

分类号:

密 级:

学 号: 2014109030

单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



MTB PPS 对单耐异烟肼结核杆菌耐药性的影响及机制研究

学 位 申 请 人	张 帅
指 导 教 师	张 万 江
申请学位门类级别	医学硕士
学 科 、 专 业 名 称	病理学与病理生理学
研 究 方 向	感染性疾病的病理生理学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2017 年 11 月

分类号:

密 级:

学 号: 2014109030

单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



MTB PPS 对单耐异烟肼结核杆菌耐药性的影响及机制研究

学 位 申 请 人	张 帅
指 导 教 师	张 万 江
申请学位门类级别	医学硕士
学 科 、 专 业 名 称	病理学与病理生理学
研 究 方 向	感染性疾病的病理生理学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2017 年 11 月

**The effect and mechanism of MTB PPS on the drug-resistance of
isoniazid monoresistant Mycobacterium tuberculosis**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Zhang Shuai

(Pathology and pathophysiology)

Dissertation Supervisors: Prof. Zhang Wan-jiang

November, 2017

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

本人所呈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：张帅

时间：2017年11月12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：张帅

时间：2017年11月12日

导师签名：



时间：2017年11月12日

摘要

目的: 探讨研究结核杆菌泛素样蛋白-蛋白酶体系统 (Mycobacterium tuberculosis ubiquitin-like protein-proteasome system, MTB PPS) 对单耐异烟肼结核杆菌 (Isoniazid Monoresistant Mycobacterium tuberculosis, INH-MTB) 耐药性的影响, 进一步探讨其发生机制, 为揭示结核杆菌的耐药机理奠定理论基础。

方法: 利用 RT-qPCR 技术对 MTB PPS 的四种基因 (*Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa*) 分别过表达的 INH-MTB 菌株进行鉴定; 利用 PCR 技术对 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变 (Δ *Pup*、 Δ *Dop*、 Δ *PafA*、 Δ *Mpa*) 的 INH-MTB 菌株进行鉴定。采用刃天青显色法, 比较研究 INH-MTB 与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株, 和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株, 异烟肼最低抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 值的差异; 比较研究在应用结核杆菌外排泵抑制剂后, INH-MTB 与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株, 和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株, 异烟肼 MIC 差值间的差异; 比较研究在应用改变结核杆菌细胞壁通透性的试剂后, INH-MTB 与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株, 和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株, 异烟肼 MIC 差值间的差异。

结果: (1) 成功构建了 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因、*Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的 INH-MTB 菌株。(2) 与 INH-MTB 相比, 过表达 *Pup* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 值增加 8ug/mL, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而过表达 *PafA* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 值增加 1.03ug/mL, 过表达 *Dop* 或 *Mpa* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 值分别降低 1.03ug/mL、0.68ug/mL, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 INH-MTB 相比, 缺失 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 值分别降低 4.82ug/mL、4.98ug/mL、4.99ug/mL、4.9ug/mL, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

(3) 在应用结核杆菌外排泵抑制剂后, 与 INH-MTB 相比, 过表达 *Pup* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 差值增加了 8ug/mL; 缺失 *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 差值分别降低 4.65ug/mL、4.81ug/mL、4.83ug/mL、4.75ug/mL, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在应用结核杆菌外排泵抑制剂后, 与 INH-MTB 相比, 过表达 *Dop*、*Mpa* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 差值分别降低 1ug/mL、0.65ug/mL; 过表达 *PafA* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼 MIC 差值增加了 0.99ug/mL, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。(4) 在应用改变结核杆菌细胞壁通透性的试剂后, 与 INH-MTB 相比, 过表达 *Pup* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼的 MIC 差值增加了 7.78ug/mL; 缺失 *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼的 MIC 差值分别降低 4.58ug/mL、4.73ug/mL、4.75ug/mL、4.68ug/mL, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在应用改变结核杆菌细胞壁通透性的试剂后, 与 INH-MTB 相比, 过表达 *Dop*、*Mpa* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼的 MIC 差值分别降低 1ug/mL、0.7ug/mL; 过表达 *PafA* 基因的结核杆菌菌株, 异烟肼的 MIC 差值增加 0.97ug/mL, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论: 结核杆菌泛素样蛋白蛋白酶体系统对 INH-MTB 耐药性的产生有调控作用, 其作用机制可能是通过调控 INH-MTB 外排泵的功能或 INH-MTB 细胞壁的通透性来影响其耐药性的产生。

关键词: 结核杆菌, 泛素样蛋白-蛋白酶体系统, 耐药性, 异烟肼, 机制

Abstract

Object: To explore the effect of ubiquitin like protein-proteasome system on the drug-resistance of isoniazid monoresistant Mycobacterium tuberculosis (INH-MTB); the mechanism of its occurrence is further discussed to lay a theoretical foundation for the drug resistance of tuberculosis.

Methods: Using RT-qPCR, identify INH-MTB with over-expression of one of the four genes (Pup, Dop , PafA or Mpa) strains; Using PCR, identify INH-MTB with deletion of one of the four genes (Δ Pup, Δ Dop, Δ PafA or Δ Mpa) strains. Using Resazurin microtitre assay, the difference of minimum inhibitory concentration (MIC) of isoniazid were compared between INH-MTB and INH-MTB with over-expression of one of the four genes strains and INH-MTB with deletion of one of the four genes strains. After using efflux pump inhibitors, the difference value of MIC of isoniazid were also compared between INH-MTB and INH-MTB over-expression strains and INH-MTB deletion mutant strains. After using agent for changing cell wall permeability, the difference value of MIC of isoniazid were also compared between INH-MTB and INH-MTB over-expression strains and INH-MTB deletion mutant strains.

Results: (1) We successfully constructed INH-MTB with over-expression of one of the four genes strains and INH-MTB with deletion of one of the four genes strains. (2) The MIC value of isoniazid was 8 ug/ml higher in INH-MTB with Pup over-expression strain than in INH-MTB ($P<0.05$). The MIC value of isoniazid was 1.03 ug/ml higher in INH-MTB with PafA over-expression strain than in INH-MTB; the MIC value of isoniazid were 1.03ug/ml and 0.68 ug/ml lower in IN H-MTB with Dop, Mpa over-expression strains than in INH-MTB, respectively. The differences had no statistical significance ($P>0.05$). The MIC value of isoniazid were 4.82ug/ml, 4.98 ug/ml, 4.99ug/ml and 4.9 ug/ml lower in INH-MTB with deletion of Pup, Dop, PafA or Mpa strains than in INH-MTB, respectively. The differences had statistical significance ($P<0.05$). (3) After using efflux pump inhibitors, the difference value of MIC of isoniazid was 8 ug/ml higher in INH-MTB with Pup over-expression strain than in INH-MTB; the difference value of MIC of isoniazid were 4.65ug/ml, 4.81ug/ml, 4.83ug/ml, 4.75ug/ml lower in INH-MTB with deletion of Pup,Dop, PafA or Mpa strains than in INH-MTB, respectively. The differences had statistical significance ($P<0.05$). After using efflux pump inhibitors, the difference value of MIC of isoniazid were 1ug/ml, 0.65ug/ml lower in INH-MTB with Dop, Mpa over-expression strains than in INH-MTB and was 0.99ug/ml higher in INH-MTB with PafA over-expression strain than in INH-MTB, respectively. The differences had no statistical significance ($P>0.05$). (4) After using agent for changing cell wall permeability , the difference value of MIC of isoniazid was 7.78 ug/ml higher in INH-MTB with Pup over-expression strain than in INH-MTB; the difference value of MIC of isoniazid were 4.58ug/ml, 4.73ug/ml, 4.75ug/ml, 4.68ug/ml lower in INH-MTB with deletion of Pup,Dop, PafA or Mpa strains than in INH-MTB, respectively. The differences had statistical significance ($P<0.05$). After using agent for changing cell wall permeability, the difference value of MIC of isoniazid were 1ug/ml, 0.7ug/ml lower in INH-MTB with Dop, Mpa over-expression strains than in INH-MTB and was 0.97ug/ml higher in INH-MTB with PafA over-expression strain than in INH-MTB, respectively. The differences had no statistical significance ($P>0.05$).

Conclusion: Ubiquitin like protein-proteasome system of Mycobacterium tuberculosis regulates the development of drug-resistance of INH-MTB strain and may affect its resistance to isoniazid by regulating the function of efflux pumps or the permeability of cell wall.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, ubiquitin like protein-proteasome system, drug-resistance, isoniazid, mechanism

目录

摘要	I
Abstract	II
中英文缩略词对照表	V
前言	1
第一部分 MTB PPS 对单耐异烟肼结核杆菌耐药性的影响研究.....	4
1 材料	4
2 方法	8
结果	14
1 菌株的生长.....	14
2 成功构建了 <i>Pup</i> 、 <i>Dop</i> 、 <i>PafA</i> 或 <i>Mpa</i> 基因过表达的 INH-MTB 菌株	14
3 成功构建了 <i>Pup</i> 、 <i>Dop</i> 、 <i>PafA</i> 或 <i>Mpa</i> 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株	16
第二部分 MTB PPS 对单耐异烟肼结核杆菌耐药性影响的机制研究	24
1 材料.....	24
2 方法.....	26
结果	28
1 维拉帕米对各结核杆菌菌株异烟肼 MIC 值影响最大	28
2 MTB PPS 通过调控 INH-MTB 菌株的外排泵功能来影响其对异烟肼的耐药	28
3 改变细胞壁通透性的试剂对各结核杆菌菌株异烟肼 MIC 值的影响	30
4 MTB PPS 通过调控 INH-MTB 菌株细胞壁的通透性来影响其对异烟肼的耐药	31
讨论	33
结论	36

参考文献	37
文献综述	40
致谢	48
作者简介	49
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	50

中英文缩略词对照表

英文缩写	英文全称	中文译名
TB	Tuberculosis	结核病
L-J	Modified Lowenstein Jensen medium	改良罗氏固体培养基
PPS	Pup-proteasome system	Pup-蛋白酶体系统
Tris	Trihydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
INH	Isoniazid	异烟肼
MIC	Minimal inhibitory concentration	最低抑菌浓度
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
mRNA	Messenger RNA	信使核糖核酸
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RT-qPCR	Real-time Quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
Pup	Prokaryotic ubiquitin-like protein	原核类泛素蛋白
bp	Base pair	碱基对
TAE	Tris acetate buffer	Tris-乙酸电泳缓冲液
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) 是由于感染了结核杆菌所导致的全球性传染病。在我国结核杆菌耐药菌株的出现, 患 HIV 人数的增加以及 TB 的潜伏感染使结核病疫情进一步严峻, 更加急需寻求新的途径来帮助我们解决结核杆菌耐药问题^[1]。TB 比艾滋病和疟疾造成的死亡人数更多, 每年造成 40 万人死亡。2015 年世界范围内大约有 48 万新发的多重耐药 TB 病例和 10 万耐利福平 TB 病例, 其中近一半病例发生在俄罗斯、印度、中国这三个国家^[2]。在世界范围内 82% 的 TB 病人中, 其中, 中国、印度分别占了 11% 和 24%^[3]。这 11% 的比例, 使得我国发病人数在全世界位居第二。由于异烟肼等抗结核药物使用不当, 导致多重耐药甚至广泛耐药菌株越来越多, 给 TB 的控制与治疗带来了威胁与挑战。

目前研究认为导致结核杆菌耐药性的机制主要有以下几个方面^[4]: ①通过细菌的外排泵, 将已经进入菌体内部的抗生素泵至菌体外, 使菌体内抗菌药物含量降低。②通过产生灭活酶类改变药物的化学组成结构。③通过改变作用在细菌体内药物的靶位。④通过菌体组成成分阻断药物到达细菌体内。

异烟肼化学性质稳定, 是异烟酸的一种前体药物, 只有被活化之后才能发挥作用, 通过被动扩散的形式进入增长时期的结核杆菌体内, 对结核杆菌高度敏感。异烟肼的活化产生一系列的产物, 如自由基、活性氧, 主要作用于细胞壁中的杆菌酸、脂类等结核杆菌的多个靶点, 破坏其生理功能, 最终导致细菌死亡。关于结核杆菌如何导致异烟肼产生耐药的分子水平机制比较复杂, 其中包括了 β -酮酰基酰基运载蛋白合成酶 *KasA*、过氧化氢一过氧化物酶 *KatG*、烯酰脂酰载体蛋白还原酶 *InhA* 等多位点基因的突变。其中 *KatG* 基因的编码产物能将细胞内的异烟肼氧化成为异烟酸, 通过此途径参与了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶 I(NAD)的合成, 最终抑制细胞壁中杆菌酸的生物合成作用, 破坏了结核杆菌的抗侵袭与抗氧化功能屏障, 最终杀灭细菌。有文献报道^[5]由于 *KatG* 的突变所导致的异烟肼耐药占有耐药的 50%-95%。当 *KatG* 突变时过氧化氢一过氧化物酶的活性会下降甚至丧失。另外一个异烟肼的作用靶点是烯酰基还原酶, 它是结核杆菌分枝菌酸合成途径中的酶之一, 由基因 *InhA* 来编码。异烟肼可以通过作用于该靶点, 阻断分支菌酸的生化合成过程, 从而破坏结核杆菌细胞壁的屏障性保护作用, 细菌最终因疏水性降低、耐酸性降低而死亡。由于 *KatG* 和 (或) *InhA* 突变所致的耐药占异烟肼耐药的 75%。但对于有的单耐异烟肼结核杆菌 (Isoniazid Monoresistant Mycobacterium tuberculosis, INH-MTB) 菌株而言, 并没有检测到与异烟肼耐药相关的 *KatG* 和 (或) *InhA* 基因的突变, 可见耐药不仅仅与基因突变相关还与其它的耐药机制相关。这些耐药机制可能涉及结核杆菌的药物主动外排机制或结核杆菌细胞壁的低通透性。

2008 年, Pearce 等命名了一种新的蛋白, 主要是由于该蛋白在结核杆菌中的功能与

真核细胞中的泛素功能相似，我们把它叫做原核类泛素蛋白（prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup）。结核杆菌泛素样蛋白蛋白酶系统（Mycobacterium tuberculosis ubiquitin-like protein-proteasome system, MTB PPS）由结核杆菌类泛素蛋白与结核杆菌蛋白酶体组成。该系统介导的蛋白质降解过程中所需的辅助因子有：*Dop*、*PafA*、*Mpa*。MTB PPS 是胞内蛋白降解的重要机制，在去酰胺酶 *Dop*，连接酶 *PafA*，ATP 酶 *Mpa* 等辅助因子的作用下，*Pup* 可以共价标记多种功能蛋白，并介导被标记蛋白通过蛋白酶体降解^[6]。这些被标记的蛋白涉及中间代谢、脂类代谢、信号转导、毒力等不同的生物学功能，如结核杆菌菌体内泛酸的生物合成需要 *PanB* 的参与，泛酸的存在有利于结核杆菌在小鼠体内长期生存^[7]；结核杆菌的硫醇和细胞壁脂多糖的形成过程中 *Ino1* 起着重要作用，同时 *Ino1* 可以增强结核杆菌对药物的屏障功能^[8]；结核杆菌内脂肪酸和分枝菌酸合成过程中需要酶 *FabD* 的催化。可见，*Pup* 的修饰可能是一种全局性的修饰，而且通过修饰介导了原核生物的各种生命活动过程。

任何生物系统的正常运行都依赖于其各组分的协调活动。在许多情况下，基因水平的调节是决定细胞内各组分水平的有效方法。然而，当基因水平的调控不足以达到调和系统功能的情况下，通常启用转录后调节机制。近年研究发现，MTB PPS 作为一种转录后调节机制，主要介导和调控结核杆菌菌体内蛋白质的选择性降解，对结核杆菌在宿主体内的生长、分化、代谢、繁殖、渗透调节、滞留性、毒性、趋化性、变异性、致病性及其引起的宿主免疫应答等方面发挥着重要的调控作用^[9]。本课题组前期研究结果表明：暴露于低浓度抗生素压力下的 INH-MTB 菌株与非暴露条件下相比，两种状态下 INH-MTB 菌株中 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因、*Mpa* 基因的表达存在差异。在 Diana 等人^[10]研究中，将 INH-MTB 菌株暴露于低浓度抗生素压力下，发现大多数外排泵基因的表达水平增高。同时外排泵活动的增强是导致结核杆菌耐药的机制之一。有文献报道结核杆菌的外排泵基因 *Rv2477* 过表达会致使菌株对氧氟沙星耐药^[11]，*Rv2477* 所编码的蛋白产物有 *Pup* 化区域^[12]，可见外排泵蛋白也是 MTB PPS 作用的一类底物。此外，MTB PPS 的底物蛋白 *FabD* 是催化结核杆菌脂肪酸和分枝菌酸合成的酶，那么 MTB PPS 可能会影响结核杆菌细胞壁的合成。

本研究是基于 MTB PPS 对结核杆菌菌体内蛋白质的选择性降解以及对底物蛋白功能研究的深入，结合本课题组前期研究结果，我们推测 MTB PPS 可能影响 INH-MTB 菌株耐药性，该系统可能通过调控结核杆菌外排泵的功能或细胞壁通透性影响异烟肼耐药性。为此，本研究选取了 INH-MTB 菌株，并分别构建了 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因、*Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的 INH-MTB 菌株。通过比较 INH-MTB 菌株与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株，和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株，异烟肼 MIC 值的差异，来探讨分析 MTB PPS 对 INH-MTB 菌株耐药性的影响。进一步通过比较在应用外排泵抑制剂后，INH-MTB 菌株与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株，和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株，异烟肼 MIC 差值间的差异，来探讨分析 MTB PPS 是否通过调控结核

杆菌外排泵的功能影响异烟肼耐药性。比较在应用改变结核杆菌细胞壁通透性的试剂后, INH-MTB 菌株与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株, 和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株, 异烟肼 MIC 差值间的差异, 来探讨分析 MTB PPS 是否通过调控结核杆菌细胞壁的通透性影响异烟肼耐药性。

第一部分 MTB PPS 对单耐异烟肼结核杆菌耐药性的影响研究

材料与方法

(Materials & Methods)

1 材料

1.1 菌株

本实验选取了课题组所在的实验室搜集的样本、并进行鉴定、传代培养最后保存的 5 株 INH-MTB 临床分离株（该菌株无 *KatG*、*InhA* 突变，对利福平、链霉素、乙胺丁醇、卡那霉素、氧氟沙星敏感）。INH-MTB (pMV361)（携带质粒 pMV361 的 INH-MTB 菌株）、rINH-MTB::*Pup*（过表达 *Pup* 基因的 INH-MTB 菌株）、rINH-MTB::*Dop*（过表达 *Dop* 基因的 INH-MTB 菌株）、rINH-MTB::*PafA*（过表达 *PafA* 基因的 INH-MTB 菌株）和 rINH-MTB::*Mpa*（过表达 *Mpa* 基因的 INH-MTB 菌株），INH-MTB Δ *Pup*（缺失 *Pup* 基因的 INH-MTB 菌株）、INH-MTB Δ *Dop*（缺失 *Dop* 基因的 INH-MTB 菌株）、INH-MTB Δ *PafA*（缺失 *PafA* 基因的 INH-MTB 菌株）、INH-MTB Δ *Mpa*（缺失 *Mpa* 基因的 INH-MTB 菌株）由本实验组构建并鉴定保存。

1.2 主要试剂及其公司

卡那霉素、孔雀绿、谷氨酸钠	北京索莱宝科技有限公司
硫酸镁、柠檬酸	上海生工生物有限公司
天门冬素、磷酸二氢钾	上海蓝季公司
异烟肼、刃天青	上海 Aladdin 有限公司
溶菌酶、蛋白酶 K、1 \times TE、50 \times TAE	上海生物工程有限公司
去离子水	北京康为世纪公司
OXOID 酵母提取物、OXOID 胰蛋白胨	英国 Tryptone 公司
琼脂粉	北京奥博星生物技术有限公司
无水乙醇	西安化学试剂厂产品
核酸染料 Gelview	北京百泰克生物技术有限公司
DNA Marker	北京天根生化科技有限公司
丙三醇	天津永晟精细化工有限公司
Tween-80	天津化学试剂厂
OADC 细菌增菌液	美国 BD 公司

1.3 主要实验仪器设备及其公司

TC3000 PCR 仪	英国 TECHNE 公司
Bio-RAD 梯度 PCR 仪	美国伯乐公司
DYY-6B 型稳压稳流电泳	北京市六一仪器厂
大容量全温度恒温摇	上海智城分析仪
数显电热培养箱	上海博迅实业有限公司
电热恒温水浴锅	上海博迅实业有限公司
超净工作台	苏净集团安泰空气技术有限公司
电子天平	美国 DEVEN 仪器公司
微量加样枪	德国 Eppendorf 公司
Thermo Scientific 1300 型二级生物安全柜	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
磁力搅拌器	江苏医疗器械厂
D-37520 高速常温离心机	德国 Biofage stratos 公司
-80 度超低温冰箱	美国 Thermo 公司
微波炉	日本松下公司
Z323K 低温离心机	德国 HERMILE 公司
紫外分光光度计 Nanodrop2000	英国 Techne 公司
Gel Doc2000 凝胶成像系统	美国 Bio-RAD 公司
SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 仪	罗氏公司
HVE-50 高压消毒锅	日本 HIRAYAMA 公司
9203A 型电热恒温鼓风干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
22SWG 标准接种环	北京玻璃仪器厂

1.4 主要试剂配制

1.4.1 溶菌酶溶液 125mg/mL

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出 0.125g 溶菌酶，与 1mL 的灭菌去离子水充分混匀后，用冰箱在恒温 4℃的环境下保存备用。

1.4.2 蛋白酶 K 溶液 20mg/mL

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出 0.02g 蛋白酶 K，与灭菌去离子水 1000uL 充分混匀后，用冰箱在恒温 4℃的环境下保存备用。

1.4.3 1%的琼脂糖凝胶

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出琼脂糖 0.4g，于 40mL 的 1×TAE 溶液中，封存后用微波炉加热融化 2min，然后取出待温度下降到 60℃时，再将 2.5uL Goldview 加入其中慢慢摇匀，再均匀的倒进一定规格制胶板中，20-30min 后于 1×TAE 的溶液内保存，近期使用。

1.4.4 1.5%的琼脂糖凝胶

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出琼脂糖 0.6g, 与 40mL 的 1×TAE 溶液中, 封存后用微波炉加热融化 2min, 然后取出等温度下降到 60℃时, 再将 Goldview2.5uL 加入其中慢慢摇匀, 再将上述溶液平均的倒进相当规格的制胶板中, 在 20-30min 之后将其保存在 1×TAE 的溶液内, 近期备用。

1.4.5 卡那霉素 50mg/mL

配制量: 10mL。用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出卡那霉素干粉 0.5g, 于 8mL 的去离子水充分溶解之后, 定容为 10mL, 再采用 0.22um 的滤菌器对混合后的溶液进行过滤除菌后再进行分装, 然后在 -20℃ 的环境下保存备用。

1.4.6 LB 固体培养基的配制

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出胰蛋白胨 1g, 琼脂粉 1.5g, 酵母提取物 0.5g, 加入到去离子水 80mL 中, 用磁力搅拌器进行搅拌直至完全溶解, 再用氢氧化钠将 PH 值调节到 7.6, 最后加双蒸水将容量定为 100mL, 在 121℃ 的环境下高压灭菌 20min 后在 4℃ 的环境下保存备用。

1.4.7 LB 液体培养基配制

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出胰蛋白胨 1g, 氯化钠 0.5g, 酵母提取物 0.5g, 与双蒸水 80mL 混合, 用搅拌器进行搅拌直至里面的成分完全溶解, 再用氢氧化钠将 PH 值调节到 7.6, 最后加双蒸水将容量定为 100mL, 在 121℃ 的环境下高压灭菌 20min 后在 4℃ 的环境下保存备用。

1.4.8 0.1g/L 刃天青显色液

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称出刃天青粉末 5mg, 与 45mL 的杀灭细菌的超纯水充分融合, 最后定容至 50mL, 在常温环境下储存备用。

1.4.9 结核杆菌培养基—改良罗氏培养基

成份	用量
谷氨酸钠	7.2g
KH ₂ PO ₄	14g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.24g
柠檬酸镁	0.6g
蒸馏水	600mL
新鲜鸡卵液	1000mL
2%孔雀绿水溶液	20mL
丙三醇	12mL

改良罗氏培养基的制备过程如下：

(1) 配置基础液的过程与方法：首先用灭菌过的量筒量取蒸馏水 600mL，接着把已经用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称量好的丙三醇、硫酸镁、谷氨酸钠、柠檬酸镁和磷酸二氢钾加入到烧杯中，为了加速物质与溶液的充分混合，用清洁的玻璃棒轻微搅拌，然后为了上述混合液能够充分的溶解，将其置于微波炉中进行 3min 的加热，最后取出烧杯待其自行降温到 50℃。

(2) 配置新鲜的鸡卵液的过程及方法：将选取好的新鲜的鸡蛋表面清理干净，再将其置于 75%的酒精中浸泡消毒 20-30min 之后取出，擦干净，打碎，搜集鸡蛋卵液，并用磁力搅拌器混匀，最后用 6-8 层的无菌纱布对混匀的鸡卵液进行过滤。

(3) 将上述新鲜的鸡卵液 1000ml 与基础液 600ml 进行混匀。加入已配置好的 2%孔雀绿水溶液适量，用磁力搅拌器将其充分混匀，安静放置 1 个小时后，将上述混溶液分别装在聚丙烯螺旋口标准无菌培养管 (2.3cm×8cm) 中，每管约 7mL；将培养基倾斜约 30 度放置在水浴锅架上，使培养基的倾斜面占至试管的 2/3，在 85℃的蒸汽凝固灭菌器环境下凝固灭菌 50min，每隔 1 小时灭菌一次，共两次；其中制备成功的培养基的颜色应为绿色，表面是光滑且湿润的，有一定的韧性以及酸碱缓冲能力。

(4) 将制备成功的培养基在 37℃恒温环境下做 24 小时无菌实验，检验培养基是否存在污染，证明无污染后，放置在恒温 4℃的冰箱中在避光环境下保存，此培养基的有效使用期限是 1 个月。

含卡那霉素培养基的制备过程如下：

操作步骤如改良罗氏培养基的制备过程 (1) 和 (2) 所示，将上述 600mL 基础液和 1000mL 新鲜鸡卵液混匀。加入适量已制备好的 2%孔雀绿水溶液，搅拌至充分混匀，再向内加入卡那霉素溶液使得卡那霉素的终浓度为 50 ug/mL，并将液体混合均匀，静置 1 小时。然后将液体分装于培养管内，每管约 7-8 mL；将培养管倾斜放置于水浴锅内，间歇灭菌两次。将制备好的培养基行无菌试验，若无污染则保存于 4℃冰箱备用。

1.4.10 Middlebrook 7H9 液体培养基的配制如下

称取 7H9 培养基 4.7g，随后加入 Milli Q 水 900mL，将上述混合物加热溶解，分装成 5 瓶，每瓶 180mL。在 121℃环境下灭菌 10min，待冷却至 45℃后，于无菌超净台内，每瓶加入 20mL OADC 营养添加剂，放入 4℃冰箱保存备用。

2 方法

2.1 结核杆菌的培养

分别将 INH-MTB 接种于改良罗氏斜面培养基中，置于 37℃ 恒温培养箱中培养 3-4 周左右。INH-MTB (pMV361)、rINH-MTB::Pup、rINH-MTB::Dop、rINH-MTB::PafA、rINH-MTB::Mpa、INH-MTB Δ Pup、INH-MTB Δ Dop、INH-MTB Δ PafA、INH-MTB Δ Mpa，放置在恒温 37℃ 的培养箱行 6-8 周的培养，培养过程中应密切观察的内容包括了培养基的颜色、菌落的颜色、细菌的生长状态、生长速度的缓慢、菌落的大小等的情况变化。

2.2. 利用 RT-qPCR 技术鉴定 rINH-MTB::Pup、rINH-MTB::Dop、rINH-MTB::PafA、rINH-MTB::Mpa 菌株是否构建成功

2.2.1. INH-MTB 菌株、INH-MTB (pMV361) 菌株、INH-MTB 各过表达菌株总 RNA 的提取

对结核杆菌总 RNA 的提取严格按照 RNA 抽提试剂盒 RNeasy Plus Universal Midi Kit 的说明书进行，详细的操作流程如下所示：

准备工作：将 2 体积的乙醇（96-100%）加入到 Buffer RWT 中

将 4 体积的乙醇（96-100%）加入到 Buffer 中

把离心机提前预冷至 4℃；水浴箱预热至 37℃

- (1) 收集含药培养基上生长至对数期的各过表达单耐异烟肼结核杆菌菌株及普通培养基上的单耐异烟肼结核杆菌菌株，取适量菌体加入 300 μ L 1 \times TE 缓冲液于 2.0mL 无酶 EP 管中，并混合混匀，再加入 80 μ L 的 100mg/mL 溶菌酶，充分混匀后在 37℃ 的环境下温浴过夜。
- (2) 第二日将终浓度为 1% SDS 与第一步所得溶液混合，在 37℃ 的环境中温浴 15min，待其充分混合均匀后，再加入 0.2g/mL 的蛋白酶 K 20 μ L，在 45℃ 环境下温浴 15min。
- (3) 再上述溶液的基础上，添加 QIAzol 裂解试剂 600 μ L，使其充分融合。
- (4) 为了使核蛋白解离，我们的实验组将在步骤 3 配置的裂解液放置在离心管内，并在室温(15–25℃)的环境下放置 5min。
- (5) 接下来我们实验组将 gDNA Eliminator Solution 100 μ L 加入到上述溶液中，盖上管盖，充分融合 15s。
- (6) 再向上述溶液中加入氯仿 180 μ L，然后将管盖盖上，强力混匀 15s。（彻底的混匀对后期的分相十分的重要。）
- (7) 在室温（15-25℃）的环境下将含有均质化裂解液的离心管静置 2-3min。
- (8) 将静止后的裂解液在 4℃ 的离心机中以 12,000 x g 的转速将裂解液离心 15min。若使用的是同一台离心机，则在每次离心完成之后，待离心机的温度均恢复至室温(15–25℃)后再进行下次操作。（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。若组织样品中含有高脂肪，则在红色的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 3mL。)

(9) 然后把通常为 600uL 的上层液相转移至另外一个新的离心管内。

(10) 加入 70%的乙醇 1 体积(约 600uL)，用枪头吹打至彻底混匀，不需要离心，立即进入至步骤 11。

注意：经过均质化以及离心步骤，裂解液的体积可能会比 600uL 低，而且有可能在加入乙醇后形成沉淀。此时通过彻底的混匀使沉淀完全重悬，之后马上进入步骤 11。

(11) 接着将约 700uL 的样品加入到置于 2mL 收集管中的 RNeasy Mini spin column 粉色 (试剂盒提供) 上。轻盖上管盖，在室温 (15-25℃) 的环境下用离心机离心 15s，转速 $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10000\text{rpm}$)。丢弃流出液，在第 12 步重复使用收集管。

(12) 将剩余的样品重复进行第 11 步，丢弃流出液，在第 13 步中重复使用收集管。

(13) 把 Buffer RWT 700uL 加入到 RNeasy spin column 中，轻轻盖上离心管的盖子，用离心机在室温 (15-25℃) 的环境下以 $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10000\text{rpm}$) 的转速进行离心 15s 后洗膜。丢弃流出液，在第 14 步重复使用收集管。离心完毕之后，小心的将 RNeasy spin column 从收集管中取下，注意不能接触到流出液。确保收集管中的液体倾倒完全。注意：Buffer RWT 是通过浓缩液的形式提供的，在使用之前确保无水乙醇已经添加到了 Buffer RWT 中：Buffer RWT 加入 2 体积的乙醇 (96-100%)。

(14) 将 500uL Buffer RPE 加入到 RNeasy spin column 内，将离心管的盖子轻盖上，用离心机离心 15s 洗膜，离心机内温度为 15-25℃，离心机转速为 $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10000\text{rpm}$)。丢掉流出液，在第 15 步重复使用收集管。

注意：所提供的 Buffer RPE 是被浓缩过的浓缩液，在使用之前确保已经在 Buffer RWT 中添加过了无水乙醇：Buffer RPE 加入 4 体积的乙醇 (96-100%)。

(15) 将 500uL Buffer RPE 加入到 RNeasy spin column 内，室温(15-25℃)，离心机转速为 $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10000\text{rpm}$) 离心 2 min，并进行充分的洗膜。通过长时间的离心之后，膜将被干燥，为的是确保在 RNA 洗脱时没有乙醇的残留。因为残余的乙醇会干扰下游的反应。注意：离心完毕，小心地将 RNeasy spin column 从收集管中取出，尽量避免触碰到可能带有乙醇的流出液。

(16) 再取一个新的 2mL 收集管，将 RNeasy spin column 放于其中。直接向旋转柱膜中加入 30-50 uL 的无水 RNase。轻轻地将收集管的盖子盖上。为了洗脱 RNA，等待 1min，然后在 $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10000\text{rpm}$) 下离心 1min。

(17) 再用另一体积的 RNase-free 重复第 16 步，也可以将第 16 步的洗脱液再加入到膜上。(若需要提取的 RNA 是高浓度的，则我们就需要重复利用第 16 步的收集管。若使用第 16 步的洗脱液，则 RNA 的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。)

(18) 最终收集到的 RNA 为了防止被降解，通常置于 -80℃ 的环境下保存。

2.2.2 INH-MTB 菌株、INH-MTB (pMV361) 菌株、INH-MTB 各过表达菌株总 RNA 的逆转录

在冰上按照逆转录试剂盒说明书操作,依次向无酶 EP 管中加入下面几种试剂:RNA 3uL, Oligo(dT)primer 1uL, RNase-free water 8uL, 在 PCR 仪上 65℃ 孵育 5min 后,立即冰浴 1min。随后,继续加入 5×Reaction Buffer 4uL、RiboLock RNase Inhibitor 1uL、10 mM dNTP Mix 2uL、RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 1uL, 在 PCR 仪上孵育 50min 温度为 42℃, 之后继续 70℃ 孵育 5min, 逆转录完毕后, 将产物放于 -80℃ 冰箱保存。

2.2.3 引物的设计及合成

(1)由 GenBank 数据库中查出国际标准强毒株 H37Rv 菌株 *Pup*、*Dop*、*PafA* 和 *Mpa* 基因的序列。

(2)采用软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6 设计这四种基因以及内参基因 *SigA* 寡核苷酸引物, 引物序列见表 1。

表 1 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因 和 *Mpa* 基因及内参基因 *SigA* 的引物序列
Table 1 Primer sequences of *Pup* gene, *Dop* gene, *PafA* gene, *Mpa* gene and reference gene *SigA*

引物	序列 (5' → 3')
Pup(F)	AAAGGCCATGAGGAAGCAG
Pup(R)	GTCGATTTTCGTCGAGCAG
Dop(F)	ACCAGCCCACGCAATAGAT
Dop(R)	TAGCCACTCGGTCCAGGTA
PafA(F)	CTACCTGTTTCGCCGTGTG
PafA(R)	GGTCTTCCAGCACCCATTC
Mpa(F)	CAACGGCGACAAGGAAGT
Mpa(R)	CTCCAGCACCGATTTGATG
SigA(F)	TCGAGGTGATCAACAAGCTG
SigA(R)	CTGCAGCAAAGTGAAGGACA

2.2.4 RT-qPCR

(1) 反应体系

试剂	50uL 反应体系
2×Ultra SYBR Mixture	25uL
Forward Primer	1uL
Reverse Primer	1uL
Template DNA	2uL
RNase-Free Water	21uL

(2) 反应条件

步骤	温度	时间
预变性	95℃	10min
变性	95℃	15s
退火	60℃	30s
延伸 (40 个循环)	72℃	1min
最终延伸	72℃	5min

实验中, INH-MTB 组、INH-MTB (pMV361) 组和过表达菌株组的 *Pup*、*Dop*、*PafA* 和 *Mpa* 基因 cDNA 各设 3 个平行反应孔。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法比较每个基因在三组菌株中的相对表达水平。

2.3 利用 PCR 技术鉴定 INH-MTB Δ Pup、INH-MTB Δ Dop、INH-MTB Δ PafA、INH-MTB Δ Mpa 菌株是否构建成功

2.3.1 INH-MTB Δ Pup、INH-MTB Δ Dop、INH-MTB Δ PafA、INH-MTB Δ Mpa 菌株的筛选、鉴定

将 INH-MTB Δ Pup、INH-MTB Δ Dop、INH-MTB Δ PafA、INH-MTB Δ Mpa 菌株置于含卡那霉素的培养基中培养, 利用卡那霉素作为抗生素筛选标记, 初步筛选阳性菌落, 提取这些重组菌落的基因组 DNA, 并以此为反应模板, 分别以 Pup/Dop/PafA/Mpa-N-F 为上游引物, Km-R 为下游引物; Km-F 为上游引物, Pup/Dop/PafA/Mpa-C-R 为下游引物对这些重组菌落进行 PCR 鉴定, 检测菌落重组片段 Pup/Dop/PafA/Mpa-N-Km 和 Km-Pup/Dop/PafA/Mpa-C; 同时以四个目标基因的上、下游引物扩增各重组菌落, 检测 4 个待缺失的基因片段, 从而鉴定各缺失突变的 INH-MTB 是否构建成功。具体 PCR 检测的过程按照试剂盒说明进行, 详细过程略。

2.3.2 PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 中国际标准强毒株 H37Rv 菌株的 *Pup*、*Dop*、*PafA* 和 *Mpa* 基因序列及各基因上、下游同源臂的基因序列，使用 primer premier 5.0 软件设计引物（表 2），引物由上海生工生物工程公司合成。

表 2 用于缺失突变菌株鉴定的引物

Table 2 Primers used for the identification of deletion mutant strains

引物	序列 (5' →3')
Pup-N-F	ACACCCGCTGTAGACCTATC
Pup-C-R	CACGCCCGCTGTCTTTCT
Dop-N-F	GAACACCCGCTGTAGACCTATC
Dop-C-R	GGCTGGTTGGTGTGCGCAGATA
PafA-N-F	GAGGGCTATCGCATCAACCG
PafA-C-R	CATGAACACCACCTCGCCCG
Mpa-N-F	CCTGGCTGACGGTGTATG
Mpa-C-R	AGGGTTACACGGATGTTTCGG
Km-F	GCCACCTGGGATGAATGTC
Km-R	CGGTCATTTTGAACCCCAA
Pup-F	ATGGCGCAAGAGCAGACCAAGCGCGTC
Pup-R	GTCACTGTCCGCCCTTTTGGACGT
Mpa-F	ATGGGTGAGTCAGAGCGTTCTCAGGTCTT
Mpa-R	CTACAGGTAAGTGGCCGAGGTTGGAC
Dop-F	ATGTTCTGGGTGCGCGGGCCTTCGCTGGG
Dop-R	TTAGCGAGGCTCAGCGGTCAGT
PafA-F	GTGCAGCGTCGAATCATGGGCATCGTCGT
PafA-R	CTACATGCTCGCGATCAGCCGCTT

2.4 刃天青显色法检测各结核杆菌菌株耐药性

2.4.1 Middlebrook 7H9 液体培养基的配制

称取 4.7g 的 7H9 固体状干粉, 1g 的胰酪蛋白胨和 2mL 的甘油, 将上述物质充分混匀均匀后加入到 900mL 的蒸馏水中, 进行 121℃ 的高压灭菌, 时间为 10min, 随后保存于置于 4℃ 的恒温冰箱内, 临用时加入 OADC 营养添加剂 100mL。

2.4.2 结核杆菌的培养及菌悬液的制备

将培养至对数期的 INH-MTB 菌株, *Pup*、*Dop*、*PafA* 和 *Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的各 INH-MTB 菌株用磨菌器将其研磨至乳酪样, 用生理盐水稀释至每种菌悬液浓度为 1.0×10^6 /mL。

2.4.3 配制含不同浓度异烟肼的 7H9 液体培养基

无菌 48 孔板 (1-12 孔) 中各孔异烟肼的终浓度根据各个菌株预实验中 MIC 值的不同, 将异烟肼通过倍比稀释成不同的浓度梯度。在 1-11 孔中异烟肼浓度由高至低, 第 12 孔作为对照孔。

2.4.4 INH-MTB 菌株, *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的各 INH-MTB 菌株异烟肼 MIC 值的测定

①不同浓度异烟肼的配制, 方法如 2.4.3 ②向含不同浓度异烟肼的酶标板各孔中加入稀释好的菌悬液 100 μ L, 96 孔培养板的缝隙用封口膜将其封闭, 置于 37℃ 的恒温培养箱里面进行培养, 培养箱内二氧化碳含量设置为 5%, 至第四天起, 每天都需观察生长对照孔有无结核菌的生长, 约第 5 或 6 天在第 12 孔加入刃天青溶液 30 μ L, 24 小时后观察第 12 孔颜色的变化情况, 待第 12 孔液体的颜色由最初的蓝色变为粉红色之后, 也向其余各 11 孔中分别加入 30 μ L 的刃天青溶液, 24 小时后观察颜色的变化情况。若孔中液体颜色由最初的蓝色变为粉红色则预示着结核菌生长, 以保持最初蓝色的最低药物的浓度为该菌株的异烟肼最低抑菌浓度值 (若测试孔颜色改变不明显可延迟 24 小时读取)。每个实验平行 7 次。

2.4.5 统计学处理

实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件。用 *LSD-t* 检验进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果 (Results)

1 菌株的生长

将 INH-MTB、INH-MTB(pMV361)、rINH-MTB::*Pup*、rINH-MTB::*Dop*、rINH-MTB::*PafA* 、rINH-MTB::*Mpa* 、INH-MTB Δ *Pup*、INH-MTB Δ *Dop*、INH-MTB Δ *PafA*、INH-MTB Δ *Mpa* 菌株分别接种于培养基上,在 37℃ 的恒温培养箱内进行培养,主要观察的是各菌株的生长状态,生长至对数时期的结核杆菌其大体菌落形态呈颗粒、花菜状或结节状,米黄色或乳白色,不透明。

2 成功构建了 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因过表达的 INH-MTB 菌株

2.1 INH-MTB 菌株、INH-MTB (pMV361) 菌株、INH-MTB 各过表达菌株总 RNA 的提取

应用 Nanodrop2000 超微量分光光度计测量,吸光度比值 (A260/A280 处于 1.7-2.0 之间,且 A260>1, A260/ A230>2.0);同时应用 1% 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。

2.2. 菌株 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因的相对表达水平

图 1 显示的是过表达菌株的扩增曲线。与 INH-MTB 菌株相比,INH-MTB(pMV361) 菌株 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因的 mRNA 表达水平无明显差异。与 INH-MTB 菌株相比,rINH-MTB::*Pup* 菌株 *Pup* 基因的 mRNA 表达水平升高 18.65 倍,rINH-MTB::*Dop* 菌株 *Dop* 基因的 mRNA 表达水平升高 16.43 倍,rINH-MTB::*PafA* 菌株 *PafA* 基因的 mRNA 表达水平升高 15.79 倍,rINH-MTB::*Mpa* 菌株 *Mpa* 基因的 mRNA 表达水平升高 21.05 倍(图 2)。可见,各过表达菌株构建成功。与 INH-MTB (pMV361) 菌株相比,各过表达菌株中 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因的 mRNA 表达水平均明显升高且差异有统计学意义。

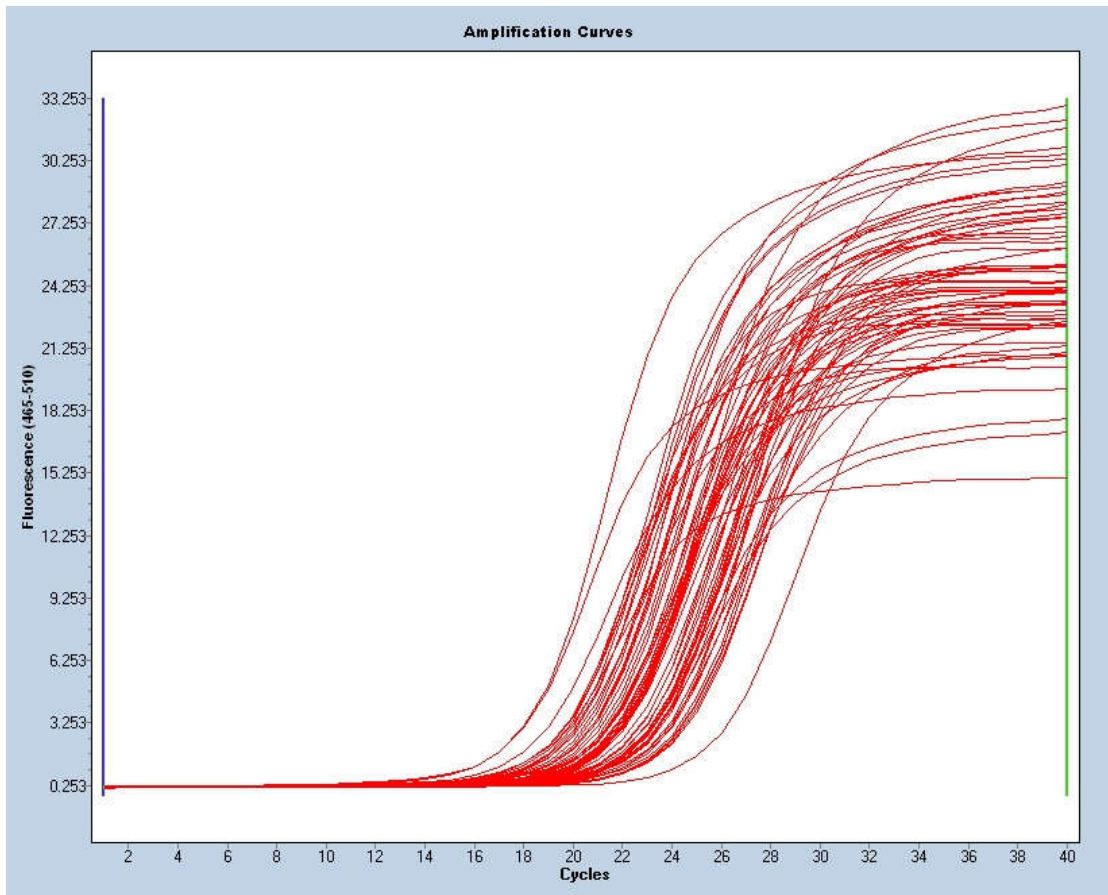


图 1 过表达菌株的扩增曲线

Figure1 Amplification curves of over-expression strains

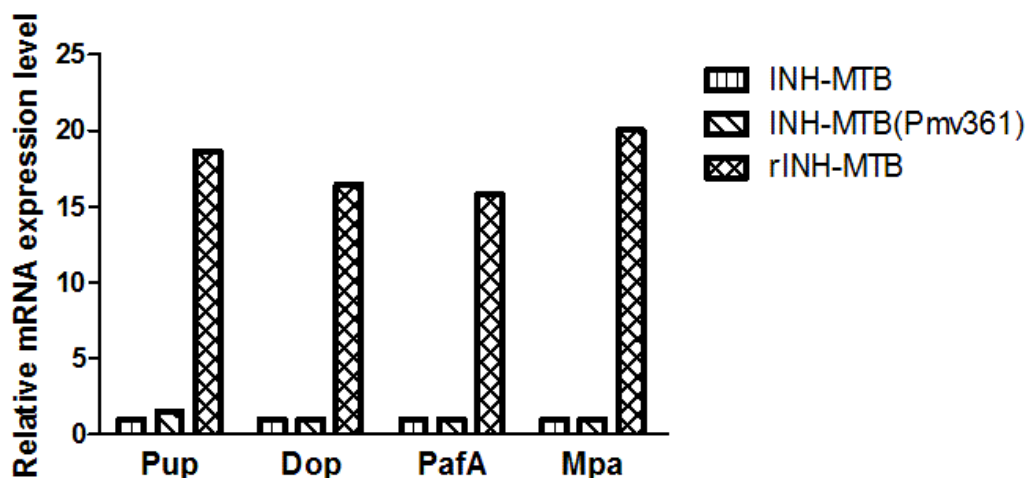


图 2 过表达菌株基因表达的分析

Figure 2 Analysis of over-expression strains gene expression

3 成功构建了 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株

3.1 初步筛选的各缺失突变菌株

本课题组前期通过 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因两侧同源序列，进行基因置换型同源重组。结果显示：INH-MTB 菌株（对照组）在含卡那霉素培养基上无菌株生长，*Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因缺失突变菌株在含卡那霉素培养基上筛选得到数量不等的结核杆菌阳性菌落。

3.2 目的基因缺失突变菌株的鉴定

3.2.1 *Pup* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株的鉴定

INH-MTB 野生株 DNA：引物对 *Pup*-F/R 有扩增条带（213 bp 的 *Pup* 基因片段）。INH-MTB Δ *Pup* 菌落（重组菌落）DNA：引物对 *Pup*-F/R 无扩增条带；上游引物 *Pup*-N-F、下游引物 Km-R 有扩增条带（重组片段 *Pup*-N-Km，1601 bp）；上游引物 Km-F、下游引物 *Pup*-C-R 有扩增条带（重组片段 Km-*Pup*-C，1591 bp）（图 3）。可见，*Pup* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株构建成功。

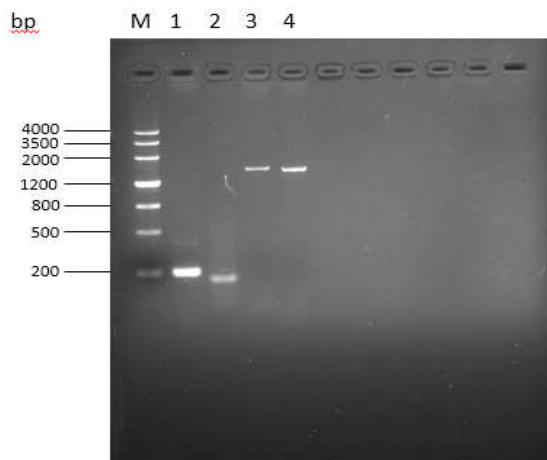


图 3 重组菌 INH-MTB Δ *Pup* 的 PCR 鉴定电泳图

Figure 3 PCR verification of electrophoregram of mutant INH-MTB Δ *Pup*

注：M DNA 分子标志物；1 引物对 *Pup*-F/R 扩增野生株 DNA；2 引物对 *Pup*-F/R 扩增重组菌落 DNA；3 上游引物 *Pup*-N-F、下游引物 Km-R 扩增重组菌落重组片段 *Pup*-N-Km；4 上游引物 Km-F、下游引物 *Pup*-C-R 扩增重组菌落重组片段 Km-*Pup*-C

Note :M DNA marker; lane 1 PCR-amplifying the wild type DNA using *Pup*-F/R; lane 2 PCR-amplifying the mutant DNA using *Pup*-F/R; lane 3 PCR-amplifying the recombinant fragment *Pup*-N-Km using *Pup*-N-F and Km-R; lane 4 PCR-amplifying the recombinant fragment K-*Pup*-C using *Pup*-C-R and Km-F

3.2.2 *Dop* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株的鉴定

INH-MTB 野生株 DNA: 引物对 Dop-F/R 有扩增条带 (1683 bp 的 *Dop* 基因片段)。INH-MTB Δ Dop 菌落(重组菌落)DNA: 引物对 Dop-F/R 无扩增条带;上游引物 Dop-N-F、下游引物 Km-R 有扩增条带(重组片段 Dop-N-Km, 1515 bp); 上游引物 Km-F、下游引物 Dop-C-R 有扩增条带(重组片段 Km-Dop-C, 1509 bp) (图 4)。可见, *Dop* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株构建成功。

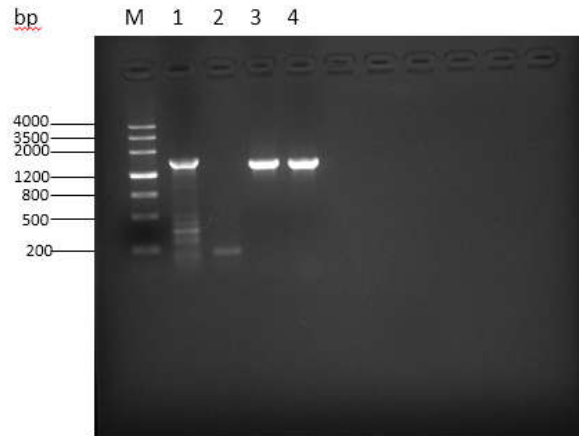


图 4 重组菌 INH-MTB Δ Dop 的 PCR 鉴定电泳图

Figure 4 PCR verification of electrophoregram of mutant INH-MTB Δ Dop

注: M DNA 分子标志物; 1 引物对 Dop-F/R 扩增野生株 DNA; 2 引物对 Dop-F/R 扩增重组菌落 DNA; 3 上游引物 Dop-N-F、下游引物 Km-R 扩增重组菌落重组片段 Dop-N-Km; 4 上游引物 Km-F、下游引物 Dop-C-R 扩增重组菌落重组片段 Km-Dop-C

Note: M DNA marker; lane 1 PCR-amplifying the wild type DNA using Dop-F/R; lane 2 PCR-amplifying the mutant DNA using Dop-F/R; lane 3 PCR-amplifying the recombinant fragment Dop-N-Km using Dop-N-F and Km-R; lane 4 PCR-amplifying the recombinant fragment Km-Dop-C using Dop-C-R and Km-F

3. 2. 3 *PafA* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株的鉴定

INH-MTB 野生株 DNA: 引物对 PafA-F/R 有扩增条带 (1377 bp 的 *PafA* 基因片段)。INH-MTB Δ PafA 菌落 (重组菌落) DNA: 引物对 PafA-F/R 无扩增条带; 上游引物 PafA-N-F、下游引物 Km-R 有扩增条带(重组片段 PafA-N-Km, 1590bp); 上游引物 Km-F、下游引物 PafA-C-R 有扩增条带(重组片段 Km-PafA-C, 1584bp) (图 5)。可见, *PafA* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株构建成功。

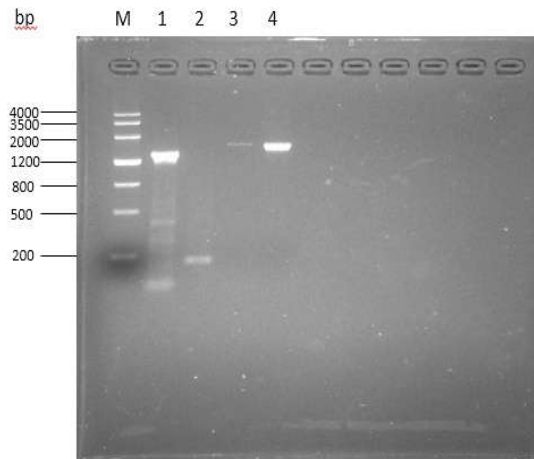


图 5 重组菌 INH-MTB Δ PafA 的 PCR 鉴定电泳图

Figure 5 PCR verification of electrophoregram of mutant INH-MTB Δ PafA

注: M DNA 分子标志物; 1 引物对 PafA-F/R 扩增野生株 DNA; 2 引物对 PafA-F/R 扩增重组菌落 DNA; 3 上游引物 PafA-N-F、下游引物 Km-R 扩增重组菌落重组片段 PafA-N-Km; 4 上游引物 Km-F、下游引物 PafA-C-R 扩增重组菌落重组片段 Km-PafA-C

Note: M DNA marker; lane 1 PCR-amplifying the wild type DNA using PafA-F/R; lane 2 PCR-amplifying the mutant DNA using PafA-F/R; lane 3 PCR-amplifying the recombinant fragment PafA-N-Km using PafA-N-F and Km-R; lane 4 PCR-amplifying the recombinant fragment Km-PafA-C using PafA-C-R and Km-F

3.2.4 *Mpa* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株的鉴定

INH-MTB 野生株 DNA: 引物对 *Mpa*-F/R 有扩增条带 (1848bp 的 *Mpa* 基因片段)。INH-MTB Δ *Mpa* 菌落(重组菌落)DNA: 引物对 *Mpa*-F/R 无扩增条带; 上游引物 *Mpa*-N-F、下游引物 Km-R 有扩增条带 (重组片段 *Mpa*-N-Km, 1604bp); 上游引物 Km-F、下游引物 *Mpa*-C-R 有扩增条带 (重组片段 Km-*Mpa*-C, 1602bp) (图 6)。可见, *Mpa* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株构建成功。

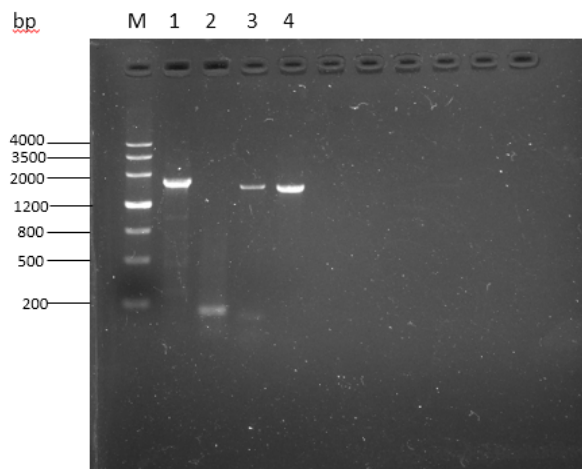


图 6 重组菌 INH-MTB Δ *Mpa* 的 PCR 鉴定电泳图

Figure 6 PCR verification of electrophoregram of mutant INH-MTB Δ *Mpa*

注: M DNA 分子标志物; 1 引物对 Mpa-F/R 扩增野生株 DNA; 2 引物对 Mpa-F/R 扩增重组菌落 DNA; 3 上游引物 Mpa-N-F、下游引物 Km-R 扩增重组菌落重组片段 Mpa-N-Km; 4 上游引物 Km-F、下游引物 Mpa-C-R 扩增重组菌落重组片段 Km-Mpa-C

Note: M DNA marker; lane 1 PCR-amplifying the wild type DNA using Mpa-F/R; lane 2 PCR-amplifying the mutant DNA using Mpa-F/R; lane 3 PCR-amplifying the recombinant fragment Mpa-N-Km using Mpa-N-F and Km-R; lane 4 PCR-amplifying the recombinant fragment Km-Mpa-C using Mpa-C-R and Km-F

4 MTB PPS 对 INH-MTB 菌株异烟肼耐药性有影响

4.1 *Pup* 基因过表达可提高异烟肼的 MIC 值

所测得 INH-MTB 菌株、rINH-MTB::*Pup* 菌株、rINH-MTB::*Dop* 菌株、rINH-MTB::*PafA* 菌株、rINH-MTB::*Mpa* 菌株异烟肼的 MIC 值如图 7。结果显示: 与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值相比, rINH-MTB::*Pup* 菌株异烟肼的 MIC 值增加了 8ug/mL, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值相比, rINH-MTB::*PafA* 菌株异烟肼的 MIC 值增加了 1.03 ug/mL, rINH-MTB::*Dop* 菌株、rINH-MTB::*Mpa* 菌株异烟肼的 MIC 值分别降低了 1.03ug/mL、0.68 ug/mL, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

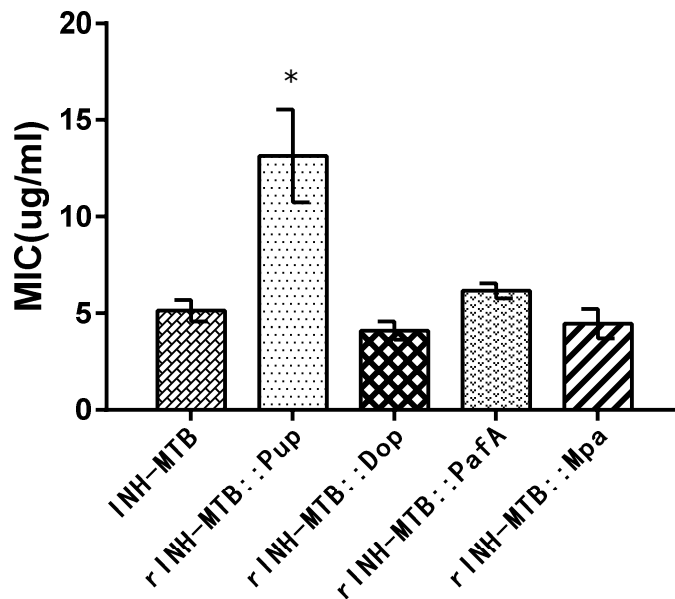


图 7 INH-MTB 菌株及其过表达菌株异烟肼的 MIC 值

Figure 7 MIC determination of INH-MTB strain and its over-expression strains to isoniazid

注: MIC; 最低抑菌浓度, *代表差异显著 $P<0.05$, INH-MTB 组为对照组

Note: MIC; minimum inhibitory concentration, * $P<0.05$, INH-MTB as a control group

4.2 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因或 *Mpa* 基因的缺失均可降低异烟肼的 MIC 值

所测得 INH-MTB 菌株、INH-MTB Δ Pup 菌株、INH-MTB Δ Dop 菌株、INH-MTB Δ PafA 菌株、INH-MTB Δ Mpa 菌株异烟肼的 MIC 值如图 8。结果显示：与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值相比，INH-MTB Δ Pup 菌株、INH-MTB Δ Dop 菌株、INH-MTB Δ PafA 菌株、INH-MTB Δ Mpa 菌株异烟肼的 MIC 值分别降低了 4.82 μ g/mL、4.98 μ g/mL、4.99 μ g/mL、4.9 μ g/mL，差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

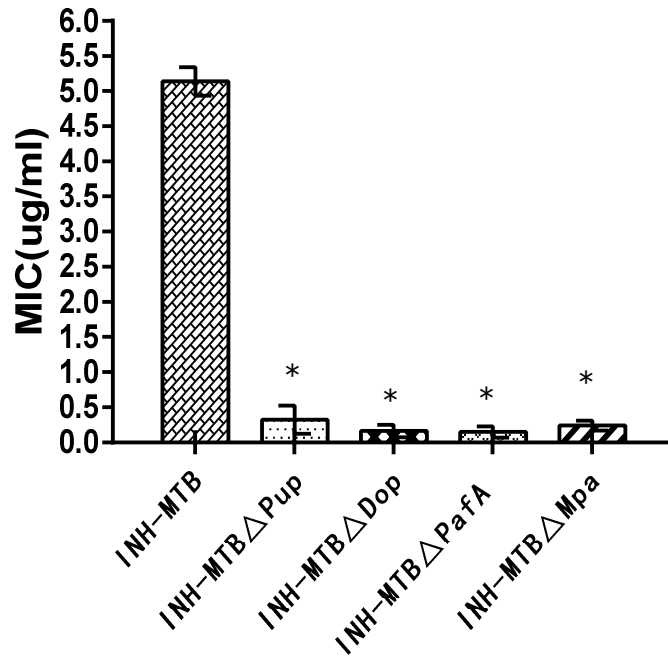


图 8 INH-MTB 菌株及其缺失突变菌株异烟肼的 MIC 值

Figure 8 MIC determination of INH-MTB strain and its deletion mutant strains to isoniazid

注: MIC; 最低抑菌浓度, *代表差异显著 $P<0.05$, INH-MTB 组为对照组

Note: MIC; minimum inhibitory concentration, * $P<0.05$, INH-MTB as a control group

讨论 (Discussions)

在真核生物中,存在一种泛素修饰介导的蛋白质降解机制,泛素通过共价键结合到一些折叠不正确或功能缺失的蛋白质上,从而作为一种降解信号让蛋白酶体识别并降解^[13]。直到 2008 年底, Pearce 等^[14]人在原核生物结核杆菌中发现了一种特殊的、被称作 *Pup* 的小蛋白,它可以通过标记一些蛋白,然后这些被标记的蛋白被蛋白酶体降解掉,进而控制或调节细胞内某些重要的生理过程。被 *Pup* 修饰的蛋白质的功能涉及到以下方面:中间代谢、脂类代谢、信号转导、毒力等,这暗示 *Pup* 的修饰可能是一种全局性的修饰,而且通过修饰介导了原核生物的各种生命活动过程^[15]。

Pearce 等^[14]发现,在体外试验条件下, FabD 和蛋白酶体一起温育,发现该蛋白未被降解,推测该蛋白的降解过程还需要其它辅助因子的参与;随后,通过在大肠杆菌中进行细菌双杂交,发现 *Mpa* 能和 *Pup* 相互作用,因此推测 *Pup* 参与了蛋白质的降解;另外 *pafA* 具有连接赖氨酸和谷氨酸的连接酶活性,当 *pafA* 突变时也导致丙二酰 CoA- 酰基载体蛋白的堆积,因此推测 *PafA* 具有连接 *Pup* 和目的蛋白的功能。同时 Striebel 等^[16]通过质谱结果分析发现, *Pup* 如果想和目的蛋白结合, *Pup* 羧基端 Gly-Gly-Gln 的谷氨酰胺必须经过脱酰胺作用变成谷氨酸,然后才能和目的蛋白上的赖氨酸发生结合,其中脱酰胺酶是 *Dop*, 它的缺失导致目的蛋白的大量堆积以及 *Pup* 修饰的蛋白质检测不到,因此它的脱酰胺作用是 *Pup* 修饰必需的^[17]。可见,在泛素样蛋白蛋白酶体系统中 *Pup* 如果想要顺利的对靶蛋白进行标记进而被蛋白酶体降解,辅助因子的参与极其重要。

过表达菌株的质粒 pMV361 是能够在结核杆菌中表达外源蛋白的大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒载体。一方面质粒 pMV361 含有大肠杆菌的起始复制点;另一方面质粒 pMV361 含分枝杆菌的热休克蛋白 HSP60 的启动子,及 HSP60 下游的多克隆位点和转录终止子^[17],因此 pMV361 是研究结核杆菌较为理想的质粒载体。实验中与 INH-MTB 菌株相比,单纯导入质粒 pMV361 的 INH-MTB 菌株异烟肼 MIC 值无明显变化($P < 0.05$),说明导入质粒 pMV361 不会影响菌株异烟肼的 MIC 值。同时,与 INH-MTB 菌株相比,单纯导入质粒 pMV361 的 INH-MTB 菌株 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因的 mRNA 表达水平无差异,说明质粒 pMV361 不会影响菌株 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因的表达。因此,在后续的试验中选取原始状态的 INH-MTB 菌株作为对照组。

在对 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因缺失突变的 INH-MTB 菌株初筛过程中我们发现,INH-MTB 菌株由于对卡那霉素敏感,因此在含卡那的培养基上无该菌株的生长。而缺失突变菌株由于目的基因 *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 被利用同源重组技术有卡那抗性基因替代,重组菌株因表达卡那抗性基因可以在含卡那霉素的培养基上生存、繁殖,形成菌落。此外,在电泳图上我们发现重组菌落不能扩增出目的基因片段,但是可以扩增出目的基因的替换片段即卡那抗性基因,说明缺失突变菌株构建成功。为了避免假阴性结果的出现,多次重复 PCR 试验,以提高准确性。

本研究结果显示：rINH-MTB::Dop 菌株异烟肼的 MIC 值与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值相比无统计学差异，提示 *Dop* 基因的过表达对细菌耐药性无影响。其可能与 *Dop* 蛋白被部分降解以维持 MTB PPS 的功能稳定有关。在 Yifat Elharar 等^[18]的研究中：检测处于指数生长期的过表达 *Dop* 基因的耻垢分支杆菌菌株的 mRNA 水平，发现与野生型菌株 *Dop* 的 mRNA 水平相比增高 7 倍。然而，过表达 *Dop* 基因的耻垢分支杆菌其 *Dop* 蛋白水平与野生型相比几乎无差异；过表达 *Dop* 基因的耻垢分支杆菌对底物的 *Pup* 化水平与野生型菌株相比几乎无差异。同时该研究还发现低水平的 *Dop* 可有效促使 *Pup* 化的发生，而高水平的 *Dop* 会使 *Dop* 的去酰胺化作用和去 *Pup* 化作用之间发生失衡，更倾向于促使 *Pup* 化的底物发生去 *Pup* 化。因此，高水平的 *Dop* 会致使 *Pup* 化与去 *Pup* 化之间无效循环的发生。这些结果证明了低水平的 *Dop* 蛋白对维持 MTB PPS 功能的稳定是很重要的。

本研究结果显示：与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值相比，INH-MTB Δ Dop 菌株、INH-MTB Δ PafA 菌株异烟肼的 MIC 值明显降低。我们推测，由于 *Dop* 或 *PafA* 的缺失阻断了结核杆菌内底物蛋白的 *Pup* 化过程，造成底物 FabD 的堆积。FabD 是结核杆菌分支菌酸合成过程中的重要酶蛋白，但这些折叠不正确或功能缺失蛋白的堆积可能阻碍了正常细胞壁的合成过程，从而提高抗菌药物通过细胞壁的渗透力来影响结核杆菌的耐药性。Imkamp 和 Festa 等^[17,19]发现 *Dop* 基因的敲除、*PafA* 的突变，可以造成底物蛋白的积累，同时检测不到 *Pup* 标记蛋白的存在，说明 *Dop* 和 *PafA* 对于 *Pup* 与靶蛋白连接是必需的。

本研究结果显示：与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值相比，rINH-MTB::Mpa 菌株、rINH-MTB::PafA 菌株异烟肼的 MIC 值无明显变化。*Mpa* 是 *Pup*-蛋白酶体系统的辅助因子，在它的辅助作用下可完成对靶蛋白的降解，同时 *Mpa* 可以发生 *Pup* 化，最终被蛋白酶体降解。通过 *Pup* 对靶蛋白进行翻译后修饰，不仅使得底物通过蛋白酶体被降解，同时也调节了 PPS 自身酶的活性^[20]。有研究报道 *PafA* 可以通过自身发生 ploy-pupylation，以及在 *Mpa* 缺失的菌株中会出现 *PafA* 的累积^[21]。由于过表达 *Mpa* 基因、过表达 *PafA* 基因对 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值无影响，我们推测结核杆菌有可能通过 *Pup* 标记 *Mpa* 和 *PafA* 蛋白，然后通过蛋白酶体降解以维持 PPS 的稳定。

本研究结果显示：与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值相比，INH-MTB Δ Mpa 菌株、INH-MTB Δ Pup 菌株异烟肼的 MIC 值明显降低。在结核杆菌泛素样蛋白酶体通路中 *Mpa* 即是底物的受体又可以调节蛋白酶体 α 亚基“门”的开关。*Mpa* 有助于结核杆菌在宿主体内的生存，同时有研究显示 *Mpa* 可以使细菌对各种应激行为的耐受性增强，并且在鼠感染模型中缺失 *Mpa* 菌株对鼠的毒力明显降低^[22]。*Pup* 可能具有两种功能，它不仅使靶蛋白带上无序的标签，有利于靶蛋白的降解，而且使底物蛋白成为蛋白酶体识别的标记物。我们推测 *Mpa* 或 *Pup* 的缺失会导致底物蛋白的堆积，使细菌对各种应激行为的耐受性减弱。

本研究结果显示：*Pup* 基因过表达可提高异烟肼的 MIC 值。推测可能是由于 *Pup* 蛋白的增多加速了结核杆菌体内有害蛋白的降解速度，使结核杆菌的适应性增强。在一项研究中我们检测了耻垢分支杆菌体内肌醇-1-磷酸合成酶的稳定性，结果显示：对于过表达 *Pup* 的野生型耻垢分支杆菌其体内的肌醇-1-磷酸合成酶不能被检测到，这可能是由于体内清除肌醇-1-磷酸合成酶的速度加快了^[23]。

结果证实了 MTB PPS 中的 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因、*Mpa* 基因可以影响该菌株的耐药表型。提示 MTB PPS 与 INH-MTB 菌株的耐药性之间有关联。其中结核杆菌内 PPS 的缺失使菌株耐药性降低的现象或许对结核病的临床治疗具有一定的指导作用。通过抑制 MTB PPS 中基因的表达或抑制其翻译后的蛋白功能有可能成为结核病治疗的有效靶点。

第二部分 MTB PPS 对单耐异烟肼结核杆菌耐药性影响的机制研究

材料与方法

(Materials & Methods)

1 材料

1.1 菌株

将实验第一部分中已鉴定的 *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因分别过表达的 INH- MTB 菌株和 *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因分别缺失突变的 INH- MTB 菌株为实验对象。

1.2. 主要试剂及其公司

OADC 细菌增菌液	美国 BD 公司
OXOID 胰蛋白胨	英国 Tryptone 公司
OXOID 酵母提取物	英国 Tryptone 公司
去离子水	北京康为世纪公司
NaCl	上海生物工程有限公司
刃天青	上海 Aladdin 有限公司
异烟肼	上海 Aladdin 有限公司
TWEEN-80	天津化学试剂厂
甲苯	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
乙醚	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
Trixon X-100	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
丙三醇	上海生工生物有限公司
二甲基压枫	山西太谷化工厂
10%的醋酸	天津市坤华化工有限公司
维拉帕米	上海信谊药厂有限公司
氯丙嗪	上海研生实业有限公司
利血平	上海信谊药厂有限公司
羰基氰氯苯胺	天津希恩斯生化科技有限公司

1.3 主要实验仪器

数显电热培养箱	上海博迅实业有限公司
超净工作台	苏净集团安泰空气技术有限公司
微量加样枪	德国 Eppendorf 公司
-80 度超低温冰箱	美国 Thermo 公司
微波炉	日本松下公司
HVE-50 高压消毒锅	日本 HIRAYAMA 公司
9203A 型电热恒温鼓风干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
22SWG 标准接种环	北京玻璃仪器厂
Thermo Scientific 1300 型二级生物安全柜	美国 Thermo Fisher Scientific 公司

1.4 主要试剂配制

1.4.1 Middlebrook 7H9 液体培养基配制

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称取 4.7g 的 7H9 固体状干粉和 1g 的胰酪蛋白胨，再抽取 2mL 的甘油，将上述物质充分混和均匀后加入到 900mL 的蒸馏水中，进行 121℃ 的高压灭菌，时间为 10min，随后保存于置于 4℃ 的恒温冰箱内，临用时加入 OADC 营养添加剂 100mL。

1.4.2 0.1g/L 刃天青显色液

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称取刃天青粉末 5mg，再将其加入 45mL 灭菌超纯水内使其充分溶解后，定容至 50mL，常温保存。

1.4.3 1140ug/ml 维拉帕米

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称 0.114g 维拉帕米粉末与灭菌超纯水 90 mL 充分彻底混合均匀后，将容量定至 100 mL，4℃ 保存。

1.4.4 72ug/ml 氯丙嗪

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称 0.072g 氯丙嗪粉末与灭菌超纯水 900 mL 进行充分彻底混合均匀溶液后，将容量定在 1000mL，4℃ 保存。

1.4.5 384ug/ml 利血平

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称取 0.384g 的利血平粉末，用少许 10% 的醋酸溶解，再用灭菌超纯水定容至 1000mL，4℃ 保存。

1.4.6 240ug/ml 羰基氰氯苯胺

用美国 DEVEN 仪器公司生产的电子天平称取 0.024g 的羰基氰氯苯胺粉末，用少许二甲基亚砜溶解，再用灭菌超纯水定容至 100mL，4℃ 保存。

1.4.7 3%甲苯

将甲苯配制成浓度为 3% 的甲苯溶液。

1.4.8 3%乙醚

将乙醚配制成浓度为 3% 的乙醚溶液。

1.4.9 2.4%TWEEN-80

将 TWEEN-80 配制成浓度为 2.4%TWEEN-80 溶液。

1.4.10 0.15%Trixon X-100

将 Trixon X-100 配制成浓度为 0.15%Trixon X-100 溶液。

2 方法

2.1 结核杆菌的培养及菌悬液的制备

培养 INH-MTB 菌株, *Pup*、*Dop*、*PafA* 和 *Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的各 INH-MTB 菌株至对数生长期, 并将其研磨至呈乳酪样, 用生理盐水稀释至每种菌悬液浓度为 1.0×10^6 /mL。

2.2 配制含不同浓度异烟肼的 7H9 液体培养基

无菌 48 孔板 (1-12 孔) 中各孔异烟肼的终浓度根据各个菌株预实验中 MIC 值的不同, 将异烟肼通过倍比稀释成不同的浓度梯度。在 1-11 孔中异烟肼浓度由高至低, 第 12 孔作为对照孔。

2.3 测定药物外排泵抑制剂对 INH-MTB 菌株, *Pup*、*Dop*、*PafA* 或 *Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的各 INH-MTB 菌株异烟肼 MIC 值的影响

① 4 种泵抑制剂的配制: 维拉帕米、氯丙嗪分别用高压灭菌水配置成浓度为 1140ug/mL、72ug/mL 的储存液。利血平用 10% 醋酸进行溶解, 灭菌水稀释成 384ug/mL 的储存液。羰基氰氯苯胺用二甲基亚砜溶解后加灭菌水稀释成 240ug/mL 的储存液。② 测定药物外排泵抑制剂对各菌株异烟肼 MIC 值的影响: 每次实验前在 7H9 培养液中加入外排泵抑制剂储存液, 使维拉帕米、氯丙嗪、利血平、羰基氰氯苯胺的浓度分别为 142.5ug/mL、18ug/mL、96ug/mL、15ug/mL (4 种外排泵抑制剂的最适浓度为本实验室经过浓度梯度实验筛选确定)。向 2.2 中的含有不同浓度异烟肼的无菌微孔酶标板内加入 100uL 配置好的外排泵抑制剂浓度如上所述。③ 向含不同浓度异烟肼的酶标板各孔中加入稀释好的菌悬液 100uL, 用无菌保鲜膜封板, 放入培养箱内, 37°C 培养 5 天, 第 6 天加入配置好的刃天青显色液 30uL 至第 12 孔, 继续温育 24 小时, 若第 12 孔变为粉红色, 则向其它各 11 孔中分别加入 30uL 的刃天青显色液, 24 小时后观察并记录各孔的颜色变化情况。颜色由蓝色变为粉色则预示着细菌生长, 以保持蓝色的最低药物浓度为该菌株异烟肼的 MIC 值。每个实验平行 7 次。

2.4 测定改变细胞壁通透性的试剂对 INH-MTB 菌株, *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的各 INH-MTB 菌株异烟肼 MIC 值的影响

向 2.2 中的含有不同浓度异烟肼的无菌微孔酶标板内加入 100 μ L 的配置好的改变细胞壁通透性的试剂，其终浓度分别为 0.125%甲苯、0.125%乙醚、0.1%TWEEN-80、0.00625%Trixon X-100（4 种改变细胞壁通透性的试剂的最适浓度为本实验室经过浓度梯度实验筛选确定）。其余步骤同 2.3 ③。每个实验平行 7 次。

2.5 统计学处理

实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件，进行 One-Way ANOVA 单因素方差分析及 LSD-*t* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

(Results)

1 维拉帕米对各结核杆菌菌株异烟肼 MIC 值影响最大

作用浓度为 47.5ug/ml 的维拉帕米、6ug/ml 的氯丙嗪、32ug/ml 的利血平、5ug/ml 的羰基氰氯苯胺对各菌株异烟肼 MIC 值的影响：使 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 32 倍、0 倍、0 倍、0 倍为主；使 rINH-MTB::Pup 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 64 倍、0 倍、2 倍、2 倍为主；使 rINH-MTB::Dop 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 32 倍、0 倍、0 倍、0 倍为主；使 rINH-MTB::PafA 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 32 倍、0 倍、0 倍、0 倍为主；使 rINH-MTB::Mpa 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 32 倍、0 倍、0 倍、0 倍为主；使 INH-MTB Δ Pup 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 16 倍、0 倍、2 倍、2 倍为主；使 INH-MTB Δ Dop 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 8 倍、0 倍、2 倍、2 倍为主；使 INH-MTB Δ PafA 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 4 倍、0 倍、2 倍、2 倍为主；使 INH-MTB Δ Mpa 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 8 倍、0 倍、2 倍、2 倍为主。对菌株异烟肼 MIC 值的影响为 0 倍，意味着该浓度的外排泵抑制剂对菌株的 MIC 值无影响。

2 MTB PPS 通过调控 INH-MTB 菌株的外排泵功能来影响其对异烟肼的耐药

2.1 *Pup* 基因过表达菌株通过调控其外排泵功能提高异烟肼耐药性

INH-MTB 菌株、rINH-MTB::Pup 菌株、rINH-MTB::Dop 菌株、rINH-MTB::PafA 菌株、rINH-MTB::Mpa 菌株在加用外排泵抑制剂（相同浓度和剂量的维拉帕米）前后异烟肼的 MIC 差值如图 9。结果显示：与应用外排泵抑制剂前相比，应用外排泵抑制剂后的 INH-MTB 菌株、rINH-MTB::Pup 菌株、rINH-MTB::Dop 菌株、rINH-MTB::PafA 菌株、rINH-MTB::Mpa 菌株异烟肼的 MIC 分别降低了 4.95ug/mL、12.95ug/mL、3.95ug/mL、5.94ug/mL、4.3ug/mL。与在应用外排泵抑制剂前后 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值相比，rINH-MTB::Pup 菌株异烟肼的 MIC 差值增加了 8ug/mL，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；与在应用外排泵抑制剂前后 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值相比，rINH-MTB::Dop 菌株、rINH-MTB::Mpa 菌株异烟肼的 MIC 差值分别降低了 1ug/mL、0.65ug/mL，rINH-MTB::PafA 菌株异烟肼的 MIC 差值增加了 0.99ug/mL，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

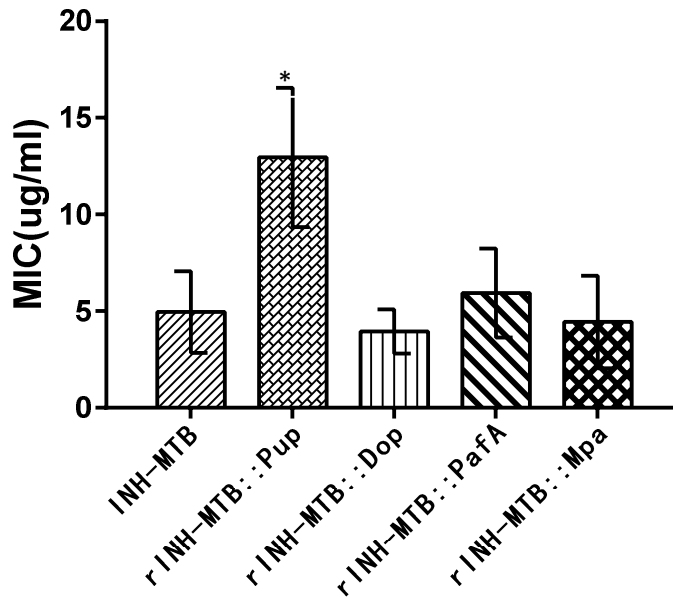


图 9 INH-MTB 菌株及其过表达菌株异烟肼的 MIC 差值

Figure 9 The difference value of MIC in INH-MTB strain and its over-expression strains to isoniazid

注:MIC; 最低抑菌浓度, *代表差异显著 $P<0.05$, INH-MTB 组为对照组

Note: MIC; minimum inhibitory concentration, * $P<0.05$, INH-MTB as a control group

2.2 ΔPup 菌株、 ΔDop 菌株、 $\Delta PafA$ 菌株、 ΔMpa 菌株通过调控其外排泵功能降低异烟肼耐药性

INH-MTB 菌株、INH-MTB ΔPup 菌株、INH-MTB ΔDop 菌株、INH-MTB $\Delta PafA$ 菌株、INH-MTB ΔMpa 菌株在加用外排泵抑制剂（相同浓度和剂量的维拉帕米）前后异烟肼的 MIC 差值如图 10。结果显示：与应用外排泵抑制剂前相比，应用外排泵抑制剂后的 INH-MTB 菌株、INH-MTB ΔPup 菌株、INH-MTB ΔDop 菌株、INH-MTB $\Delta PafA$ 菌株、INH-MTB ΔMpa 菌株异烟肼的 MIC 分别降低了 4.95ug/mL、0.3ug/mL、0.14ug/mL、0.12ug/mL、0.2ug/mL。与在应用外排泵抑制剂前后 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值相比，INH-MTB ΔPup 菌株、INH-MTB ΔDop 菌株、INH-MTB $\Delta PafA$ 菌株、INH-MTB ΔMpa 菌株异烟肼的 MIC 差值分别降低 4.65ug/mL、4.81ug/mL、4.83ug/mL、4.75ug/mL，差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

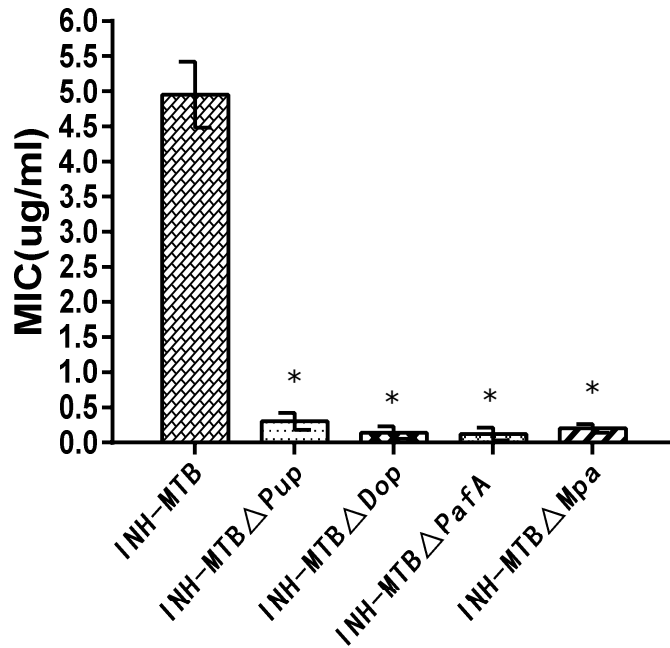


图 10 INH-MTB 菌株及其缺失突变菌株异烟肼的 MIC 差值

Figure 10 The difference value of MIC in INH-MTB strain and its deletion mutant strains to isoniazid

注:MIC; 最低抑菌浓度, *代表差异显著 $P<0.05$, INH-MTB 组为对照组

Note: MIC; minimum inhibitory concentration, * $P<0.05$, INH-MTB as a control group

3 改变细胞壁通透性的试剂对各结核杆菌菌株异烟肼 MIC 值的影响

终浓度为 0.1%TWEEN-80 和 0.00625%Trixon X-100 对各菌株异烟肼的 MIC 值的影响: 使 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 16 倍和 8 倍为主; 使 rINH-MTB::Pup 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 32 倍和 16 倍为主; 使 rINH-MTB::Dop 菌株、rINH-MTB::PafA 菌株、rINH-MTB::Mpa 菌株异烟肼的 MIC 值分别均以下降 16 倍和 8 倍为主; 使 INH-MTB Δ Pup 菌株异烟肼的 MIC 值分别以下降 8 倍和 4 倍为主; 使 INH-MTB Δ Dop 菌株、INH-MTB Δ PafA 菌株、INH-MTB Δ Mpa 菌株异烟肼的 MIC 值分别均以下降 4 倍和 2 倍为主。终浓度分别为 0.125%甲苯和 0.125%乙醚对各菌株异烟肼的 MIC 值的影响: 使 INH-MTB 菌株、rINH-MTB::Dop 菌株、rINH-MTB::PafA 菌株、rINH-MTB::Mpa 菌株异烟肼的 MIC 值均以下降 2 倍为主, 使 rINH-MTB::Pup 菌株异烟肼的 MIC 值均以下降 4 倍为主, 但终浓度分别为 0.125%甲苯和 0.125%乙醚却可以将 INH-MTB Δ Pup 菌株、INH-MTB Δ Dop 菌株、INH-MTB Δ PafA 菌株、INH-MTB Δ Mpa 菌株杀灭, 而无法测得这两种改变细胞壁通透性的试剂对各缺失菌株异烟肼 MIC 值的影响。对菌株异烟肼的 MIC 值的影响为 0 倍, 意味着该浓度的改变细胞壁通透性的试剂对菌株的 MIC 值无影响。

4 MTB PPS 通过调控 INH-MTB 菌株细胞壁的通透性来影响其对异烟肼的耐药

4.1 *Pup* 基因过表达菌株是通过降低其细胞壁的通透性来提高异烟肼的 MIC 值

INH-MTB 菌株、rINH-MTB::*Pup* 菌株、rINH-MTB::*Dop* 菌株、rINH-MTB::*PafA* 菌株、rINH-MTB::*Mpa* 菌株在加用改变细胞壁通透性的试剂（相同浓度和剂量的 TWEEN-80）前后异烟肼的 MIC 差值如图 11。结果显示：与应用改变细胞壁通透性的试剂前相比，应用改变细胞壁通透性的试剂后 INH-MTB 菌株、rINH-MTB::*Pup* 菌株、rINH-MTB::*Dop* 菌株、rINH-MTB::*PafA* 菌株、rINH-MTB::*Mpa* 菌株异烟肼的 MIC 分别降低了 4.86ug/mL、12.64ug/mL、3.86ug/mL、5.83ug/mL、4.16ug/mL。与应用改变细胞壁通透性的试剂前后 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值相比，rINH-MTB::*Pup* 菌株异烟肼的 MIC 差值增加了 7.78ug/mL，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；而与在应用改变细胞壁通透性的试剂前后 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值相比，rINH-MTB::*Dop* 菌株、rINH-MTB::*Mpa* 菌株异烟肼的 MIC 差值分别降低了 1ug/mL、0.7ug/mL，rINH-MTB::*PafA* 菌株异烟肼的 MIC 差值增加了 0.97ug/mL，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

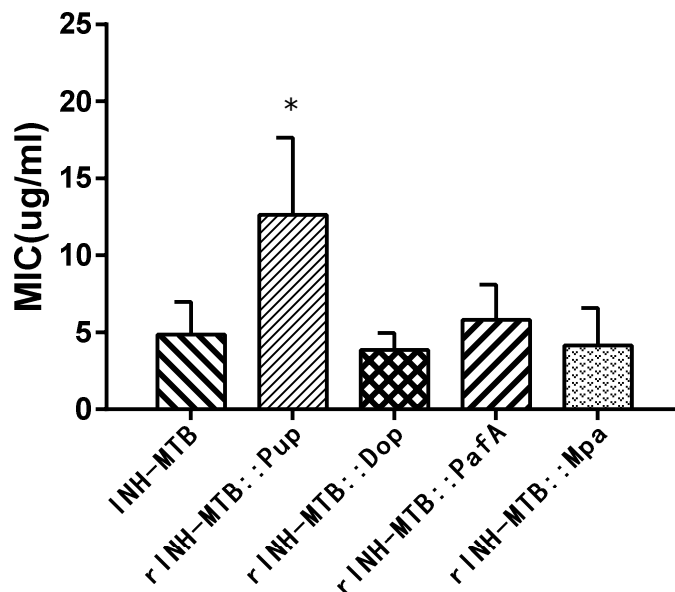


图 11 INH-MTB 菌株及其过表达菌株异烟肼的 MIC 差值

Figure 11 The difference value of MIC in INH-MTB strain and its overexpression strains to isoniazid

注: MIC: 最低抑菌浓度, $*P<0.05$, INH-MTB 为对照组

Note: MIC; minimum inhibitory concentration, $*P<0.05$, INH-MTB as a control group

4.2 ΔPup 菌株、 ΔDop 菌株、 $\Delta PafA$ 菌株、 ΔMpa 菌株是通过提高其细胞壁的通透性来降低异烟肼的 MIC 值

INH-MTB 菌株、INH-MTB ΔPUP 菌株、INH-MTB ΔDop 菌株、INH-MTB $\Delta PafA$ 菌株、INH-MTB ΔMpa 菌株在加用改变细胞壁通透性的试剂（相同浓度和剂量的 TWEEN-80）前后异烟肼的 MIC 差值如图 12。结果显示：与应用改变细胞壁通透性的试剂前相比，应用改变细胞壁通透性的试剂后 INH-MTB 菌株、INH-MTB ΔPUP 菌株、INH-MTB ΔDop 菌株、INH-MTB $\Delta PafA$ 菌株、INH-MTB ΔMpa 菌株异烟肼的 MIC 值分别降低了 4.86ug/mL、0.28ug/mL、0.13ug/mL、0.11ug/mL、0.18ug/mL。与在应用改变细胞壁通透性的试剂前后 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值相比，INH-MTB ΔPUP 菌株、INH-MTB ΔDop 菌株、INH-MTB $\Delta PafA$ 菌株、INH-MTB ΔMpa 菌株异烟肼的 MIC 差值分别降低 4.58ug/mL、4.73ug/mL、4.75ug/mL、4.68ug/mL，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

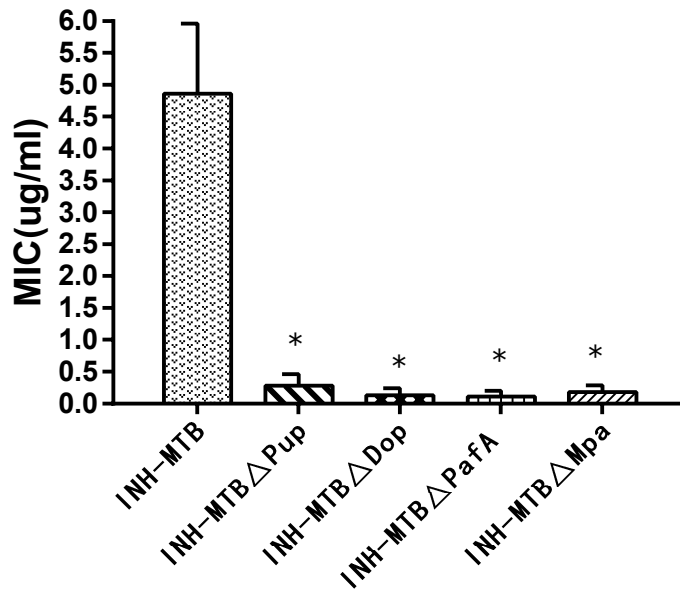


图 12 INH-MTB 菌株及其缺失突变菌株异烟肼的 MIC 差值

Figure 12 The difference value of MIC in INH-MTB strain and its deletion mutant strains to isoniazid.

注: MIC; 最低抑菌浓度, $*P < 0.05$, INH-MTB 为对照组

Note: MIC; minimum inhibitory concentration, $*P < 0.05$, INH-MTB as a control group

讨论

(Discussions)

本实验第一部分研究结果显示:与 INH-MTB 菌株相比,分别 ΔPup 、 ΔDop 、 $\Delta PafA$ 、 ΔMpa 的各 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值明显降低,且与对照组相比具有统计学意义。Imkamp 等^[17,19]发现 *Dop* 基因的敲除、*PafA* 的突变,可以造成底物蛋白的堆积,同时检测不到 *Pup* 标记蛋白的存在。我们推测,*Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 的缺失阻断了 MTB 内底物蛋白的 *Pup* 化过程,造成底物蛋白 FabD、PanB 等的堆积,使细菌对抗生素压力的耐受性减弱。实验结果证实了 MTB PPS 中的 *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因可以影响该菌株的耐药表型,提示 MTB PPS 与 INH-MTB 菌株的耐药性之间有关联,

结核杆菌的外排泵能将细菌细胞内的药物泵出至细胞胞外,使得胞内药物浓度不能有效抑制结核杆菌生长,从而产生抗生素耐受^[24,25]。药物外排泵根据其蛋白氨基酸同源性可分成以下种类:分别为主要易化子超家族(major facilitator superfamily, MFS), ATP 结合盒超家族(ATP binding cassette superfamily, ABC), 耐受小节分裂区家族(resistance nodulation cell division, RND), 小耐多药性家族(small multidrug resistance, SMR)等^[26]。外排系统最早是在细菌和肿瘤细胞中发现的,研究同时发现正是因为外排系统造成了低浓度耐药的发生。同时正是因为外排系统的出现使基因突变的机率提高了,这最终导致了高浓度耐药的发生。耐药菌株的外排系统活动的提高是其产生耐药性的必要条件。

通过对微生物全基因组序列的分析,已经证实和假定的药物外排泵占有所有转运蛋白的 6%~18%^[27]。与 INH-MTB 菌株相比,多重耐药菌株外排泵基因的过表达更为明显,并且外排泵抑制剂对多重耐药菌株的耐药性影响程度更大。*MmpL7* 是一个 RND 家族的转运体。对其功能研究发现,*MmpL7* 蛋白在耻垢分支杆菌中表达时会使异烟肼的 MIC 值升高,但在泵抑制剂作用下其 MIC 值有所降低^[28]。这提示 *MmpL7* 对结核杆菌的耐药作用是通过将药物外排出菌体实现的。

本实验中所选用的维拉帕米、利血平、氯丙嗪、羰基氰氯苯腙,是四种不同类型的已被证实具有外排泵抑制功能的药物。通过刃天青显色法检测到在应用泵抑制剂维拉帕米、利血平、氯丙嗪、羰基氰氯苯腙后,INH-MTB 菌株,*Pup*、*Dop*、*PafA* 和 *Mpa* 基因分别缺失突变和过表达的各 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 值会有不同程度的降低,其中以维拉帕米对上述各菌株异烟肼 MIC 值影响程度最大,利血平、氯丙嗪、羰基氰氯苯腙对实验中各菌株 MIC 值影响程度较小。刃天青显色法检测菌株异烟肼的 MIC 值,该法存在一定的缺陷,因为药物浓度采用倍比稀释法使有误差时最小为 2 倍,需要通过多次验证来减少误差。有研究者认为 MIC 值至少降低 4 倍才有意义^[29]。在这四种外排泵抑制剂中,维拉帕米的抑制作用最强,我们推测可能是由于维拉帕米与外排异烟肼的外排泵具有更高的亲和力。综合以上分析,我们筛选维拉帕米作为试验中的外排泵抑制剂来分析其对各菌株异烟肼 MIC 值的影响。

在加用相同剂量、相同浓度的外排泵抑制剂维拉帕米前后,我们将 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因和 *Mpa* 基因分别缺失突变的各 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值进行了比较。结果提示:上述各菌株异烟肼 MIC 值的下降与 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因、*Mpa* 基因对外排泵功能的调控有关。

到目前为止关于结核杆菌对异烟肼的耐药研究,主要是结核杆菌 *KatG* 基因突变导致活化异烟肼的酶类不能将异烟肼活化,致使异烟肼无法发挥抗菌活性^[30]。但是有研究发现即使 *KatG* 基因未发生突变,结核杆菌也可以对异烟肼产生耐药性,其耐药机制可能与菌株的细胞壁通透性降低使得异烟肼等抗结核药物进入细菌胞内的含量减少有关^[31]。而近年研究发现,MTB PPS 作为介导和调控结核杆菌菌体内蛋白质的重要系统^[32],对结核杆菌细胞壁上的相关蛋白发挥着调控作用,其有可能参与细菌耐药的形成。

结核杆菌的细胞壁由肽聚糖、阿拉伯半乳糖和分支菌酸组成^[33]。分支菌酸是自然界中最大的脂肪酸,它构成了结核杆菌细胞膜外层的基础,并在整个细胞壁干重中占了 40-60%的比例。分支菌酸使结核杆菌具备一些重要的性质,如药物的耐受、毒力、在宿主内持续存在的能力等。分支菌酸的合成与装配为化学药物法治疗结核病提供了潜在的功能靶位,主要是由于分支菌酸在结核杆菌生存与致病中的重要作用^[33,34]。

结核杆菌有着强大的应激和调控机制,使得细菌能够在抗生素压力环境下生存下来并对人体致病^[35]。*Pup* 蛋白酶体系统对结核杆菌的毒力、致病等过程发挥了重要作用,可能是该系统通过调控分泌蛋白或表达蛋白的转录或翻译后水平^[36]。目前有实验已经证实,在结核杆菌体内能被 *Pup* 标记,且被蛋白酶体降解的底物蛋白有 FabD、PanB 和 Ino1 等^[12]。其中底物 Ino1 对结核杆菌的细胞壁脂多糖的形成很重要。FabD 可能参与了脂肪酸的代谢过程,主要体现在 malonyl-CoA 是脂肪酸延长步骤中的必要底物,能将 Malonyl-CoA 的 Malonyl 部分催化转移到 holo-ACP 中,形成 malonyl-ACP 和 CoASH。可见这两种底物对维持细胞壁的完整性是很重要的。我们推测 *Pup* 可能是通过标记相关底物蛋白进而调节细胞壁脂多糖和分枝菌酸的合成,通过改变细胞壁的通透性而影响细菌的耐药性。

本实验结果显示:改变细胞壁通透性的试剂 Trixon X-100、TWEEN-80 能不同程度的降低 INH-MTB 菌株、各过表达菌株、各缺失突变菌株异烟肼的 MIC 值,提示细胞壁的低通透性是各菌株耐药的原因之一。此外 TWEEN-80 对细胞壁通透性的影响程度高于 Trixon X-100。0.125%甲苯和 0.125%乙醚可以使 INH-MTB 菌株、rINH-MTB::*Dop* 菌株、rINH-MTB::*PafA* 菌株、rINH-MTB::*Mpa* 菌株异烟肼的 MIC 值均以下降 2 倍为主,使 rINH-MTB::*Pup* 菌株异烟肼的 MIC 值均以下降 4 倍为主,但此浓度的药物却可以将各缺失突变菌株杀死。推测可能是由于缺失株对外界刺激的耐受性减弱,当 0.125%甲苯和 0.125%乙醚作用于细菌后,对细胞结构造成破坏,影响细胞的正常功能,导致细胞损伤或破裂死亡。刃天青显色法检测菌株异烟肼的 MIC 值,该法存在一定的缺陷,因为药物浓度采用倍比稀释法使有误差时最小为 2 倍,需要通过多次验证来减少误差。有

研究者认为 MIC 值至少降低 4 倍才有意义^[29]。因此，我们筛选出 TWEEN-80 用于后续实验研究和分析。

在加用相同剂量、相同浓度的改变细胞壁通透性的试剂 TWEEN-80 前后，我们将 *Pup*、*Dop*、*PafA* 和 *Mpa* 基因分别缺失突变的各 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值进行了比较，结果提示： Δ *Pup* 菌株、 Δ *Dop* 菌株、 Δ *PafA* 菌株、 Δ *Mpa* 菌株是通过增强其细胞壁的通透性来降低异烟肼的 MIC 值。对于实验中的缺失突变菌株，MTB PPS 功能的异常使结核杆菌体内底物蛋白因不能被有效降解而堆积增多。Xiujun Zhang 等^[37]发现：*FabD* 基因的过表达可以提高游离脂肪酸的生成。这个发现再次证明了 *FabD* 在细胞壁合成中的重要性。但本实验中 *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因分别缺失的 INH-MTB 菌株虽然其体内的 *FabD* 蛋白含量是增多的，但这些菌株异烟肼的 MIC 值是降低的。我们推测堆积的 *FabD* 由于结构异常，不能发生磷酸化而处于无活性状态，不能发挥合成脂肪酸的功能。同时这些异常增多的 *FabD* 可能会反馈性的抑制正常 *FabD* 的生成，进而干扰细胞壁的合成，使其对抗菌药物的通透性增强来降低异烟肼的 MIC 值。同时我们将 rINH-MTB::*Pup* 菌株异烟肼的 MIC 差值与 INH-MTB 菌株异烟肼的 MIC 差值进行了比较，结果提示：*Pup* 基因过表达菌株是通过降低其细胞壁的通透性来提高异烟肼的 MIC 值。我们推测可能是 *Pup* 蛋白的增多加速了对体内异常底物蛋白 *FabD* 的降解速度，反馈性的使正常 *FabD* 的生成增多，进而使脂肪酸的合成增多，通过降低细胞壁的通透性来升高异烟肼的 MIC 值。

本实验初步结果提示：MTB PPS 与结核杆菌耐药性之间具有相关性。并且 MTB PPS 可能是通过调控外排泵的功能或调控细胞壁的通透性来影响结核杆菌对异烟肼的耐药。至于 PPS 是如何调控外排泵的功能来影响耐药性或 PPS 是否影响除 *FabD* 外的其它调控细胞壁合成的关键蛋白来影响耐药性，目前尚不清楚。结核杆菌中 PPS 的发现开启了以蛋白质的降解为调控特征的抗 TB 药物研发的大门，随着研究的不断深入，以 PPS 为靶标的抗 TB 新药的研发将会为耐药 TB 的治疗提供新的有效途径。

结论 (Conclusion)

1. MTB PPS 中 *Pup* 基因过表达, 能增强单耐异烟肼结核杆菌耐药性; MTB PPS 中 *Pup*、*Dop*、*PafA*、*Mpa* 基因缺失能显著降低单耐异烟肼结核杆菌耐药性。
2. MTB PPS 可能通过调控单耐异烟肼结核杆菌外排泵相关蛋白的功能来调控菌株耐药性的产生。
3. MTB PPS 可能通过调控单耐异烟肼结核杆菌细胞壁合成的关键蛋白来调控菌株耐药性的产生。

参考文献

(References)

- [1] Tandon R, Nath M. Tackling drug-resistant tuberculosis: Current trends and approaches[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17(6): 549-570.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016 [R]. Geneva: WHO report, 2016.
- [3] World Health Organization. 10 facts about tuberculosis [EB/OL]. <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/2015-03-01/2015-09-08>.
- [4] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(11): 1320-1330.
- [5] Jagielski T, Grzeszczuk M, Kaminski 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.
- [6] 汪春军, 林进, 张俊杰. 原核生物类泛素蛋白 Pup 蛋白酶体系统的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38 (12): 1091 -1098.
- [7] Pearce MJ, Arora P, Festa RA, et al. Identification of substrates of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome [J]. *EMBO J*, 2006, 25(22): 5423-5432.
- [8] Burns K E, Liu W T, Boshoff H I M, et al. Proteasomal Protein Degradation in *Mycobacteria* Is Dependent upon a Prokaryotic Ubiquitin-like Protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(5): 3069-3075.
- [9] 朱彬, 吴芳, 张万江, 等. 结核分枝杆菌 Pup-蛋白酶体系统与不同毒力结核分枝杆菌致病性的相关性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(7): 583-586.
- [10] Diana Machado, David Pires, Isabel Couto, et al. Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *PLOS ONE*, 2016, 11(2): e0149326.
- [11] Anuj Kumar Gupta, Vishwa Mohan Katoch, Devendra Singh Chauhan, et al. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculosis drugs [J]. *Microb Drug Resist*, 2010, 16, 21-28.
- [12] Richard A. Festa, Fiona McAllister, Michael J. Pearce, et al. Prokaryotic Ubiquitin-Like Protein (Pup) Proteome of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *PLOS ONE*, 2010, 5(1): e8589.
- [13] Hershko A, Ciechanover A, et al. The ubiquitin system [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67(0): 425-479.
- [14] Pearce M J, Mintseris J, Ferreyra J, et al. Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Sciences*, 2008, 322(5904): 1104-1107.

- [15] 谭永聪, 王启军, 赵国屏, 等. 原核生物的蛋白质修翻译后饰[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(3): 197-203.
- [16] Striebel F, Imkamp F, Sutter M, et al. Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(6):647-651.
- [17] Imkamp F, Rosenberger T, Striebel F, et al. Deletion of dop in *Mycobacterium smegmatis* abolishes pupylation of protein substrates in vivo [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 75(3): 744-754.
- [18] Elharar Y, Roth Z, Hecht N, et al. Posttranslational regulation of coordinated enzyme activities in the pup-proteasome system [J]. *P Natl Acad SCI USA*, 2016, 113(12): 1605-1614.
- [19] Festa RA, McAllister F, Pearce MJ, et al. Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* [corrected][J]. *PLOS ONE*, 2010, 5(1): 8589-8592.
- [20] Delley CL, Striebel F, Heydenreich FM, et al. Activity of the Mycobacterial proteasomal ATPase Mpa is reversibly regulated by Pupylation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(11): 7907-7914.
- [21] Xuejie Chen, Chandan Li, Li Wang, et al. The mechanism of *Mycobacterium smegmatis* PafA self-Pupylation [J]. *PLOS ONE*, 2016, 11(3): e0151021.
- [22] Darwin KH, Lin G, Chen Z, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue [J]. *Mol Microbiol*, 2005, 55(2): 561-571.
- [23] Burns K E, Pearce M J, Darwin K H. Prokaryotic Ubiquitin-Like Protein Provides a Two-Part Degron to *Mycobacterium* Proteasome Substrates [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(11): 2933-2935.
- [24] Viveiros M, Leandro C, Amaral L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 22(3): 274-278.
- [25] Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump mediated intrinsic drug resistance in *mycobacterium smegmatis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(7): 2415 -2423.
- [26] 陈敏, 王跃. 分枝杆菌药物外排泵及其在耐药机制中作用[J]. *中国公共卫生*, 2007, 26(3) : 697-699.
- [27] Paulsen IT, Sliwinski MK, Saier MH Jr. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities [J]. *J Mol Biol*, 1998, 277(3): 573-592.
- [28] Pasca MR, Gugliera P, De Rossi E, et al. mmpL 7 gene of *mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *mycobacterium smegmatis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4775-4777.
- [29] Rodrigues L, Machado D, Couto I, et al. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(4): 695-700.

- [30] Christine EC, Adrienne CD, Katalin FM, et al. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities [J]. *Protein Sci*, 2010,19(3): 458-474.
- [31] Makoto N, Mamiko N, Yoshitaka T, et al. A Novel Mechanism of Growth Phase-dependent Tolerance to Isoniazid in *Mycobacteria* [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33): 27743-27752.
- [32] Julie A, Maupin-Furlow. Prokaryotic Ubiquitin-Like Protein Modification [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2014, 68: 155-175.
- [33] L.Kremer, L. GcDover, C. Morehouse, et al. Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 26430-40.
- [34] Yuan Y, Zhu Y, Crane DD, et al. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 29(6): 1449-1458.
- [35] Alonso S, Pethe K, Russell DG, et al. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy [J]. *Proc Natl Acad Sci GSA*, 2007, 104(14): 6031-6036.
- [36] Cerda-Maira F, Darwin KH. The *Mycobacterium tuberculosis* proteasome: more than just a barrel shaped protease [J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(14-15): 1150-1155.
- [37] Xiujun Zhang, Arpita Agrawal, Ka-Yiu San. Improving Fatty Acid Production in *Escherichia coli* Through the Overexpression of Malonyl CoA-Acyl Carrier Protein Transacylase [J]. *Biotechnol Prog*, 2012, 28(1): 60-65.

文献综述

(Review)

耐异烟肼的结核杆菌耐药性的相关性研究

摘要: 即使近些年对结核病的研究在各方面均有所进步, 但是目前人们仍然不能阻止结核病在全球范围内的传播与恶化, 主要是由于耐药菌株的出现及对耐药机制认识的不全面。本文就耐异烟肼菌株产生耐药性的机制做了概览, 发现上述分子机制并不能对耐药究竟是如何产生进行很好的阐述。

关键词: 结核杆菌, 耐药机制, 结核杆菌泛素样蛋白-蛋白酶体系统

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核杆菌感染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。2015 年世界范围内大约有 48 万新发的多重耐药 TB 病例和 10 万耐利福平 TB 病例, 其中近一半病例发生在俄罗斯、印度、中国这三个国家^[1]。与敏感菌株相比, 这些耐药菌株会致使致死率和发病率的增高^[2,3]。最令世界恐慌的是 30 多年来未能开发出新型抗结核药物, 并且没有一种疫苗可以有效预防结核菌的感染, 同时作为目前世界上结核病负担高的国家当中一员的中国, 其中 TB 疫情比较严重的省份地区就有新疆维吾尔自治区。新疆地区的 TB 发病率数年来均在我国 TB 发病率水平的前列^[4], 虽然对 TB 的防治制定了一系列的相关政策法规, 但随着耐药结核杆菌的不断产生和传播, 遏制 TB 的流行任重道远^[5], 对结核耐药机制的了解是遏制及有效治疗 TB 的关键所在。

1951 年合成的抗 TB 药物异烟肼被首次应用在临床, 这意味着 TB 治疗自此踏入到了化学治疗的年代^[6]。异烟肼的结构是比较简单的, 仅仅包含有一个吡啶环和一个酰肼基团, 两部分都在抗结核杆菌中扮演着必不可少的角色, 均具有抗菌活性^[7,8]。虽然异烟肼的结构简单, 但是它的杀菌机制是非常复杂的。异烟肼的作用机制至今仍然没有完全研究清楚, 通过广泛的研究, 大多数研究者都认可异烟肼的作用机理可能为抑制敏感结核杆菌分枝菌酸的生物合成, 从而使细胞壁结构缺陷。分枝菌酸的合成障碍使得细胞壁通透性增高, 因而细胞壁的完整性受到破坏, 使细胞内的重要物质 (如氨基酸、磷酸盐、碳水化合物等) 的丢失导致细菌死亡, 发挥抗菌作用^[9-11]。另外, 由于分枝菌酸是结核杆菌所特有的, 它构成了微生物细胞的脂质双分子层的内部小叶部分, 从而可形成一个有效的屏障, 保护微生物正常生存, 所以异烟肼选择性作用于结核杆菌^[10,12]。

结核杆菌的耐药机制主要分为四种

1 结核杆菌体内药物靶位的改变

对于抗 TB 药物异烟肼, 发现在用于治疗结核杆菌感染患者之后不久, 结核杆菌对其就已经产生耐药性, 特别是在大量单独使用的情况下, 大大降低了抗 TB 药物的治疗效果。目前发现和异烟肼产生耐药性有关的基因包括 *KatG*、*InhA*、*AhpC*、*KasA* 及 *Ndh*^[13-18]。有研究表明结核杆菌的 *KatG* 与 *InhA* 基因发生突变与异烟肼耐药性的产生有

着非常密切的关联^[19, 20]。当 *KatG* 基因发生突变后，导致的结果就是其编码的蛋白过氧化氢一过氧化物酶活性减弱或者完全消失，导致前药异烟肼激活受到阻碍^[21]。到目前为止，有超过一百个由于 *KatG* 基因异常所引起的蛋白突变体的报告，其中最常发现的是氨基酸残基突变 Ser31 SThr，进而导致与异烟肼抗结核杆菌有着密切关系的 INH-NAD 加成化合物的生成受阻，从而引起耐药性的发生^[22]。有文献报道由于 *KatG* 的突变所导致的异烟肼耐药占有耐药的 50%-95 %^[23]。另外，异烟肼的耐药性的产生和 *InhA* 基因发生突变也有着密切关联。但仍有 5%-35%的耐药菌株不存在耐药基因的突变，提示可能存在其他的耐药机制，需要更深一步的研究。这些耐药机制可能涉及结核杆菌的药物主动外排机制或结核杆菌细胞壁的低通透性。结核杆菌自身有很多不同的药物作用的靶点，而上述靶点在抗结核药物杀灭结核杆菌的过程中是不可缺少的。数年来研究结果显示，结核杆菌耐药性的产生机制主要和作用酶基因的碱基或抗结核药物的靶点发生突变关系密切。当前一线的抗结核类药物的作用靶点的突变使得原有的抗结核药物作用蛋白的构象产生了变化。这种现象的出现导致了现有的抗结核的药物作用效果明显降低甚至直接没有效果。最终使原来对临床菌株敏感的抗结核药物变成的对临床菌株耐药的抗结核药物。

2 通过菌体组成成分阻断药物到达细菌体内

结核杆菌耐药机制复杂，与其他病原菌相比结核杆菌具有独特且复杂的细胞壁结构，对结核杆菌菌体构成极强的保护屏障。这种构造赋予了结核杆菌对多种抗结核的药物天然的耐药性。

结核杆菌的细胞壁由分支菌酸、肽聚糖和阿拉伯半乳糖组成^[24]。结核杆菌的细胞壁上的有选择性阳离子的孔蛋白，成功的控制或者阻止了亲水性的小分子的扩散。这大大减低了化合物的渗透性，使得药物进入疏水性高的细胞壁间隙时比较缓慢，这便筑成了对药物的第一道防线，同时因为结核杆菌具有相对应的耐干燥、耐碱等特性，这造成了结核杆菌极难被清掉。结核杆菌的细胞壁组成与其他的细菌有着极大的区别，它的细胞壁中的类脂质的含量大于了 60%，革兰阴性细菌的类脂质的含量只占了大约 20%上下。类脂质使 MTB 表面具有疏水性，是一种复杂的复合物，包含着以下成分：磷脂、蜡质、索状因子、分枝菌酸。作为大自然最大脂肪酸的分支菌酸，是结核杆菌细胞膜外层的基础组成部分，且占了整个细胞壁的干重中的约 40-60%。分支菌酸使结核杆菌具备一些重要的性质，如药物的耐受、毒力、在宿主内持续存在的能力等。由于分支菌酸在结核杆菌生存与致病中的重要作用，分支菌酸的合成与装配为化学药物法治疗结核病提供了潜在的功能靶位^[24, 25]。

3 外排泵降低细菌体内药物含量，使得细菌得以存活

细菌得以存活是因为抗生素进入细胞内杀灭它们的时候，细菌通过外排系统这种自我保护的机制将药物外排。这时细菌就会对外排泵的基因产生过度的表达，进而形成了耐药。结核杆菌也是通过上述外排系统的自我保护机制产生耐药性的，结核杆菌可以编

码数种外排泵来自自我保护，同时也有大量研究已经证实了这些基因在异烟肼、利福平、四环素类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类药物产生耐药性的机制中有一定的作用。仅仅依靠结核杆菌的耐药基因与细胞壁的屏障作用还不能全面的解释结核杆菌产生耐药的机制。一些菌株虽然产生了耐药性但是并没有发现基因的突变，这也提示了结核杆菌产生耐药的机制不止上述途径。研究表明：结核杆菌具有外来药物主动外排系统基因的表达，并且认为这是结核杆菌药物靶标发生突变机制外的另一个重要的耐药性产生的机制。外排系统作为膜上参与代谢的部分蛋白，将抗生素视为外来毒素进而将抗生素排出体外。外排系统最早是在细菌和肿瘤细胞中发现的，研究同时发现正是因为外排系统造成了低浓度的耐药的发生。同时正是因为外排系统的出现使基因突变的机率提高了，这最终导致了高浓度耐药的发生。耐药菌株的外排系统活动的提高是其产生耐药性的必要条件。虽然发现结核杆菌的外排系统的时间不是很久，但这却是对耐药性的产生机制的一个重要补充。

依据蛋白氨基酸的同源性可将药物的外排系统分为很多种类。其中当前相关研究只涉及到了当中几种类型的分支杆菌的外排系统，包括以下几种：主要易化超家族(MFS)的 LfrA、Rv1634、EfpA、Tet(v)、P55、Tap、Rv1258c；属于受小节分裂区家族(RND)的 MmpL；属于小耐多药性家族(SMR)的 Mmr；属于 ATP 结合盒超家族(ABC)的 DrrAB、Pst、Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c 等。

3.1 主要易化子超家族(MFS) MFS 囊括了从细菌到高等的真核生物中的膜转运蛋白，这些膜转运蛋白具有多种高度保守的氨基酸的序列，可以介导许多种底物的转运。此家族的作用底物主要有以下几种药物构成：四环素、氨基糖苷类、氟哌酸、新霉素、氟喹诺酮类等。

3.2 ATP 结合盒超家族(ABC) ABC 转运体主要表达于真核生物及原核生物的细胞膜，进行细胞内、外的物质转运。毒物、药物、多肽、糖类、蛋白等构成了 ABC 转运体的底物。编码 ABC 转运体的基因在 MTB 基因组中的比例大约为 2.5%。已经有至少 37 个不完整或者完整的 ABC 转运体在结核杆菌中被发现^[26]。

3.3 耐受小节分裂区家族(RND) RND 的外排蛋白存在着四个高度保护区，这四个高度保护区由 2 个大环的跨膜片段组成，这是革兰氏阴性菌所特有的。RNA 家族的外膜外排蛋白、外排蛋白与膜融合蛋白构成了三联复合体，让药物通过细胞膜直接排出胞外。与 MFS 相比，RND 家族的外排底物更广泛。对 MTB 基因组研究显示，RND 家族包含了十三个跨膜蛋白。因为这些蛋白只是在结核杆菌中被发现了，因此这 13 个跨膜蛋白被命名为结核杆菌膜蛋白(MmpL)。PAscari 等人^[27]的研究表明耻垢分枝杆菌中的 *MmpL* 基因表达出来时对异烟肼是高度耐药的，此耐药在羧基氰氯苯胺和利血平作用时有所下降。此外，如果能量依赖型的耻垢分枝杆菌外排异烟肼的情况下也可以检测到 *MmpL* 基因的表达。

3.4 小耐多药性家族(SMR) 作为目前已知最小的次级多药外排蛋白的 SMR 家族外排蛋白，只含有 100-120 个氨基酸残基。SMR 家族外排蛋白常常含有 4 个跨膜区，其中前

面的三个跨膜区含有多种保守的氨基酸残基,具有双亲性。底物的跨膜转运是通过上述残基的侧链和底物的疏水区直接作用而介导的。目前在结核杆菌 SMR 家族中,只发现了 *Mmr* 基因。

虽然对结核杆菌的研究证实了正是外排系统赋予了一种或多种药物的耐受性。然而,上述研究大都局限于野生株和其实验突变株。关于外排泵的底物和耐药表型的关系仍旧并未十分明确,还有已经发现的分支杆菌外排系统如何作用于耐多药表型以及其与外排泵耐药表型的关系尚不十分清晰。目前的研究结果表明,耐药性的增加与外排泵的高表达有关,而外排泵的高表达可能是编码外排蛋白的基因或者有关的调控基因发生突变造成的。结核杆菌泛素样蛋白蛋白酶体系统 (*Mycobacterium tuberculosis* ubiquitin-like protein-proteasome system, MTB PPS) 由结核杆菌泛素样蛋白与结核杆菌蛋白酶体组成。MTB PPS 系统介导的蛋白质降解的过程中需要的辅助因子包括: *Dop*、*PafA*、*Mpa*。作为细胞内蛋白降解重要机制的 MTB PPS 系统,通过去酰胺酶 *Dop*, 连接酶 *PafA*, ATP 酶 *Mpa* 等辅助因子的作用下,原核泛素样蛋白 (prokaryotic ubiquitin-like protein, Pup) 能够共价标记许多种类的功能蛋白,同时介导被标记的蛋白通过蛋白酶体分解^[28]。2009 年 Festa^[29]发现了 MTB PPS 作用的 55 个靶蛋白,这些靶蛋白涉及物质中间代谢、膜蛋白、细胞壁、抗毒性因子、信号通路毒性等各个方面。结核杆菌的耐药机制可能与以下因素有关:即 *Pup*-蛋白酶体是一个严谨的系统,*Pup* 和 *Mpa* 基因同时发挥作用,使 *Pup*-蛋白酶体系统调控药物外排泵基因的表达发生改变,进而影响外排泵的功能,影响结核杆菌耐药性^[30]。所以随着对分支杆菌外排系统的基础研究的深入,特别是对结核杆菌全基因组中的假定的药物外排蛋白的功能的鉴定,终将对探明结核杆菌的耐药机制与研发新型抗菌药物产生重大影响。

4 其它影响耐药性的因素

近年研究表明,MTB PPS 主要对结核杆菌菌体内蛋白质的选择性降解进行介导和调控,对结核杆菌在宿主体内的繁殖、渗透调节、滞留性、生长、代谢、毒性、致病性、变异性、趋化性、分化以及其引起的宿主免疫应答等诸多方面均有着重要的调控作用^[31]。与毒力、信号转导、脂类代谢、中间代谢等相关的蛋白具有 8 种功能,且均被 *Pup* 修饰,这在一定程度上提示了 *Pup* 的修饰可能是一种全局性的修饰,并且通过这种全局性的修饰从而介导了原核生物的多种生命活动的过程^[32]。

近年来还有一些研究表明,结核杆菌的耐药机制不仅与治疗过程中应用了抗结核药物等原因导致了结核杆菌染色体上一些基因发生了突变相关,还和宿主体内复杂的微环境、细菌主动外排系统的功能、细菌的滞留特性等非药物的因素有关,这些非药物因素也是引起结核杆菌产生耐药的关键原因。本课题组前期研究结果表明^[33]:暴露于低浓度抗生素压力下的单耐异烟肼结核杆菌 (*Isoniazid* monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*, INH-MTB) 菌株与非暴露条件下相比,两种状态下 INH-MTB 菌株中 *Pup* 基因、*Dop* 基因、*PafA* 基因、*Mpa* 基因的表达有差异。在 Diana 等人^[34]研究中,将 INH-MTB 菌株暴

露于低浓度抗生素压力下,发现大多数外排泵基因的表达水平增高。同时外排系统活动的增强是引起结核杆菌产生耐药的机制之一。MTB PPS 作用的靶蛋白 Icl 的缺失能显著降低结核杆菌的持留能力,提示该系统与结核杆菌耐药具有关联。Inol 作为 MTB PPS 底物蛋白之一,是分支杆菌肌醇第一步合成的关键酶,而分支杆菌随后利用肌醇合成分支硫醇,有研究证明编码分支硫醇基因缺失的分支杆菌对抗生素和外界环境的变化比正常细菌敏感^[35],也提示 MTB PPS 与结核杆菌产生耐药具有一定的关系。MTB PPS 作用的底物 FabD 能将 Malonyl: CoA 的 Malonyl 部分催化转移到 holo-ACP 中,形成 Malonyl-ACP 和 CoASH,而 Malonyl-CoA 是脂肪酸延长步骤中的必要底物,这说明了 FabD 可能是脂肪酸代谢中的重要步骤,而脂肪酸是细胞壁的关键组成成分,提示 MTB PPS 与结核杆菌耐药性之间具有一定的关系。MTB PPS 通过调控与耐药有关的基因的表达和(或)作用于影响耐药性的靶蛋白,来影响结核杆菌的耐药性。但其主要通过某一种或几种机制来影响耐药性还不清楚。对靶蛋白功能的鉴定及与耐药相关基因之间复杂的网络调控作用的研究,将有助于进一步揭示 MTB PPS 在结核杆菌耐药性方面的具体机制。

总之,结核杆菌有着非常复杂的耐药机制,同时若抗生素不同,则其耐药机制也会有差别,并且即使是同一种抗生素产生的耐药往往也是多种机制综合作用的结果^[36]。综上所述随着对异烟肼产生耐药的机制的深入了解,将为研发出应用在临床上的新型的抗菌药物打下一定的基础。

参考文献

- [1] Organization W H. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response [J]. Geneva Switzerland Who, 2010, 35(6): 2171-2178.
- [2] Jeon D S, Kim D H, Kang H S, et al. Survival and predictors of outcomes in non-HIV-infected patients with extensively drug-resistant tuberculosis [J]. International Journal of Tuberculosis & Lung Disease the Official Journal of the International Union Against Tuberculosis & Lung Disease, 2009, 13(5): 594-600.
- [3] Dohhyung K, Heejin K, Seungkyu P, et al. Treatment outcomes and survival based on drug resistance patterns in multidrug-resistant tuberculosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(1):113-119.
- [4] 李月华.新疆结核病流行病学现况调查[D].新疆医科大学, 2012.
- [5] Shao Y, Yang D, Xu W, et al. Epidemiology of anti-tuberculosis drug resistance in a Chinese population: current situation and challenges ahead [J]. BMC Public Health, 2011, 11(1): 110.
- [6] 唐神结, 肖和平. 结核病流行趋势及治疗未来展望[J].中国实用内科杂志, 2012, 32: 565-568.

- [7] Timmins G S, Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(5): 1220-1227.
- [8] Elvira B M, Thomas S L, Peter G F, et al. Isoniazid Preventive Therapy and Risk for Resistant Tuberculosis [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(5): 744-751.
- [9] Huyen M N, Cobelens F G, Buu T N, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(8): 3620-3627.
- [10] Sandy J, Mushtaq A, Holton S J, et al. Investigation of the catalytic triad of arylamine N-acetyltransferases: essential residues required for acetyl transfer to arylamines [J]. *Biochemical Journal*, 2005, 390(1): 115-123.
- [11] Kai J, King D S, Schultz P G. Studies on the Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis [J]. *Bmc Womens Health*, 1995, 117(17): pp5009-5010.
- [12] Bhakta S, Besra G S, Upton A M, et al. Arylamine N-Acetyltransferase Is Required for Synthesis of Mycolic Acids and Complex Lipids in *Mycobacterium bovis* BCG and Represents a Novel Drug Target [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2004, 199(9): 1191-1199.
- [13] Schroeder E K, De S N, Santos D S, et al. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2002, 3(3): 197-225.
- [14] Blanchard J S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1996, 65(65): 215-239.
- [15] Basso L A, Zheng R, Musser J M, et al. Mechanisms of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization of Enoyl Reductase Mutants Identified in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 1998, 178(3): 769-775.
- [16] Glickman M S, Jr J W. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline [J]. *Cell*, 2001, 104(4): 477-485.
- [17] Schroeder E K, De S N, Santos D S, et al. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2002, 3(3): 197-225.
- [18] Oliveira J S, Vasconcelos I B, Moreira I S, et al. Enoyl reductases as targets for the development of anti-tubercular and anti-malarial agents [J]. *Current Drug Targets*, 2007, 8(3): 399-411.
- [19] Silva M S, Senna S G, Ribeiro M O, et al. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of

- Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(9): 4471-4474.
- [20] Ramaswamy S V, Reich R, Dou S J, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2003, 47(4): 1241-1250.
- [21] Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Nature*, 1992, 358(6387): 591-593.
- [22] Vilch ze C, Jr W R J. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61(1): 35-50.
- [23] 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]. *Pneumonologia I Alergologia Polska*, 2013, 81(4): 298-307.
- [24] Kremer L, Dover L G, Morehouse C, et al. Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyl transferase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(28): 26430-26440.
- [25] Yuan Y, Zhu Y Q, Crane D D, et al. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(6): 1449-1458.
- [26] Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 449-467.
- [27] Pasca M R, Gugliera P, Rossi E D, et al. *mmpL7* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Responsible for Isoniazid Efflux in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2005, 49(11): 4775-4777.
- [28] 汪春军, 林进, 张俊杰. 原核生物类泛素蛋白 Pup-蛋白酶体系的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38(12):1091-1098.
- [29] Festa R A, Mcallister F, Pearce M J, et al. Prokaryotic Ubiquitin-Like Protein (Pup) Proteome of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Plos One*, 2010, 5(1): e8589.
- [30] 何丽, 雷英, 吴芳,等. 结核杆菌 Pup-蛋白酶体系与耐药结核杆菌耐药性的相关性研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2014(11):1441-1447.
- [31] 朱彬, 吴芳, 章乐,等. 结核分枝杆菌 Pup-蛋白酶体系与不同毒力结核分枝杆菌致病性的相关性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014(07): 583-586.
- [32] 谭永聪, 王启军, 赵国屏, 等.原核生物的蛋白质修翻译后饰[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38(3):197-203.
- [33] 何丽, 雷英, 张万江, 等.耐药结核杆菌原核类泛素蛋白(Pup)-蛋白酶体系基因表达的研究[J].2015, 6(31):741-747.

- [34] Diana Machado, David Pires, Isabel Couto, et al. Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis [J]. Plos One, 2016, 11(2): e0149326.
- [35] 黄蕾. 抗结核药物作用机制及作用靶点的研究[D].湖北大学, 2006.
- [36] 陆宇,段连山.治疗耐药结核病的药物选择和药物研究进展[J].四川生理科学杂志. 2005, 27(4):172-175.

致谢

时光荏苒，我的硕士研究生生活，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、实验、生活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。

特别感谢章乐副教授、何芳教授、王雪雯教授、王远志教授及吴芳副教授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。

感谢何丽师姐、张玉清师姐、李瑞山师哥、王钊师哥、邬博师哥、朱彬师哥在实验中给予的无私帮助和支持。

感谢柳小玲师姐、王君师姐、梁粟师姐、张培培师姐在学习、生活中给予的帮助。

感谢我的同学朱荟云、武青青、张大龙等在实验过程中给予的无私帮助和支持。

感谢杨俊亭师弟、郭朋师弟、唐苏豫师弟对我的帮助。

感谢王洪洲师弟、赵正涌师弟、赵彦恒师弟对我的帮助。

感谢我的家人对我始终不变的关怀，感谢他们给予的默默支持，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，伴我度过研究生生活的人，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：张帅

2017年11月

作者简介

张帅，女性，汉族，生于1989年5月，籍贯河南。2014年毕业于新乡医学院临床医学专业，获医学学士学位。2014年9月考入石河子大学病理学与病理生理学专业，攻读医学硕士学位，研究方向为感染性疾病的病理生理学，导师张万江教授。


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调控作用及其机制研究》，项目批准号：81260261。
2. 参加了石河子大学高层次人才科研启动项目，项目批准号 NO：RCZX201446。
3. 新疆生产建设兵团医药专项资金资助项目《构建及选育新型结核病疫苗菌株的实验研究》，项目批准号：2012BA022

在学期间发表的文章

1. 张帅，吴芳，吴江东，章乐，朱荟云，张大龙，武青青，张万江. 泛素样蛋白蛋白酶体系统对单耐异烟肼结核杆菌耐药性的影响研究[J]. 石河子大学学报(自科版), 2017, 35(2):163-168.
2. 张帅，张舜文，吴芳，吴江东，章乐，张杰，董江涛，张玉清，柳小玲，梁粟，朱荟云，张大龙，武青青，张万江. 泛素样蛋白蛋白酶体系统对单耐异烟肼结核分枝杆菌耐药性机制研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2017(6):489-494.
3. Shuai Zhang, Shun Wen Zhang, Jiang Dong Wu, Jie Zhang, Jiang Tao Dong, Hui Yun Zhu, Fang Wu, Wan Jiang Zhang. The effect of ubiquitin like protein-proteasome system on the drug resistance of isoniazid monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Jundishapur Journal of Microbiology. (In press).

石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表

研究生姓名	张帅	学制	三年
专业	病理学与病理生理学	研究方向	感染性疾病的病理生理学
<p>学术评语:</p> <p>该生课题为《MTB PPS 对单耐异烟肼结核杆菌耐药性的影响及机制研究》。本课题从 Pup-蛋白酶体系对单耐异烟肼结核杆菌 (INH-MTB) 耐药性的影响及机制方面入手。首先, 通过比较 INH-MTB 菌株与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株, 和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株, 异烟肼 MIC 值的差异, 得出 MTB PPS 对 INH-MTB 菌株的耐药性有影响。此外, 通过加入外排泵抑制剂或改变细胞壁通透性的药物后, 比较分析了 INH-MTB 菌株与 MTB PPS 的四种基因分别过表达的 INH-MTB 菌株, 和 MTB PPS 的四种基因分别缺失突变的 INH-MTB 菌株, 异烟肼 MIC 差值间的差异, 我们推测 MTB PPS 可能是通过调控结核杆菌外排泵的功能或细胞壁的通透性影响了菌株的耐药性, 揭示了 MTB PPS 对 INH-MTB 菌株耐药性的调控作用机理, 为阐明结核杆菌耐异烟肼的机制提供理论依据, 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>本课题立意新颖, 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;">2017年11月2日</p>			