

# 结核分枝杆菌 rrs 和 rpsl 基因突变与二线氨基糖苷类耐药关系分析

林伟 卢子琛 王建华 刘梅 李娜娜 张建勇 张泓 陈玲

**【摘要】** 目的 了解耐二线氨基糖苷类结核分枝杆菌临床分离株 rrs 与 rpsl 基因突变特征及其与耐药的关系。方法 对 136 株活动性肺结核患者痰标本分离的结核分枝杆菌进行菌型鉴定及结核分枝杆菌药敏试验,提取耐二线氨基糖苷类结核分枝杆菌 DNA,应用 PCR 扩增 rrs 和 rpsl 目的片段,并进行测序、比对验证。结果 从 136 株临床结核分枝杆菌中筛选出耐二线氨基糖苷类菌株 25 株(18.3%, 25/136),其中耐卷曲霉素 13 株(9.56%, 13/136)、耐卡那霉素 9 株(6.62%, 9/136)、耐卷曲霉素和卡那霉素 2 株(1.47%, 2/136)、耐卷曲霉素、卡那霉素、阿米卡星 1 株(0.73%, 1/136)。经测序分析,25 株均存在 rrs 和(或) rpsl 基因突变(100%, 25/25),其中双基因联合突变 3 株,共计两种类型: rrs A1401G 和 rpsl AAG43AGG、AAA121AAG (2 株); rrs A1401G 和 rpsl AAG88AGG、AAA121AAG (1 株); rpsl 单基因双突变 3 株,共计两种类型: rpsl AAG43AGG、AAA121AAG (2 株); rpsl GGT11GTT、AAA121AAG (1 株), rpsl 基因的 GGT11GTT 突变尚未见相关文献报道,为新的突变位点;余 19 株为单基因单突变 rpsl AAA121AAG。结论 结核分枝杆菌对二线氨基糖苷类耐药与 rrs 和 rpsl 基因突变有关, rrs A1401G 与 rpsl 基因 GGT11GTT 突变为进一步研究耐药机制以及耐药结核病的快速检测提供了依据。

**【关键词】** 分枝杆菌, 结核; 氨基糖苷类; 突变; rrs; rpsl

**Correlation analysis between mutations in rrs and rpsl genes of Mycobacterium tuberculosis and resistance to second-line-aminoglycosides** LIN Wei, LU Zi-chen, WANG Jian-hua, LIU Mei, LI Na-na, ZHANG Jian-yong, ZHANG Hong, CHEN Ling. Laboratory of Respiratory Medicine, Second Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China  
Corresponding author: CHEN Ling, Email: lingjuncd@163.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the correlation between mutations in rrs and rpsl genes of Mycobacterium tuberculosis and resistance to second-line-aminoglycosides. **Methods** The species identification and drug susceptibility testing of 136 clinical Mycobacterium tuberculosis isolates were conducted by using the proportion method. The genomic DNA was extracted from clinical isolates which were resistant to second-line-aminoglycosides, and used for PCR amplification of DNA fragments specific for rrs and rpsl genes and sequence analysis by means of comparison with the standard laboratory strain (H<sub>37</sub>Rv). **Results** Out of 136 clinical isolates, 25 (18.3%) were resistant to second-line-aminoglycosides, including 13 (9.56%) resistant to capreomycin, 9 (6.62%) resistant to kanamycin-resistant, 2 (1.47%) resistant to capreomycin and kanamycin, and 1 (0.73%) resistant to capreomycin, kanamycin and amikacin. By analyzing the sequencing results with the BLAST program at the NCBI website, rrs and/or rpsl gene mutations were identified in all 25 isolates (100%, 25/25), which included 3 with combined mutations in both genes: A1401G mutation in rrs and AAG43AGG and AAA121AAG mutations in rpsl (2 isolates), and A1401G mutation in rrs and AAG88AGG and AAA121AAG mutations in rpsl (1 isolate); 3 with two mutations in rpsl: AAG43AGG and AAA121AAG (2 strains), and GGT11GTT and AAA121AAG (1 strain). The newly identified mutation at codon 11 of rpsl gene (GGT→GTT) has not been reported previously; and the rest 19 isolates had the point mutation at codon 121 (AAA→AAG) in rpsl gene. **Conclusion** This study further confirmed the correlation between mutations in rrs and rpsl genes of

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.22.013

基金项目: 国家自然科学基金(1160003); 贵州省省长资金临床应用课题专项研究[黔省专合字(2012)123]; 贵州省第五批科技创新人才团队[黔科合(2012)4011]

作者单位: 563003 贵州省, 遵义医学院附属医院呼吸二科 呼吸医学研究室

通讯作者: 陈玲, Email: lingjuncd@163.com

Mycobacterium tuberculosis and resistance to second-line-aminoglycosides. The identification of new mutation in rpsl gene and A1401G mutation in rrs gene will provide new information for further development of rapid detection methods for drug-resistant tuberculosis.

**【Key words】** Mycobacterium tuberculosis; Aminoglycosides; Mutation; rrs; rpsl

自 20 世纪 90 年代来, 全球结核病疫情出现上升趋势, 耐药结核病的出现, 尤其是耐多药结核病和广泛耐药结核病的出现, 使全球结核病防治形势变得日益严峻和复杂。耐多药结核病 (multidrug drug-resistant tuberculosis, MDR-TB) 是指结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 至少对异烟肼和利福平两种抗结核药物同时耐药。广泛耐药结核病 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) 是指结核分枝杆菌至少对利福平、异烟肼耐药, 同时增加对任何一个氟喹诺酮类药物耐药, 以及至少对下述 3 种可注射性药物中的一种耐药: 卡那霉素 (Kanamycin、KAN)、阿米卡星 (Amikacin、AMP)、卷曲霉素 (Capreomycin、CAP)。自 2006 年全球报道首例 XDR 病例以来, 至少 80 国家有 XDR-TB, MDR 患者中的 XDR 平均比率从 2010 年的 5.4%<sup>[1]</sup> 上升至 9.0%<sup>[2]</sup>, 结核病耐药情况呈现增长的趋势。我国 2007 年至 2008 年全国结核病耐药性基线调查发现, 每年新发肺结核患者约 56 万例, 其中 MDR-TB 约 12 万例, XDR-TB 约 1 万例。根据 2012 年世界卫生组织调查显示: 2011 年全球确诊 MDR-TB 患者 310 000 例, 其中印度、中国和俄罗斯占 60%<sup>[2]</sup>。MDR-TB、XDR-TB 患者往往预后较差, MDR-TB 若治疗不当, 就可能进一步发展成 XDR-TB, 后者将面临或已处于无药可治的窘境, 在二线抗结核药物中, 二线氨基糖苷类药物对 MDR-TB 敏感性较高, 常优先用于治疗 MDR-TB<sup>[3]</sup>。因此对二线氨基糖苷类药物耐药机制的研究, 可进一步了解 XDR-TB 发生机制, 提高 MDR-TB 治愈率, 减少 XDR-TB 发生。

氨基糖苷类抗生素 (Aminoglycosides) 是由氨基糖与氨基环醇通过氧桥连接而成的苷类抗生素, 一线氨基糖苷类药物是指最早用于治疗结核病的链霉素 (Streptomycin、SM), 二线主要指 KAN、AMK、CAP, 目前主要用于治疗 MDR-TB。氨基糖苷类抗生素抗菌机制是抑制结核分枝杆菌中蛋白质的合成, 作用点位于结核分枝杆菌内的 30S 核糖体亚基解码区的 A 部位, 由 21 种核蛋白体 (包括 S12) 和 1 种 16S rRNA 组成的, 通过阻碍氨基酸的进位, 影响蛋白质的合成和释放, 从而引发细菌死亡。目前结核分枝杆菌对二线氨基糖苷类药物的耐药机制还不完全清楚, 其可能的机制包括结核分枝杆菌的外排泵降低细胞内的抗生素浓度; rRNA 甲基化酶的功能改变; 氨基糖苷类酶活性的

丧失以及基因突变等, 目前认为 rrs 和 rpsl 基因突变是结核分枝杆菌耐氨基糖苷类药的主要原因之一。rrs 基因突变使 16S rRNA 结构异常, rpsl 突变使核糖体核蛋白 S12 功能异常, 从而阻断抗生素发挥药理作用<sup>[4-7]</sup>。本研究拟了解耐二线氨基糖苷类药临床分离株 rrs 与 rpsl 基因突变特征及其与耐药的关系, 进一步了解结核分枝杆菌耐二线氨基糖苷类药的机制, 以提高 MDR-TB 的治愈率, 减少 XDR-TB 的发生。

## 资料与方法

### 一、结核分枝杆菌临床分离株的来源、培养及药物敏感试验

肺结核患者痰标本来自贵州省遵义医学院附属医院 2008 年 1 月至 2012 年 12 月期间门诊及住院患者, 进行痰培养, 菌型鉴定以及结核菌药物敏感试验 (比例法) 按《结核病诊断实验室检验规程》<sup>[8]</sup> 进行, 分离出耐二线氨基糖苷类药结核分枝杆菌。

### 二、结核分枝杆菌基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

1. 结核分枝杆菌灭活及破壁处理: 用接种环刮取适量新鲜菌落, 置于含少量生理盐水的无菌离心管中, 80 °C 灭活 30 min; 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 各加入 400 μl 1×TE 溶液, 吹打混匀制成菌悬液, 加入 60 μl 溶菌酶溶液, 混匀, 37 °C 孵育过夜。

2. DNA 提取: 采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取 DNA, -20 °C 保存备用, 使用前用无菌的 1×TE 将 DNA 原液稀释为 10 ng/μl 的工作浓度。

3. rrs 及 rpsl 基因的扩增: rrs、rpsl 引物均由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成, 分别为 rrs-F: 5'-GTG TGCAGGTGGTGCATGGC-3'; rrs-R: 5'-ATCCAGTT CTCAAACACCAC-3'; rpsl-F: 5'-GCATGGCCGACA AACAGAAC-3'; rpsl-R: 5'-GCCCCTTGCCTGGCAT CAGC-3', 扩增的 PCR 产物片段为 701 bp 和 440 bp。PCR 总体积为 25 μl, 包括: 10×High Fidelity buffer 2.5 μl、10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μl、20 mmol/L 的上、下游引物各 0.5 μl、ddH<sub>2</sub>O 19.75 μl、High Fidelity Hot Start Pol DNA 聚合酶 0.25 μl、10 ng/μl 的结核分枝杆菌 DNA 模板 1 μl。反应条件 95 °C 2 min, 95 °C 20 s, 60 °C 30 s, 68 °C 1 min, 30 个循环; 68 °C 1 min。PCR 产

物各取 1 μl, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

### 三、rrs 基因测序与分析

将 PCR 产物送至上海立菲技术有限公司(原上海英骏公司)进行 DNA 测序, 引物分别采用 rrs-F 和 rpsl-F。用 NCBI BLAST 在线将所测得的序列与 H<sub>37</sub>Rv 菌株的 rrs、rpsl 标准序列(GenBank: NC\_000962)进行比对, 并分析结果。

## 结 果

### 一、结核分枝杆菌菌株的培养及药敏试验

分离出 136 株结核分枝杆菌菌, 其中耐二线氨基糖苷菌株 25 例(18.3%, 25/136), 敏感菌株 121 株(81.7%, 121/136)。其中单耐 CAP 13 株(9.56%, 13/136), 单耐 KAN 9 株(6.62%, 9/136), 无单耐 AMK 菌株, 同时耐 CAP、KAN 2 株(1.47%, 2/136), 同时耐 CAP、KAN、AMK 1 株(0.73%, 1/136)。

### 二、PCR 产物的片段

应用 rrs-F、rrs-R、spsl-F 和 spsl-R 分别扩增 25 株耐二线氨基糖苷类药的结核分枝杆菌, 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 分别得到 701 bp 和 440 bp 目的片段, 见图 1。

### 三、测序分析

1. rrs 基因测序结果分析: 25 株耐二线氨基糖苷类药物的结核分枝杆菌中, 20 株测序成功, 其中 3 株存在突变(15%, 3/20), 突变类型为 A1401G(图 2), 见表 1。

2. rpsl 基因测序结果分析: 25 株耐二线氨基糖苷类药的结核分枝杆菌中, 测序均成功, 均存在突变(100%, 25/25)。4 株为 rpsl AAG43AGG、AAA121AAG, 1 株为 rpsl AAG88AGG、AAA121AAG; 1 株为 rpsl GGT11GTT、AAA121AAG, 余 19 株为单基因单突变 rpsl AAA121AAG, 见表 1 (rpsl 基因 Gly11Val 见图 3; Lys43Arg 见图 4; Lys88Arg 见图 5; Lys121Arg 见图 6)。

3. rrs 和 rpsl 基因突变结果分析: 25 株耐二线氨基糖苷类结核分枝杆菌中, 均存在 rrs 和(或) rpsl 基因突变, 突变率 100% (25/25), 其中双基因联合突变 3 株, 共计两种类型: rrs A1401G 和 rpsl AAG43AGG、AAA121AAG (2 株); rrs A1401G 和 rpsl AAG88AGG、AAA121AAG (1 株); rpsl 单基因双突变 3 株, 共计两种类型: rpsl AAG43AGG、AAA121AAG (2 株); rpsl GGT11GTT、AAA121AAG (1 株), 余 19 株为单基因单突变 rpsl AAA121AAG, 见表 1。

## 讨 论

16 株耐 CAP 菌株中, 每株均存在 rpsl Lys121Arg 突变, 1 株 rrs 和 rpsl 基因双突变, 突变率为 6.25% (1/16), 在单耐 CAP 中未检测到 rrs 突变, 与 Jugheli 等<sup>[9]</sup>报道在 4 株单耐 CAP 菌株中均发现 rrs C1402T 不相符, 考虑不同地区的结核分枝杆菌菌株, 突变类型可能存在差异<sup>[10]</sup>; 12 株耐 KAN 菌株中检测到 2 株 rrs A1401G 突变, 突变频率为 16.7% (2/12), 与 Jugheli 等<sup>[9]</sup>报道在 78 株耐 KAN 菌株中只检测到 rrs A1401G 突变一致。除每株存在的 rpsl 基因 Lys121 Arg 突变外, 还发现另外 3 种突变形式: Lys43Arg, Gly11Val 和 Lys88Arg, 均是 SM 耐药结核分枝杆菌常见突变位点<sup>[11-14]</sup>, 查看其药敏结果, 发现上述突变的 6 株中 5 株同时耐 SM, 因此该突变可能与菌株耐 SM 有关。另外 1 株不耐 SM 株 rpsl 突变类型为 Gly11Val, 提示 Gly11Val 突变可能与 KAN 耐药有关; 1 株耐 AMK 菌株中发现 rrs 和 rpsl 双突变, 突变率为 100% (1/1), 其中 rrs 突变形式为 A1401G, 回顾该菌株药敏结果为耐 KAN、AMK, 另 2 株耐 KAN 也检测到 A1401G 突变, 提示该位点突变的耐 KAN 菌株容易发生 AMK 耐药, 与李建军等<sup>[15]</sup>报道一致 rrs A1401G 点突变提示菌株在耐 KAN 的基础上有耐 AMK 趋势, 与 Georghiou

表 1 耐二线氨基糖苷类药结核分枝杆菌 rrs 和 rpsl 基因突变形式及氨基酸改变

耐药	菌株数	rrs		rpsl		菌株数
		碱基突变	菌株数	碱基突变	氨基酸突变	
单耐 CAP	13	—	0	AAA121AAG	Lys121Arg	13
				AAG43AGG	Lys43Arg	2
				AAG88AGG	Lys88Arg	1
单耐 KAN	9	A1401G	2	GGT11GTT	Gly11Val	1
				AAA121AAG	Lys121Arg	9
				—	—	—
单耐 AMK	0	—	—	—	—	—
耐 CAP、KAN	2	—	—	AAG43AGG	Lys43Arg	1
				AAA121AAG	Lys121Arg	2
				AAG43AGG	Lys43Arg	1
耐 CAP、KAN、AMK	1	A1401G	1	AAA121AAG	Lys121Arg	1

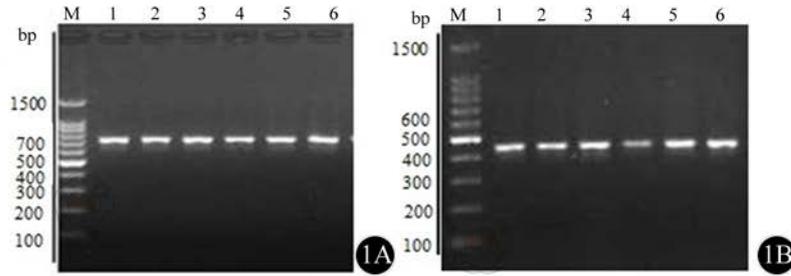


图1 1A: rrs基因PCR扩增结果 (701bp) ; 1B: rpsL基因PCR扩增结果 (440 bp) ; M: 100 bp的Mark, 1~6为临床分离菌株各自的PCR产物

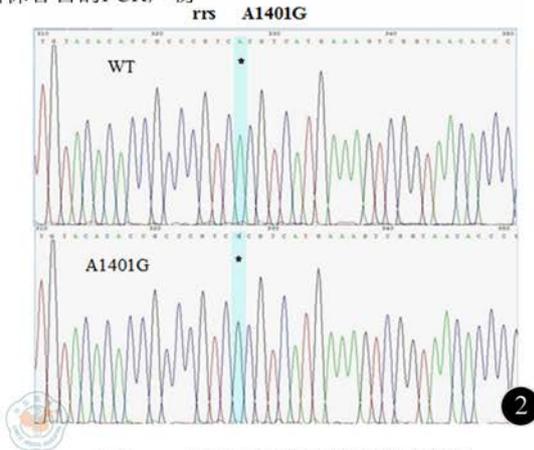


图2 rrs基因1401位点突变测序结果

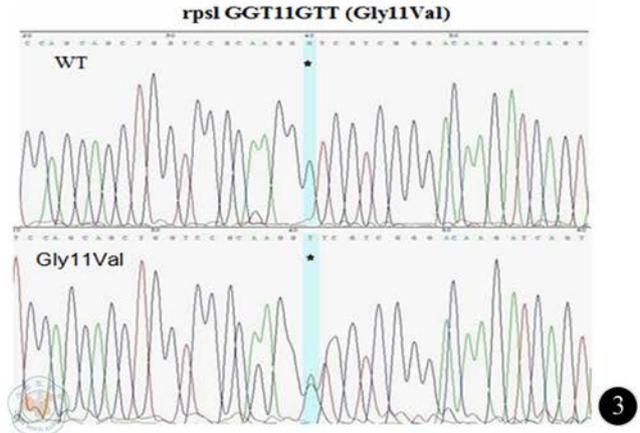


图3 rpsL基因11位点突变测序结果

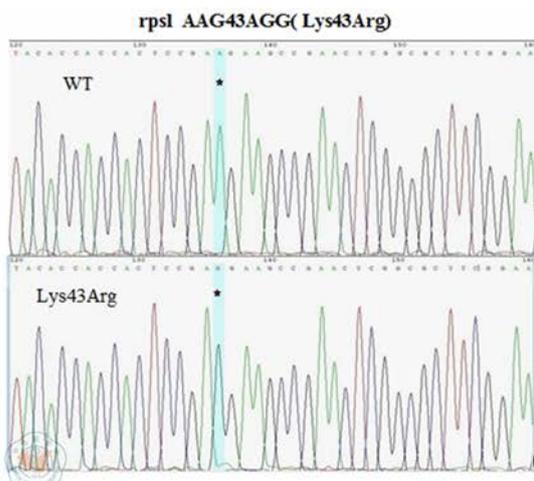


图4 rpsL基因43位点突变测序结果

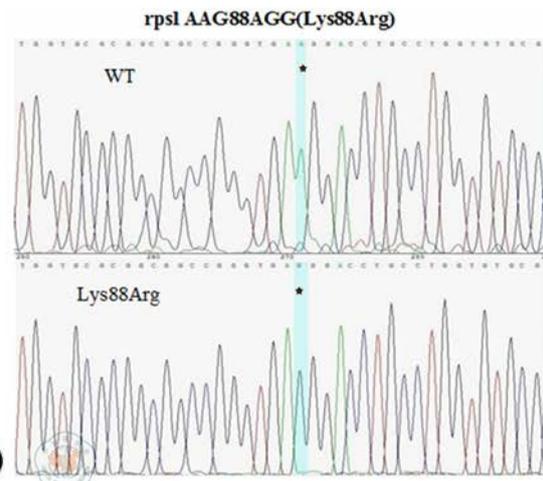


图5 rpsL基因88位点突变测序结果

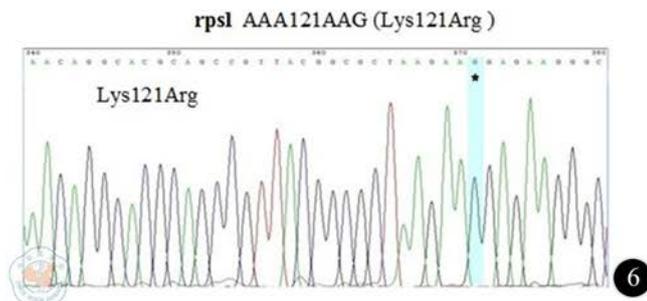


图6 rpsL基因121位点突变测序结果

等<sup>[16]</sup>报道 rrs 基因 A1401G 突变可做为潜在的预测 KAN、AMK 耐药的靶点相符。3 株 rrs A1401G 突变的菌株, 2 株为 XDR, 另 1 株为耐多药菌株。

对比以往相关研究, rpsL 基因上检测的突变: rpsL Gly11Val, 目前尚未见相关报道 (图 3)。25 株耐二线氨基糖苷结核分枝杆菌均发现 Lys121Arg 突变, 提

示其可能为无意义突变,也可能为耐药菌株 *rpsL* 基因特异性突变位点;本研究中 AMK 菌株耐药率为 0.73% (1/136),均低于 CAP(11.76%, 16/136)和 KAN(8.82%, 12/136) 耐药率,与谢永平等<sup>[17]</sup>报道 AMK 耐药率为 0.7% (1/142) 基本一致, Jugheli 等<sup>[9,17]</sup>报道在 145 株耐二线氨基糖苷类菌株中未发现单耐 AMK 株,提示在治疗 MDR-TB 中,在未知药敏情况下可优先选择阿米卡星。对比单耐 KAN、同耐 CAP 和 KAN、同耐 CAP、KAN 和 AMK 菌株 *rrs* 和 *rpsL* 基因突变情况, *rpsL* 联合突变类型 Lys43Arg, AAA121AAG 为共同的突变位点,提示该突变位点可作为预测 CAP 和 KAN 共同耐药的一个潜在靶点,但仍然需要进一步验证。

本研究从 *rrs* 和 *rpsL* 基因突变探讨结核分枝杆菌对 KAN、AMK、CAP 的耐药机制,发现结核分枝杆菌对二线氨基糖苷类耐药与 *rrs* 和 *rpsL* 基因的突变存在相关性。耐药菌株上均存在 *rpsL* 基因突变,部分耐药菌株存在 *rrs* 基因突变,部分菌株上未发现 *rrs* 基因的突变,考虑结核分枝杆菌对二线氨基糖苷类耐药除了 *rrs* 和 *rpsL* 基因突变外,可能还存在其他机制,因此仍需进一步研究明确耐药机制。

#### 参 考 文 献

- [1] Organization, World Health, Multi-drug and extensively drug resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response.
- [2] Organization, World Health, Global Tuberculosis Report 2012.
- [3] 刘一典, 桂徐蔚, 景玲杰, 等. 耐多药结核分枝杆菌临床分离株 30 株对氟喹诺酮类及二线注射类抗结核药敏感性的分析[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7: 1565-1568.
- [4] Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A, et al. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Ch*, 1998, 42: 1295-1297.
- [5] Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, et al. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*, 1996, 274: 1367-1371.
- [6] Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A., et al. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 1220-1225.
- [7] Allen PN, Noller HF. Mutations in ribosomal proteins S4 and S12 influence the higher order structure of 16 S ribosomal RNA. *J Mol Biol*, 1989, 208: 457-468.
- [8] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 49-51.
- [9] Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, et al. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Ch*, 2009, 53: 5064-5068.
- [10] Chen L, Li N, Liu Z, et al. Genetic diversity and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Zunyi, one of the highest-incidence-rate areas in China. *J Clin Microbiol*, 2012, 50: 1043-1047.
- [11] Jnawali HN, Yoo H, Ryoo S, et al. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29: 975-982.
- [12] 温子禄, 沈建国, 张朝宝, 等. 武汉地区结核分枝杆菌氨基糖苷类抗生素耐药分离株 *rpsL* 和 *rrs* 基因特征分析. 上海交通大学学报: 医学版, 2011, 31: 1583-1588.
- [13] Cuevas CB, Cuellar SA, Pasissi CA, et al. *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *J Microbiol Immunol Infect*, 2013, 46: 30-34.
- [14] 贾琼, 石大伟, 赵玉玲, 等. 河南省耐多药结核分枝杆菌链霉素耐药相关基因 *rpsL* 和 *rrs* 突变分析. 中国防痨杂志, 2010, 32: 760-762.
- [15] 李建军, 刘明伟, 曹斌. 卡那霉素和丁胺卡那霉素对结核分支杆菌的耐药不一致性研究. 中国医师进修杂志, 2006, 39: 35-37.
- [16] Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, et al. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One*, 2012, 7: e33275.
- [17] 谢永平, 陈广幸, 黎国梅, 等. 结核分支杆菌对阿米卡星的耐药性研究. 检验医学与临床, 2009, 6: 253-255.

(收稿日期: 2013-10-08)

(本文编辑: 戚红丹)

林伟, 卢子琛, 王建华, 等. 结核分枝杆菌 *rrs* 和 *rpsL* 基因突变与二线氨基糖苷类耐药关系分析 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (22): 9869-9873.