**表 3-10 在肺脏中 PhoR 基因的 $\Delta\Delta$  Ct 检测结果**  
**Table 3-10  $\Delta\Delta$  Ct test results of PhoP gene in lung**

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	-1.02 $\pm$ 0.13	47.68	0.0309<0.05
单纯耐 INH 菌株组	-0.34 $\pm$ 0.05*		
单纯耐 RFP 菌株组	-0.73 $\pm$ 0.22*		
单纯耐 SM 菌株组	-0.14 $\pm$ 0.21		
单纯耐 EB 菌株组	0.57 $\pm$ 0.13*		
MDR 菌株组	1.61 $\pm$ 0.36*		

n=5。\*P<0.05，与药物敏感菌株组比较

**表 3-11 在肝脏中 PhoR 基因的 $\Delta\Delta$  Ct 检测结果**  
**Table 3-11  $\Delta\Delta$  Ct test results of PhoP gene in liver**

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	-0.55 $\pm$ 0.41		
单纯耐 INH 菌株组	0.96 $\pm$ 0.33*		
单纯耐 RFP 菌株组	-0.81 $\pm$ 0.16*	28.91	0.014 < 0.05
单纯耐 SM 菌株组	-0.52 $\pm$ 0.29*		
单纯耐 EB 菌株组	1.13 $\pm$ 0.17		
MDR 菌株组	-0.47 $\pm$ 0.31*		

n=5。\*P<0.05, 与药物敏感菌株组比较

**表 3-12 在脾脏中 PhoR 基因的 $\Delta\Delta$  Ct 检测结果**  
**Table 3-12  $\Delta\Delta$  Ct test results of PhoP gene in spleen**

组别	均值 $\pm$ 标准差	One-Way ANOVA F 值	P 值
敏感菌株组	-0.22 $\pm$ 0.19		
单纯耐 INH 菌株组	-0.59 $\pm$ 0.66		
单纯耐 RFP 菌株组	-0.89 $\pm$ 0.21*	21.48	0.007 < 0.05
单纯耐 SM 菌株组	-0.44 $\pm$ 0.17		
单纯耐 EB 菌株组	-0.62 $\pm$ 0.04*		
MDR 菌株组	-1.25 $\pm$ 0.43*		

n=5。\*P<0.05, 与药物敏感菌株组比较

## 讨 论 (Discussions)

双组分系统最初是由 NINFA 和 MAGASNIK 在研究大肠埃希菌氮调节蛋白系统时发现的一种跨膜信号转导系统。研究发现, TCS 广泛存在于细菌、真菌、致病性酵母、阿米巴原虫及一些植物中, 是生物基本的感应外界环境变化, 并做出相应反应的调控系统。抗生素也是一种环境刺激信号, 这就意味着细菌存在着使细菌适应抗生素环境的双组分系统, 大肠杆菌基因组分析显示其至少存在 30 个 TCS, 而其中有 15 个双组分系统反应调节子的过表达与大肠杆菌耐药有关<sup>[16,17]</sup>。其他细菌中也存在与大肠杆菌类似的可以引起细菌耐药甚至耐多药的双组分系统。

目前研究发现, 结核分枝杆菌全基因组共编码11个完整的双组分系统。结核分枝杆菌 DevRS(DosRS) 双组分系统在氧化应激与低氧时被激活, 控制整体反应, 是在缺氧时诱导结核分枝杆菌休眠反应的主要调节系统<sup>[18]</sup>。结核分枝杆菌 MprAB 双组分系统是结核分枝杆菌在滞留状态下胞内生存所必需的, 调控结核分枝杆菌中大量应激反应基因的表达<sup>[19]</sup>。Parish 等<sup>[20]</sup>发现可能被 RegX3 调控的基因有 50 多个, 但大多数基因的功能还未知, 也未检测到上游的调节序列, 推测 RegX3-SenX3 双组分系统可能与结核分枝杆菌的毒力相关。

结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统是结核分枝杆菌编码的 11 个完整的双组分系统中最基本、最重要的调节系统。它可以感应外界环境变化, 并做出相应反应的调控, 能够使结核分枝杆菌更好的适应宿主微环境变化, 以及协助结核分枝杆菌逃避宿主的免疫监视和杀灭, 促使其在宿主体内生存、繁殖、致病等。同时对结核分枝杆菌在宿主体内的生长、分化、代谢、渗透调节、繁殖、毒性、趋化性、变异性、致病性等方面发挥着重要的调控作用<sup>[21,22]</sup>。此外, 在结核分枝杆菌敲除 PhoPR 双组分系统菌株中, 菌落形态、索状因子性质及对碱性染料中性红的反应等都有显著改变<sup>[23,24]</sup>。结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统缺失突变株的性质改变可能与结核分枝杆菌细胞外膜成分的改变有关<sup>[25]</sup>。双组分系统是通过感受外界环境的刺激来调控基因的表达, 以此来适应环境的变化。Walters 等<sup>[26]</sup>发现结核分枝杆菌 PhoP 突变株不能在低浓度的  $Mg^{2+}$  条件下生长。通过分析结核分枝杆菌国际标准强毒株 H37Rv 株和其 PhoP 突变株在高、低浓度  $Mg^{2+}$  中的生长情况, 结果表明与镁转运有关基因的表达在不同浓度中没有差别, 结核分枝杆菌 PhoP 突变株的生长需要高浓度  $Mg^{2+}$  的原因尚不清楚, 可能与镁离子能稳定受损的细胞膜结构有关<sup>[27]</sup>。细胞壁或细胞膜的结构改变使 PhoR 感受信号, 对外界环境的刺激作出反应<sup>[28]</sup>。

细菌耐药的机制主要有以下四种: ①通过产生降解或灭活酶类改变药物的化学结构; ②通过自身成分阻止药物到达细菌体内; ③通过改变细菌体内药物作用的靶点; ④通过主动外排, 将已经进入菌体内的药物泵至菌体外, 使菌体内抗菌药物蓄积减少。结核分枝杆菌有特殊的多脂质的细胞壁, 使得许多药物不能进入其体内, 这是其对许多非

抗结核药物耐药的原因。结核分枝杆菌也产生  $\beta$ -内酰胺酶，使其对  $\beta$ -内酰胺类抗生素敏感性变得较差，结核分枝杆菌是否还产生其他的药物失活酶，尚缺乏相关的研究。近期的研究结果显示，结核分枝杆菌对常见的几种抗结核药物的耐药机制主要是第三种，即结核分枝杆菌主要通过改变菌体内药物作用的靶位而产生耐药，而药物作用靶位的改变可由相应的基因突变引起。

本研究结果显示，在原始状态下，与药物敏感菌株相比，PhoR 基因在四组单纯耐药菌株组均有明显的上调表达，且在四种单一耐药菌株组中 mRNA 的上调表达水平不同，这可能与 PhoR 基因编码的组氨酸激酶感应蛋白 HK 接受外界环境的刺激并调控基因的表达有关。HK 蛋白包括一个输入结构域 (input domain)，通常与膜结合负责感应外界信号。当收到外界信号刺激时，HK 的激酶结构域被激活使保守的组氨酸残基发生依赖于 ATP 的自磷酸化，HK 再将磷酸基团传递给 RR 保守的天冬氨酸残基。细胞壁或细胞膜的结构改变使 PhoR 感受信号，对外界环境的刺激作出反应<sup>[28]</sup>。PhoR 基因编码的 HK 蛋白作为 MTB 感受外界环境变化的主要感应元件。当致病性 MTB 侵入机体并被巨噬细胞吞噬，MTB 对宿主微环境的感知主要是通过 PhoR 感受器实现的，而目前在临床上对致病性 MTB 引起的结核病的治疗，主要是通过使用一线抗结核药物来杀伤 MTB 来达到治疗目的。抗结核药物及其药物浓度的不同对结核分枝杆菌生存的微环境来说也是一种环境刺激因素，并且抗结核药物成为 PhoR 调节 MTB 适应外界环境的一个重要刺激因子。但由于临床上病人对抗结核药物治疗的依从性不高，使得药物对 MTB 的杀伤作用不彻底，这有可能是由于 MTB PhoR 对自身细胞壁或细胞膜结构的调节抵抗抗结核药物的杀伤作用的结果。我们的实验结果表明，各耐药菌株中的 PhoR mRNA 表达水平较敏感菌株均有显著增高，且四种单一耐药菌株组中 mRNA 的增高水平不同，提示 MTB 的 PhoR 对不同抗结核药物的刺激敏感程度不同，其抵抗不同抗结核药物的杀伤作用的效果也不同，并有可能通过调节抗结核药物的作用靶点，使得抗菌药物不能发挥杀菌作用，促使了细菌耐药的形成。但是对于 PhoR 调控药物作用靶点改变的可能机制仍不清楚，还需要进一步研究。

本研究还发现，在原始状态下，与药物敏感菌株相比，PhoP 基因、PhoR 基因在耐多药菌株组表达均有明显的上调，可能是 PhoP 基因和 PhoR 基因两者同时发挥作用的结果。其引起耐药的机制是可能是 PhoPR 双组分系统通过调控一个或多个药物外排泵基因的表达改变，以及通过调控细菌壁通透性，使药物外排或不能进入细胞发挥作用，最终导致细菌耐药。目前已有研究证明细菌的 TCS 与细菌的耐药，甚至是耐多药存在密切关系。

对实验结果比较分析发现，结核分枝杆菌耐一线抗结核药物菌株在低浓度抗结核药物 (INH, REP, SM) 的作用下，PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平均较原始状态下表达上调。表明在抗结核药物的作用下，MTB 通过自身的调控系统感知到外界环境变化，而抗结核药物的存在对 MTB 而言是一种不利的生存环境刺激，其为了应对这些不利的生存环境，可通过调控 PhoR 基因的 mRNA 表达水平上调来转录更多的 HK

蛋白, 增加细胞膜上 HK 的分布密度, 这样可促使 MTB 及时感应外界不利环境变化, 同时调控 PhoP 基因 mRNA 表达水平上调来转录更多的 RR 蛋白, 该蛋白可以调控 MTB 中相应的靶基因表达, 促使靶蛋白及底物蛋白表达水平上调, 而这些靶蛋白可能在细菌的耐药方面具有重要作用。有研究表明, MTB 耐药与细菌的外排泵有关。细菌外排泵是一类位于细胞膜上的活化转运蛋白, 其可以将胞浆内物质转运到细胞外, 其在细菌对抗结核药物抵抗中发挥了主要作用。在 Pang 等人<sup>[29]</sup>对利福平单耐药机制在结核分枝杆菌的研究中, 通过构建了缺失 RpoB 基因的利福平耐药突变株, 利用该单耐药菌株来确定对利福平特异的外排泵基因。对 DNA 序列和最低抑菌浓度的数据分析显示, 该突变株有更高水平的耐药, 三维结构模型进一步证明利福平单耐药突变株与 RpoB 基因突变株的亲合力与相应的分离株的耐药水平一致。并且对非突变分离株在转录水平进行分析提示有三个外排泵基因 (Rv0783、Rv2936、Rv0933) 可能参与了细菌对利福平的外排。而在 Rodrigues 等人<sup>[30]</sup>对 Mmr 基因外排泵在结核分枝杆菌耐药作用的研究表明, 结核分枝杆菌在异烟肼存在的状态下, 外排泵 Mmr 基因显著过表达。而结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统调控了结核分枝杆菌全基因组中 2% 的基因的表达<sup>[31]</sup>, 在细菌的耐药性的产生中具有重要作用。因此认为结核分枝杆菌在低浓度抗结核分枝杆菌药物的作用下, 其 PhoPR 双组分系统中 PhoP 基因和 PhoR 基因在 mRNA 水平上表达出现了上调, 可能与细菌的耐药存在一定的相关性。而对于结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统是否对相关的外排泵基因存在调控作用, 仍需要进一步研究。

在耐多药结核分枝杆菌中, PhoPR 双组分系统中的 PhoP 基因、PhoR 基因表达水平在低浓度抗结核药物较原始状态的表达均上调, 可能与耐多药菌在抗结核药物的作用下, 细菌对抗结核药物的敏感性增加有关, 这个变化可使细菌的 PhoPR 双组分系统做出合理的调控应答: 调控细胞壁相关脂质合成基因的表达, 增加细胞膜上外排泵蛋白, 从而有利于细菌在不利的环境中生存。

为了进一步探讨 MTB 在不同浓度抗结核药物作用下, 结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统中 PhoP 基因、PhoR 基因的表达是否存在差异, 以及这种差异是否与耐药结核分枝杆菌的耐药性存在相关性。我们将各耐药菌株在不同浓度的抗结核药物的培养基上进行培养。在对各耐药菌株在经过高、低浓度抗结核药物的培养基培养后的比较中发现, 结核分枝杆菌耐药菌株在低浓度抗结核药物 (INH, REP, SM) 的作用下, PhoPR 双组分系统中的 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平均较高浓度抗结核药物下表达增加, 这可能与细菌感受外界抗结核药物的敏感性增强有关, 在低浓度抗结核药物时, 细菌对周围环境的变化的感知处于高敏感性, PhoPR 双组分系统能够调控相关的基因高表达, 来应对不利环境的影响。而在高浓度抗结核药物时, PhoPR 双组分系统中的 PhoP 基因和 PhoR 基因的 mRNA 表达水平均较高浓度抗结核药物时表达减低, 但是仍比原始状态表达水平高。可能与结核分枝杆菌对高浓度抗结核药物的耐受性有关。有研究认为, 当结核分枝杆菌遇到恶劣的生存环境时, 可以进入休眠状态, 而在这个状态下的结核分枝杆菌可以降低自身的新陈代谢<sup>[32]</sup>。而对 MTB 在高浓度抗结核药物作用下, 细菌的细胞

膜结构可以发生改变,对生存必需的物质摄入减少(如氧气)<sup>[33]</sup>,这可使细菌胞内的氧浓度降低,造成 MTB 处于缺氧状态。而结核分枝杆菌 PhoPR 双组分调控系统可以感知到细菌的缺氧状态,其中 PhoP 基因表达上调并调控 DosR (Rv3133) 的表达<sup>[34]</sup>。而 DosR(DevR)作为 DosR-DosS(也称为 DevR-DevS)双组分的主要调节子,参与了 MTB 在潜在宿主体内对不利的生存环境信号(缺氧、活性氮、一氧化碳等)的适应应答<sup>[35-38]</sup>,并且可以调控 47 个基因表达<sup>[39]</sup>,这些基因表达使 MTB 在缺氧等不利的环境下维持生存。有学者研究认为,MTB 在缺氧状态下能够促使其处于休眠状态,而休眠的 MTB 能够对多种一线抗生素产生惰性,提示其可能与耐药有关,或者是其介导的早期的休眠状态与耐药有关<sup>[40]</sup>。因此认为,PhoPR 双组分调控系统在细菌处于低浓度抗结核药物和高浓度抗结核药物状态下时,可能都发挥了调控作用,并且这些调控都是有利的细菌更好的生存下来的必需方式,而这也与细菌的对各种抗结核药物的耐药性存在一定的关联。

通过构建结核分枝杆菌感染的动物模型发现,与药物敏感菌株相比,PhoP 基因在单纯耐利福平菌株组中和耐多药菌株组表达均有明显的上调表达,这个结果提示耐利福平菌株和耐多药菌株与药物敏感菌株比较,其对抗结核药物的敏感性增强,并且经过动物实验后单纯耐利福平菌株和耐多药菌株中 PhoP 基因表达水平上调,说明了这些菌株对其小鼠体内内环境的细微变化具有感知能力,并且在不同脏器中不同耐药菌株中的 PhoP 基因的表达存在差异。而导致这些菌株适应环境变化能力增强的原因可能与细菌中的 PhoPR 双组份系统所发挥的适应性调控作用有关。目前认为细菌耐药性的产生与细菌的耐药基因产生有关,而从结核分枝杆菌本身而言,其自身的调控系统中基因表达水平的变化对细菌在抗结核药物存在的环境下能够适应性生存所发挥的作用与细菌的耐药性基因的表达是否存在相关性,仍需要进一步研究。

通过构建结核分枝杆菌感染的动物模型还发现,与药物敏感菌株相比,PhoR 基因在几乎所有的单纯耐菌株组中和耐多药菌株组表达均有明显的上调表达,揭示了不同耐药结核分枝杆菌在经动物实验后,其细菌的耐药性产生了差异性变化,而这个差异性的变化具体体现在 PhoR 基因表达存在差异。PhoR 基因是双组份系统中一个重要的调控元件,其表达水平的变化对细菌在抗结核药物存在的环境下的生存具有重要的调控作用,而这个调控的结果是促进了耐药细菌能够在抗结核药物存在环境中更好的生存。但是对于 PhoPR 双组份系统在耐药菌中的调控作用是否伴有相关耐药基因的高表达以及与细菌中的其他调控系统共同发挥作用,还需要进一步研究。

目前研究结果显示,PhoPR 双组分系统对 MTB 的毒力及持留性;对 MTB 在宿主细胞内生存;对 MTB 毒力相关 RD1 区域及 ESAT-6 的分泌;以及对 MTB 的脂类代谢等方面均有重要的调控作用<sup>[1,14]</sup>。至于其与耐药的关系如何,目前尚不十分清楚。本研究结果提示在药物敏感菌株和耐药菌株组中 PhoP 基因和 PhoR 基因的表达具有差异,MTB PhoPR 双组分系统与新疆地区广泛流行的耐药结核分枝杆菌耐药性可能具有相关性,提示 PhoP 基因和 PhoR 基因差异表达可能是 MTB 耐药的重要机制之一,可为新型抗结核药物的研制提供理论依据。

## 结 论

### ( Conclusion )

- 1、在结核分枝杆菌临床分离药物敏感菌株、INH-MTB、RFP-MTB、SM-MTB、EB-MTB和MDR中，结核分枝杆菌PhoP和PhoR基因的表达有差异；
- 2、在抗结核药物（INH、RFP、SM、EB）选择压力作用下，各组耐药结核分枝杆菌临床分离株的PhoP基因和PhoR基因的mRNA表达水平比各组结核分枝杆菌在原始状态下显著升高；
- 3、在各组结核分枝杆菌感染小鼠动物模型的肺脏、肝脏和脾脏内，各组耐药结核分枝杆菌临床分离株的PhoP基因和PhoR基因的mRNA表达水平比各组结核分枝杆菌在原始状态下显著升高；

综上所述：结核分枝杆菌PhoPR双组分系统与新疆地区广泛流行的耐药结核分枝杆菌的耐药性具有相关性。

## 参考文献

### (References)

1. Sharma SK, Mohan A. Multidrug resistant tuberculosis [J]. Indian J Med Res, 2004,120:354.
2. Brown TJ, Herrera-Leon L, Ant hony RM, etal. The use of macro arrays for the identification of MDR Mycobacterium tuberculosis [J]. J Microbial Methods, 2006, 65: 294.
3. Sreevatan S, Pan X, Zhan f Y, etal. Analysis of theoxy rahp cregioninisonizad resisitant and susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased human sand animal sindiverse localities [J]. Antimicrobial Agents Chemother, 1997, 41(10): 600.
4. Malhotra V, Tyagi JS, Clark-Curtiss JE. DevR-mediated adaptive response in Mycobacterium tuberculosis H37Ra: links to as paragine metabolism (J. Tuberculosis (Edinb), 2009, 89(2):169-174.
5. Kumar A, Deshane JS, Crossman DK.etal. Heme Oxygenase-1-derived Carbon Monoxide Induces the Mycobacterium tuberculosis Dormancy Regulon [J]. J Biol Chem. 2008, 283 (26):18032-18039.
6. Gonzalo Ascension JC, Maia C, Ferrer NL, etal. The virulence associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polypeptide derived lipids in Mycobacterium tuberculosis [J]. Boil Chem, 2006, 281: 1313- 6.
7. Johnson R, Stretcher EM, Louw GE, etal. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Boil, 2008, 8: 97.
8. Chesne Seck M L, Barilone N, Boudou F, etal. A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polypeptide derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in Mycobacterium tuberculosis H37Ra [J] . Bacterial, 2008, 190: 1329- 34.
9. Martinez-Hackert E, Stock AM. S structural relationships in them pry family of winged-helix trans cription factors [J]. Mol Biol, 1997, 269301-12.
10. Jain S K, Paul-Satyaseela M, Lamichhane G, etal. Mycobacterium tuberculosis invasion and traversal across an in vitro human blood brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis [J]. J Infect Dis, 2006, 193(9):1287-1295.
11. Pang Z, Howard ST. Regulation of the  $\alpha$ -Crystallin Gene *acr2* by the MprAB two-component system of Mycobacterium tuberculosis [J]. J Bacterial, 2007, 189(17):6213.
12. Ewann F, Jackson M, Pethe K, etal .Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immune, 2002, 70(5):2256-2263.
13. Parish T, Smith DA, Roberts G, et al. The *senX3 regX3* two component regulatory system of Mycobacterium tuberculosis is required for virulence [J]. Microbiology, 2003,

- 149 (6): 1423-1435.
14. 中国防痨协会.结核菌诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志, 1996,18(1):18-31
  15. World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis, Geneva[R]. WHO/CDS/TB/2003.320. World Health Organization. Policy guidance on drug-susceptibility testing(DST) of second-line anti-tuberculosis drugs[R]. Geneva. WHO/CDS/TB/2008.392.
  16. Piddick LJ. Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006. 4: 629-636.
  17. Kunihiko N, Tammy L, Eduardo A G. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology*[J]. 2006, 59(1):126-141.
  18. Fallow A, Domenech P, Reed MB. Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of *Mycobacterium tuberculosis* are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants[J]. *J Bacteriol*. 2010, 192(8):2228-2238.
  19. Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, et al. The W-Beijing line-age of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated[J]. *Bacteriol*, 2007, 189(7):2583-2589.
  20. Stanley SA, Johndrow JE, Manzanillo P, et al. The type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis[J]. *J Immunol*, 2007, 178(5):3143-3152.
  21. Fontan P, Aris V, Ghanny S, et al. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection[J]. *Infect Immun*, 2008, 76(2):717-725.
  22. Tailleux L, Waddell SJ, Pelizzola M, et al. Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(1): 1403.
  23. He H, Zahrt TC. Identification and characterization of a regulatory sequence recognized by *Mycobacterium tuberculosis* persistence regulator MprA[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(1):202-212.
  24. Sureka K, Ghosh B, Dasgupta A, et al. Positive feedback and noise activate the stringent response regulator rel in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(3): 1771.
  25. *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(13): 4602-4607.
  26. Jain SK, Paul-Satyaseela M, Lamichhane G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* invasion and traversal across an in vitro human blood brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis[J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(9):1287-1295.
  27. Pang Z, Howard ST. Regulation of the  $\alpha$ -Crystallin Gene *acr2* by the MprAB two-component system of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(17):6213.
  28. Ewann F, Jackson M, Pethe K, et al. Transient requirement of the PrrA-PrrB

- two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Immun*, 2002 ,70(5):2256-2263.
29. Pang Y, Lu J,Wang Y, et al. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;2013 Feb;57(2):893-900
  30. Rodrigues L, Villellas C, Bailo R, et al. Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;2013 Feb;57(2):751-757
  31. Mena C, Christophe T, Amine N, et al. Identification of DNA Binding Motifs of the *Mycobacterium tuberculosis* PhoP/PhoR Two-Component Signal Transduction System[J]. *Plos One*;2012 ,7(8),e42876.
  32. Jesús GA, Serge M, Jose HW, et al, PhoP: A Missing Piece in the Intricate Puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence[J]. *PLoS ONE*,2008,3(10):e3496.
  33. Tahlan K, Wilson R, Kastrinsky DB, et al. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;2012 Apr;56(4):1797-809
  34. Park HD, Guinn KM, Harell MI, et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Mol Microbiol*,2003;48:833-843.
  35. Martin I. V, Dirk S, Kevin C. V, et al. Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program[J]. *J Exp Med*; 2003;198:705-713.
  36. Kumar A, Deshane JS, Crossman DK, et al. Heme Oxygenase-1-derived Carbon Monoxide Induces the *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Regulon[J]. *J Biol Chem*;2008,283:18032-18039.
  37. Taneja NK, Dhingra S, Mittal A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Transcriptional Adaptation, Growth Arrest and Dormancy Phenotype Development Is Triggered by Vitamin C[J]. *Plos One*,2010,5:e10860.
  38. Chauhan S, Sharma D, Singh A, et al. Comprehensive insights into *Mycobacterium tuberculosis* DevR (DosR) regulon activation switch[J]. *Nucleic Acids Res*,2011,39:7400-7414.
  39. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J]. *Nature*,1998,393:537-544.
  40. Saini DK, Malhotra V, Dey D, et al. DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR [J]. *Microbiology*, 2004, 150(4): 865-75.

## 文献综述

### (Review)

## 双组分系统与结核杆菌致病性的相关性的研究进展

双组分系统是结核分枝杆菌感应体内外环境变化,适应宿主微环境,从而做出相应反应并得以生存的重要的调控系统。关于双组分系统与结核杆菌毒力、休眠、持留性、药物靶标和新型疫苗等致病性因素的是否具有相关性,目前尚无详细报道,本文目的是讨论双组分信号转导系统的机制,探究双组分系统与结核杆菌致病性的相关性,为进一步开发高效、安全的疫苗以及寻找新的抗结核药物的分子靶位提供了新的依据。

### 1 结核病的发病机制

结核病的病原菌——结核杆菌是典型的胞内致病菌,通过进化获得一系列毒力成分,又通过多种机制抑制宿主免疫应答,逃逸免疫监视,导致结核病的发生。近年来的研究发现结核病可能的发病机制主要有以下几种<sup>[1]</sup>:①MTB 与 Toll 样受体结合,引起抗炎效应;②MTB 胞壁成分与树突状细胞表面受体结合,抑制树突状细胞成熟,使其无法激活初始 T 细胞;③MTB 通过抑制吞噬溶酶体成熟,来避免融解和杀灭;④MTB 通过限制抗原提呈来阻止过度炎症反应;⑤MTB 抑制  $\gamma$ -干扰素信号转导,下调活化巨噬细胞杀灭 MTB 的活性;⑥抑制巨噬细胞凋亡,避免重新受到免疫攻击;⑦MTB 分泌复苏促进因子,对 MTB 的潜伏感染和再活化有重要作用等。但结核病的确切的发病机制尚不清楚,这给结核病的有效防治造成了极大困难。

### 2 双组分系统 (TCS)

Ninfa 和 Magasnik 于 1986 年在研究大肠埃希菌氮调节蛋白时,首次发现了双组分系统,随后研究者发现 TCS 广泛存在于细菌、真菌、致病性酵母、阿米巴原虫及一些植物中<sup>[2]</sup>,是生物基本的感应外界环境变化,并做出相应反应的调控系统。目前研究发现,结核杆菌全基因组共编码 12 个完整的双组分系统,分别为: DosS/DosT-DosR、PhoP-PhoR、MprA-MprB、PrrA-PrrB、senX3-regX3、TrcR-TrcS 等, TcrX-TcrY 双组分系统是最近被发现的结核杆菌中的第十二个双组分系统。

#### 2.1 双组分系统的组成

典型的双组分系统由感应输入信号的组氨酸激酶蛋白(Histidine kinase, HK)和用于调节输出信号的反应调控蛋白(Response regulator, RR)组成。组氨酸激酶蛋白(HK)是结核杆菌感应各种环境变化必需的,主要负责检测和编码输入信息,含有 2 个功能域,一个传感器结构域(sensor domain)和一个传递器结构域(transmitter domain),两个跨膜结构域通过一个  $\alpha$ -螺旋相连。HK 的传感器结构域能感应环境变化,并将信号传递到细胞质传递器催化结构域。反应调控蛋白(RR)是双组分信号转导系统中的第二个组分,主要负责输出信息。RR 含有一个或多个保守的 N 端输入结构域和可变的 C 端输出结构域。除此之外,还有一个含有 His 残基的磷酸转移蛋白(His-containing phosphotransfer, HPt)在从

HK 转移磷酸基团到 RR 的过程中具有重要的作用<sup>[3]</sup>。研究结果表明许多双组分系统含有额外的调节伴侣蛋白<sup>[4]</sup>。双组分系统信号的终止大部分是通过反应调控蛋白去磷酸化完成的，反应调控蛋白含有一个高度保守的激活位点，执行磷酸化功能。有四种不同类型的辅助磷酸酶被证实：CheZ, CheC/CheX/FliY, Spo0E 和 Rap<sup>[5]</sup>。

## 2.2 双组分系统反应原理

几乎所有细菌都利用磷酸化介导的信号转导机制来应对代谢，以及环境和细胞周期等变化。在结核杆菌中，蛋白质的磷酸化修饰主要通过 3 种机制影响着蛋白质的功能：①ATP 或 GTP 依赖的蛋白质磷酸化修饰；②双组分磷酸化修饰；③磷酸化丙酮酸(PEP)。结核杆菌利用双组分信号转导系统的两种蛋白通过磷酸转移应对多种环境变化、代谢和细胞周期信号，即通过传感器组氨酸激酶蛋白和反应调控蛋白之间的识别和磷酸转移实现的。双组分蛋白结构域的联合晶体结构显示，蛋白表面的可变残基负责信号转移时特异性相互作用<sup>[6]</sup>。HK 感知胞外刺激自磷酸化后，将一个磷酰基转移到 RR 上，接着 RR 再引发下游通路的特异反应。RR 然后通过构象的改变调节基因的表达和蛋白的功能，RR 的磷酸化水平控制其活性。

## 2.3 双组分系统的功能

目前研究发现，结核杆菌中含有 12 套双组分系统来应对各种环境的变化，双组分系统可以感应宿主微环境的 pH，养分，氧化还原状态，渗透压力和抗生素等，此外，一些双组分系统也能控制对细胞生长、毒力、生物膜和群体感应等有重要作用的基因簇。HK 作为感受器，能感知外界环境(如缺少碳、氮和镁离子，渗透压改变或者其他的刺激)的细微的变化进而调控不同基因的表达，与一些特殊致病菌的致病性有密切的关系。

## 3. 双组分系统与结核杆菌致病性的相关性

### 3.1 双组分系统与结核杆菌毒力相关

结核杆菌双组分系统 senX3-regX3 与结核杆菌的毒力相关。Tanya Parish 等的研究发现，构建的 senX3-regX3 缺失株巨噬细胞和小鼠中均表现出显著的毒力下降。全基因组微阵列分析证实了在突变株中的差异基因有表达，同时还发现了 senX3-regX3 可以调控的下游基因有 50 多个，功能大多尚不明确。

Shaun B. Walters 等<sup>[8]</sup>研究发现，结核分枝杆菌 PhoPR 双组分系统调节毒力基因和复合脂质的生物合成必不可少的。反应调节器 PhoP 正性调节毒力相关脂类(SL、DAT 和 PAT)的生物合成。RD1 是结核分枝杆菌毒力必需的基因区域，它出现在结核分枝杆菌复合群中，但在所有的 BCG 中缺失。PhoP 调节 RD1 区域中的许多基因表达，其中一些是与介导毒力密切相关的基因，而这些基因在 PhoP 缺失突变株中的表达下调可能是其毒力减弱的重要原因。

DosRS(DevRS)可能与 MTB 的毒力表型相关，DASGUPTA 等<sup>[9]</sup>通过抑制性消减杂交分析发现，Dos 在 H37Rv 毒力株中表达高于在减毒株 H37Ra。CONVERSE 等<sup>[10]</sup>的研究发现，经雾化吸入途径感染的 DosRS 缺失突变株的毒力均有不同程度的减弱，提示 DosRS 能增强 MTB 的致病力，可能是 MTB 的毒力因子之一。

### 3.2 双组分系统与结核杆菌适应外界环境相关

结核杆菌 PrrA-PrrB 双组分系统与结核杆菌适应外界环境有关，特别是在早期胞内增殖阶段发挥重要作用。PrrA 缺失突变株在早期感染时表现为胞内增殖缺陷，将野生型 prrA-prrB 基因克隆入 PrrA 缺失突变株能恢复其缺陷。但 PrrA 突变株缺陷是短暂的，一周后，这个菌株恢复增殖能力，且能达到和野生型相同的水平<sup>[11]</sup>。

PhoP 通过和 DosRS 双组分系统的 DosR 交互作用介导结核杆菌适应巨噬细胞内最初的缺氧条件，PhoP 基因调节 nuo 基因使结核杆菌呼吸功能从需氧呼吸向微需氧或无氧呼吸转变<sup>[12]</sup>，以适应在巨噬细胞中最初的低氧环境。此外，PhoP 控制编码丙氨酸脱氢酶的 Ald 基因的表达，丙氨酸脱氢酶对结核杆菌能在胞内生存具有重要作用。所有的 BCG 菌株中缺乏丙氨酸脱氢酶，这可能是限制 BCG 在宿主体内持续感染能力的原因之一<sup>[13]</sup>。

### 3.3 双组分系统与结核杆菌休眠相关

结核杆菌 DosRS 双组分系统中的 DosR 被认为在 MTB 潜伏中起重要作用，是调控 MTB 潜伏感染的关键因子之一。低氧是 MTB 潜伏感染局部微环境的主要特征之一。研究显示，DosRS 可在氧化应激与低氧时被激活，是低氧诱导分枝杆菌休眠反应中主要的调节系统<sup>[14]</sup>。低氧等的刺激因素可通过诱导 DosR 使 MTB 呈现一种休眠表型，SHERMAN 等<sup>[15]</sup>最初发现，敲除 DosR 编码基序上游的 Rv3134c 基因可导致低氧诱导作用的消失。他们证实了低浓度 NO 同样可诱导依赖 DosR 的 48 个基因表达，并将这些基因集合命名为休眠调节单元(dormancy regulon)或称 DosR 调节单元(DosR regulon)，它们的上调有利于 MTB 在体外培养条件下和小鼠体内长期休眠存活<sup>[16]</sup>。BOON 等<sup>[17]</sup>的研究也发现，敲除 DosR 编码基因后的卡介苗(BCG)无法适应并存活于低氧环境。尽管休眠调节单元在 MTB 的潜伏感染中起重要作用，但休眠调节单元的表达并不完全等同于 MTB 的“休眠反应”。

### 3.4 双组分系统与结核杆菌滞留性相关

结核杆菌 PhoPR 双组分系统 PhoP 与结核杆菌滞留性相关。Sharma 等<sup>[18]</sup>等研究发现，PhoP 基因对异柠檬酸裂解酶 (ICL) 的表达是负性调节的，ICL 在 PhoP 突变株的表达高于野生型。ICL 是结核分枝杆菌在巨噬细胞和小鼠体内滞留和保持毒力所必需的酶类。

MprA-MprB 双组分系统与结核杆菌在宿主内的滞留性和应激反应调节高度相关。在结核杆菌缺乏营养和缺氧时，MprAB 双组分系统被诱导表达。结核杆菌中应激信号途径与多聚磷酸酯(polyphosphate, poly P)、双组分反应调节器 MprAB、转录起始因子 SigE 及 Rel 相关。MprB 和 MprA 分别编码组氨酸激酶 MprB 和反应调节器 MprA。磷酸化的 MprA 调节转录起始因子 SigE 的转录，从而依次调节 Rel 的转录。Rel 已经被公认为是分枝杆菌属在压力环境下进入滞留状态的关键因子<sup>[19]</sup>。

### 3.5 双组分系统与结核杆菌药物靶标相关

结核杆菌 DosRS 双组分系统的 DosR 是一种潜在的抗结核药物靶标。通过 DNA 微

阵列分析 MTB 在各种潜伏感染模型下经多种环境刺激的转录结果显示, DosR 是 MTB 进入非复制状态的关键转录调控子, DosR 是一种潜在的抗结核药物靶标<sup>[20]</sup>。

### 3.6 双组分系统与结核杆菌新型疫苗相关

有学者<sup>[20,21]</sup>比较了编码不同休眠调节单元基因编码抗原的 DNA 疫苗免疫小鼠的免疫原性, 结果大多数抗原可诱导出较强的体液免疫或细胞免疫应答。另外, 表达 DosR 的重组 BCG 可在体外有氧条件下被大量培养而不进入非复制休眠期, 使其具备了成为潜伏感染期疫苗的价值<sup>[22]</sup>。

构建多种动物模型的研究中发现, 构建 PhoP 基因缺失株的活疫苗毒性是减小的, 滞留性增加, 并且可以阻止结核分枝杆菌的入侵, 从而保护宿主<sup>[23]</sup>。鉴于卡介苗对结核病的预防作用的局限性, 在不同的人群, 其免疫保护作用差异较大且效果不稳定(免疫保护率从 0—80% 不等), 并且给 AIDS 等免疫功能受损的患者接种卡介苗后还可能导致严重的播散性结核病<sup>[24]</sup>, 同时接种卡介苗后, 还会对结核病患者的实验室诊断产生一定的影响。结核分枝杆菌 PhoP 缺失突变株有潜力成为替代 BCG 的新型疫苗。Verreck 等<sup>[25]</sup>对猕猴的动物实验证实这一点, PhoP 缺失突变株对宿主有显著的保护作用, 作为结核候选疫苗。

## 4 展望

结核杆菌双组分系统的研究, 为研究结核病的发病机制以及结核杆菌的致病性、耐药性提供了新的研究方向。双组分系统有多个“靶点”, 如感应外界刺激的位点、激酶自主磷酸化位点和反应调控蛋白磷酸化位点等, 探究双组分信号转导系统的机制, 找到双组分蛋白反应的靶点, 为更好地设计双组分系统的抑制物提供了条件<sup>[26]</sup>, 为进一步开发高效、安全的疫苗以及寻找新的抗结核药物的分子靶位提供了新的依据。

## 参考文献

1. 李兰, 郭述良, 罗永艾. 结核病发病机制的研究进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志. 2009, 32(8): 620-622
2. Shiloh M U, Manzanillo P, Cox J S. Mycobacterium tuberculosis senses host derived carbon monoxide during macrophage infection [J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(5): 323-330.
3. Kumar A, Deshane J S, Crossman D K. et al. Heme Oxygenase-1-derived Carbon Monoxide Induces the Mycobacterium tuberculosis Dormancy Regulon [J]. J Biol Chem. 2008, 283 (26): 18032-18039.
4. Szurmant H, Hoch J A. Interaction fidelity in two-component signaling [J]. Curr. Opin. Microbiol. 2010, 13: 190-197.
5. Silversmith R E. Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction [J]. Curr. Opin. Microbiol. 2010, 13: 177-183.
6. Szurmant H, Hoch J A. Interaction fidelity in two-component signaling [J]. Cur. Open. Microbiol. 2010, 13: 190-197.

7. Parish T, Smith DA, Roberts G, et al. The senX3-regX 3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence [J]. *Microbiology*, 2003, 149 (6): 1423-1435.
8. Shaun B. Walters, Eugenie Dubnau, Irina Kolesnikova, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(2), 312-330
9. DASGUPTA N, KAPUR V, SINGH K, et al. Characterization of a two-component system, devR-devS, of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuber Lung Dis*, 2000, 80(3): 141-159.
10. CONVERSE P J, KARAKOUSIS P C, KLINKENBERG L G, et al. Role of the dosR-dosS two-component regulatory system in *Mycobacterium tuberculosis* virulence in three animal models [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(3): 1230-1237.
11. Ewan F, Jackson M, Pet he K, et al. Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect Immune*, 2002, 70(5): 2256-2263.
12. SAINI D K, MALHOTRA V, DEY D, et al. DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR [J]. *Microbiology*, 2004, 150(4): 865-875.
13. Chen J M, Alexander D C, Behr M A, et al. *Mycobacterium bovis* BCG vaccines exhibit defects in alanine and serine catabolism [J]. *Infect Immune*, 2003, 71: 708- 6.
14. SAINI D K, MALHOTRA V, DEY D, et al. DevR-DevS is a bonafide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR [J]. *Microbiology*, 2004, 150(4): 865-875.
15. VOSKUIL M I, SCHNAPPINGER D, VISCONTI K C, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(5) : 705-713.
16. VOSKUIL M I, SCHNAPPINGER D, VISCONTI K C, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(5): 705-713.
17. BOON C, DICK T, *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy [J]. *J Bacterial*, 2002, 184(24):6760-6767.
18. Sharma V, Sharma S, Hoener zu Bentrup K, et al. Structure of isocitratelase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 663- 8.
19. Sureka K, Ghosh B, Dasgupta A, et al. Positive feedback and noise activate the stringent response regulator rel in *Mycobacteria* [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(3): 1771.
20. Roupie V, Romano M, Zhang L, et al. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice [J]. *Infect Immune*, 2007, 75(2): 941-949.
21. Yasuhiro Y, Kunio T, Shintaro S, et al. Immunogenicity of latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice [J]. *Procedia Vaccinol*,

- 2010,3(3) :19-26.
22. FLORES VALDEZ M A, SCHOOLNIK G K. DosR-regulon genes induction in *Mycobacterium bovis* BCG under aerobic conditions [J]. *Tuberculosis* , 2010 , 90(3):197-200.
  23. Asensio J A , Arbus A , Prez E, et al. Live tuberculosis vaccines based on PhoP mutants: a step towards clinical trials [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(2): 201-11.
  24. Sonnenberg P, Glynn JR, Fielding K, Murray J, Godfrey-Faussett P, Shearer S. How soon after infection with HIV does risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *J Infect Dis* 2005; 191:150–8.
  25. Verreck FA, Vervenne R A, Kondova I, et al. M V A. 85A boosting of BCG and an attenuated, phoP deficient *M. tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): e5264.
  26. Utsumi R, Gotoh Y, Eguchi Y, et al. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria [J]. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13: 232 -239.

## 致 谢

### (Acknowledgment)

时光荏苒，三年的硕士研究生生活，即将接近尾声，这是我终身难忘的学习经历，也是我不断成长的日子。至此论文完成之际，谨以此文向帮助过我的老师和同学们表示由衷的敬意和衷心的感谢。

这三年里，我的导师张万江教授给了我莫大的鼓励和帮助，感谢他在学习和实验中给予的精心培养和悉心指导，他学识渊博、治学严谨、胸怀豁达，给我留下了很深刻的影响，他孜孜不倦的教诲，帮助我在这三年里树立了端正的学习态度，促使我不断的进步。他高尚的品格，永远激励着我以后更努力的学习和工作，非常的感谢张老师对我的培养和帮助。

特别感谢袁俐教授、陈雪玲教授、李永祥教授、章乐副教授、王远志副教授、潘泽民教授及吴芳老师、吴万贵老师、米力古老师、钟华老师在教学实践和论文开题中给予我的指导和帮助，在实验进行中给予我耐心的技术讲解和指导。

感谢董江涛师兄、董伟杰师兄、庾清章师兄，李薇和刘云霞师姐在学习、实验和论文写作方面给予的指导和帮助。

感谢我的同学庄睿、梁晨、樊超、张磷、李枫、李华、印双红和张亚丽在三年的学习、实验过程中给予的无私帮助和支持。

感谢朱彬师弟、邬博师弟、李瑞山师弟、何丽师妹、张玉清师妹、张文雯师妹、任路师妹和盖莉莉师妹在实验和生活中给予的帮助。

感谢我的家人对我始终不变的关怀，感谢他们在我彷徨迷茫时给予的默默支持，感谢他们对我的宽容和忍耐，是他们让我更加清晰的认识自己，更加坚定了自己的信念，他们不仅是我这三年最大的精神支柱，更使我人生路上永远的依恋。

感谢以上所有帮助过我，伴我度过这三年的研究生生活，让我在生活、学习、个人能力等各方面都有提高，是我懂得珍惜的所有人，谢谢你们，正是因为你们，我才可以这样顺利的完成自己的学业，才可以取得今天的进步。

衷心的感谢你们，祝福你们！

研究生：李文娟  
2014年5月

## 作者简介

李文娟，女，汉族，生于1988年12月，籍贯山东省莱芜市。2011年7月毕业于山东中医药大学护理学院，护理学专业。2011年9月考入石河子大学医学院就读硕士研究生，专业为免疫学，研究方向是感染免疫，导师是张万江教授。

### 在学期间主要参与的研究项目


- 1 参加了国家自然科学基金项目《结核杆菌PhoPR双组分系统对新疆地区广泛流行的耐药结核杆菌临床分离株耐药性产生的的调控作用及其机制研究》，项目批准号：81260261.
- 2 参加了国家自然科学基金项目《结核杆菌对感染宿主巨噬细胞铁代谢的调控作用及其机制研究》，项目批准号：81160192.
- 3 参加了国家自然科学基金项目《结核分枝杆菌小分子热休克蛋白Hsp16.3对巨噬细胞凋亡的调控作用及其机制研究》，项目批准号：30960335.
- 4 参加了石河子大学科学技术研究发展计划“自然科学与计划创新”重点项目，项目批准号：ZRKX2010ZD01.

### 在学期间发表的文章

- [1] 李文娟，张万江. 双组分系统与结核杆菌致病性的相关性研究进展[J]. 中国病原生物学，2013, 7 (8) 656-658.
- [2] 李文娟，庄睿，张万江等. 结核杆菌PhoPR双组分系统与广泛流行的耐药结核杆菌耐药性的相关性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2013, 33 (10) 773-779
- [3] 李文娟，庄睿，张万江等. 耐药结核分枝杆菌PhoPR双组分系统基因表达的研究[J]. 中国病原生物学（已录用，待刊印）
- [4] 庄睿，王霞，张锋，宝音，章乐，吴芳，吴江东，张春军，张辉，李文娟，张万江等. 不同毒力结核分枝杆菌对感染小鼠肺泡巨噬细胞铁蛋白及铁转运蛋白表达的影响[J]. 中国免疫学杂志，已录用
- [5] 庄睿，姜晓霞，张峰，李文娟，张万江等. 结核分枝杆菌对感染小鼠肺泡巨噬细胞转铁蛋白受体和铁蛋白表达的影响[J]. 石河子大学学报，已录用

## 石河子大学硕士研究生学位论文

### 导师评阅表

研究生姓名	李文娟	学制	3 年
专业	免疫学	研究方向	感染免疫
<p>学术评语:</p> <p>该生课题为《结核杆菌PhoPR双组分系统与新疆地区耐药结核杆菌临床分离株耐药性的相关性研究》，本课题以新疆地区广泛流行的耐药结核杆菌临床分离株为研究对象，比较分析和探讨研究结核杆菌PhoPR双组分系统分别在结核杆菌药物敏感菌株、单纯耐一线抗结核药物（利福平、异烟肼、链霉素、乙胺丁醇）的结核杆菌临床分离株、耐多药的结核杆菌临床分离株中的表达，与分别经过感染动物后，再收集、培养的上述各结核杆菌菌株基因表达谱的变化及其差异，和与上述各结核杆菌菌株的耐药性及其变化，三者之间的相关性，以期研究揭示结核杆菌PhoPR双组分系统对耐药结核杆菌耐药性产生的影响及其机制，为阐明结核杆菌的耐药机制提供理论依据，对结核病的有效防治具有重要的科学价值和社会意义。</p> <p>本研究立意新颖，构思严谨，实验设计完整、合理，技术路线清晰，结果真实、可靠。该研究生具备严肃的科学态度和严谨求实的科研作风，科研动手能力强，勤奋钻研，善于思考，论文撰写观点明确，论据充分，条理性和逻辑性强。同意作为硕士论文提交答辩委员会进入答辩过程。</p> <p style="text-align: right;">指导教师签字: </p> <p style="text-align: right;">2014 年 06 月 10 日</p>			