

• 论 著 •

人型支原体拓扑异构酶 IV 氨基酸变异与喹诺酮耐药关系的研究*

于静波^{1,2}, 王璐², 张明磊², 孟冬娅^{2△}

(1. 辽宁医学院研究生院, 锦州 121001; 2. 中国人民解放军沈阳军区总医院检验科, 沈阳 110840)

摘要:目的 研究人型支原体(Mh)对喹诺酮类药物的耐药机制。方法 以泌尿生殖道分泌物中分离的 10 株 Mh 为实验对象, 采用 PCR 测序法对其拓扑异构酶 IV 基因序列进行分析, 推算其氨基酸残基, 并与标准菌株 ATCC23114 及野生株(PG21)基因进行序列比对, 分析 Mh 拓扑异构酶 IV 保守区编码的氨基酸残基变异与对喹诺酮类药物耐药的关系。结果 与野生株相比, 对氧氟沙星和左氧氟沙星耐药的 8 株 Mh 分离株中, 对于 *parC* 基因所编码的氨基酸序列, 6 株 Mh 检出 K(Lys 赖氨酸)134→R(Arg 精氨酸)单一变异, 1 株 Mh 检出 80 位 S(Ser 丝氨酸)→I(Ile 异亮氨酸)变异, 1 株 Mh 同时检出上述两种变异; 对于 *parE* 基因所编码的氨基酸序列, 其中 1 株 Mh 检出 D(Asp 天冬氨酸)426→N(Asn 天冬酰胺)变异, 1 株 Mh 检出 R 447→K 变异。对氧氟沙星和左氧氟沙星敏感的 Mh 菌株及标准菌株均未发现 *parC* 基因和 *parE* 基因所编码的氨基酸残基变异。结论 Mh 临床分离株对氧氟沙星和左氧氟沙星耐药可能与 *parC* 基因所编码的 K 134→R 氨基酸残基变异有关。

关键词:支原体, 人型; DNA 拓扑异构酶 IV; 喹诺酮类; 抗药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)16-1792-02

Correlation between the variation of DNA topoisomerase IV and the resistance to quinolone of Mycoplasma hominis*

Yu Jingbo^{1,2}, Wang Lu¹, Zhang Minglei¹, Meng Dongya¹

(1. The Graduate School of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China;

2. General Hospital of Shenyang Command, Shenyang 110840, China)

Abstract: Objective To understand the drug-resistant mechanisms of Mycoplasma hominis(Mh) against quinolone. **Methods** 10 strains of Mh, isolated from urinary tract secretions, were detected for the gene sequence of DNA topoisomerase IV by using PCR and the amino acid residues were analyzed. The gene sequence of clinical strains were compared with standard strain of ATCC23114 and wild strain PG21. The correlation between the variation of amino acid residues, encoded by the conservative region of topoisomerase IV gene, and the resistance to quinolone was analyzed. **Results** Compared with PG21, among the 8 clinical strains, resistant to Ofloxacin and Levofloxacin, 6 strains were positive with K134R, 1 strain was positive with S80I and 1 strain was positive with the two kinds of variation, according to amino acid sequence encoded by *parC* gene, and 1 strain was positive with D426N and 1 strain was positive with R447K, according to amino acid sequence encoded by *parE* gene. No variation of amino acid residue, encoded by *parC* and *parE* genes, was detected in clinical strains, sensitive to Ofloxacin and Levofloxacin, and ATCC23114. **Conclusion** The resistance to Ofloxacin and Lveofloxacin of clinically isolated strains of Mh might be related the variation of K134R encode by *parC* gene.

Key words: mycoplasma hominis; DNA topoisomerase IV; quinolones; drug resistance

人型支原体(mycoplasma hominis, Mh)是人类泌尿生殖系统感染的常见病原菌, 由于其结构特殊, 对 14、15 环大环内酯类药物天然耐药^[1], 目前喹诺酮类药物是治疗泌尿生殖系统 Mh 感染的常用药物, 但 Mh 对该类药物的耐药性日益增加, 已高达 70% 左右^[2]。对其耐药的分子机制研究, 国内外报道主要是体外筛选诱导耐药株, 并对其基因所编码的氨基酸序列进行分析, 以发现耐药相关性氨基酸变异。由于体内外药动学的差异, 临床分离株与诱导株的耐药机制也可能存在差异。本实验通过设计针对 Mh 拓扑异构酶 IV *parC* 基因和 *parE* 基因的特异性引物, 对耐喹诺酮类药物临床分离的 Mh 株的 *parC* 基因和 *parE* 基因所编码的氨基酸序列进行分析, 探讨其耐药机制, 为临床合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选取本院 2009 年临床分离的 10 株 Mh 为研究对象。Mh 标准菌株 ATCC23114 由珠海丽珠试剂有限公司馈赠。Mh 的培养、鉴定、药物敏感试验结果判断方法见参考文献

献[3]。Mh 对喹诺酮类药物的最小抑菌浓度测定方法见参考文献[2]。所用抗菌药物也由珠海丽珠试剂有限公司提供。

1.2 试剂 所需 PCR 试剂购自于 Takara 公司, 试剂盒含三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTP)、耐热性高保真 DNA 聚合酶(Pyrobest DNA Polymerase), 10× 硼酸盐缓冲液 II、6× 加样缓冲液等。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 选择 Mh DNA 拓扑异构酶 IV 高度保守区序列设计引物^[4]。引物序列如下: *parC* 引物: MH11, 5'-CGT CGG ATT TAT ATT CAA TG-3'; MH13, 5'-GGT GAT TCC TTT AGC ACC GTT-3', 预期产物为 348 bp。 *parE* 引物: MH27, 5'-CTT TCA GGA AAA TTA ACT CCT-3'; MH28, 5'-ATC AGT GTC AGC ATC TGT CAT-3', 预期产物为 297 bp。引物由大连 Takara 公司合成。

1.3.2 菌株 DNA 模板制备 将 Mh 培养阳性的液体培养基震荡混匀后转移至 Ep 管中, 13 000 r/min 离心 5 min, 留取沉淀和

* 基金项目: 全军“十一五”科研基金资助项目(06MB048)。 △ 通讯作者, E-mail: mengdongya@hotmail.com。

少量上清液(含目的 DNA),震荡混匀后作为 PCR 反应的模板。

1.3.3 PCR 扩增及产物测序 将含有 dNTP、MgCl₂、上下游引物的混合液加入到 DNA 耐热酶管中,再分别加入 5 μL 模板及 DNA 聚合酶,充分混合,反应体系为 50 μL,反应条件为 92 °C 预变性 10 min,然后 94 °C 60 s,57 °C 60 s,72 °C 60 s 共 40 个循环,最后再 72 °C 进一步扩增 10 min。取 PCR 扩增产物 5 μL,加入 2 % 的琼脂糖凝胶孔中电泳 30 min(电压 100 V),紫外灯下观察结果。PCR 扩增产物的序列测定由大连 Takara 公司完成。

1.3.4 基因序列比对 所测序列在 PUBMED 进入 nucleotide 内的 nucleotide-nucleotide BLAST(blastn) 进行序列比对。对比 Mh 菌株为野生株(PG21)。

2 结 果

2.1 Mh 菌株 DNA 拓扑异构酶 IV parC 基因扩增及所编码的氨基酸序列分析 PCR 扩增获得 Mh 菌株 parC 基因片段,其产物约 348 bp 大小,与引物预期扩增产物相符合。将上述 PCR 产物测序,测序结果经 PUBMED 数据库比较分析,对氧氟沙星、左旋氧氟沙星都耐药或中介的 8 株 Mh 中,有 7 株检出对应于野生株(PG21) parC 基因所编码的氨基酸序列 134 位 K(Lys 赖氨酸)→R(Arg 精氨酸)变异,2 株检出 80 位 S(Ser 丝氨酸)→I(Ile 异亮氨酸)变异。但在耐药表型为氧氟沙星、左旋氧氟沙星均敏感的临床分离 Mh 株和标准菌株中未发现 parC 基因氨基酸残基变异。

2.2 DNA 拓扑异构酶 IV parE 基因扩增产物及所编码的氨基酸序列分析 PCR 扩增后获得 Mh 菌株 parE 基因片段,其产物约 297 bp,与引物预期扩增产物相符合。将上述 PCR 产物测序,测序结果经 PUBMED 数据库比较分析,临床所分离 Mh 耐药株中有 3 株检出对应于野生株(PG21)中 parE 基因氨基酸序列 426 位 D(Asp 天冬氨酸)→N(Asn 天冬酰胺)变异。Mh7 检出 447 位 R(Arg 精氨酸)→K(Lys 赖氨酸)变异。但在临床分离株耐药表型为氧氟沙星、左氧氟沙星均敏感的临床分离 Mh 株和标准菌株中,均未发现 parE 基因编码的氨基酸残基变异。

表 1 临床分离 Mh 菌株及 ATCC23114 标准菌株对 3 种喹诺酮类药物的 MIC(mg/L)及 parC、parE 所编码的氨基酸残基变异

菌株编号	氧氟沙星	左氧氟沙星	司帕沙星	突变	
				parC	parE
1	R	R	R	K134→R S80→I	—
2	R	I	I	K134→R	—
3	R	R	I	K134→R	D426→N
4	R	R	R	K134→R	—
5	S	S	S	—	—
6	R	R	R	K134→R	—
7	I	I	S	K134→R	R447→K
8	I	I	I	—	—
9	R	R	S	K134→R	—
10	R	R	S	S80→I	—
ATCC23114	S	S	S	—	—

—:无数据。

2.3 临床分离 Mh 菌株及 ATCC23114 标准菌株对喹诺酮类药物的 MIC(mg/L) 采用肉汤稀释法检测临床分离 Mh 菌株

及 ATCC23114 标准菌株对 3 种喹诺酮类药物的 MIC,并对这些菌株的耐药表型与氨基酸变异进行分析,对氧氟沙星、左氧氟沙星均耐药或中介的 7 株临床分离 Mh 株,parC 均有 K134→R 氨基酸变异,具体结果见表 1。

3 讨 论

Mh 对喹诺酮类药物的耐药机制主要是:菌株 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV DNA 序列碱基变异,相应氨基酸改变,使酶蛋白空间构象改变,导致喹诺酮类药物不能与酶蛋白-DNA 复合物结合,从而产生耐药性。DNA 拓扑异构酶 IV 属于 II 型拓扑异构酶,是由 C、E 两个亚单位组成的 C2E2 四聚体,分别由 parC 和 parE 基因编码。有文献报道经氧氟沙星体外诱导 Mh 耐药实验株,parC 基因所编码的氨基酸残基变异主要是 S80→I^[4-6],Bebear 等^[7]于 2003 年检测的 1 株临床分离 Mh 耐药株同时存在 K134→R 和 S80→I 两个氨基酸变异。此次实验结果显示,对氧氟沙星、左旋氧氟沙星均耐药或中介的 8 株临床分离 Mh 中,对于 parC 基因所编码的氨基酸序列,7 株检测出 K134→R 变异,2 株检测到 S80→I 变异。与体外诱导实验相比较,本地区临床流行耐药株的 parC 基因所编码的氨基酸残基变异主要是 K134→R,并非体外诱导实验的主要氨基酸变异是 S80→I。

其中 1 株氧氟沙星和左氧氟沙星均耐药的表型株检测出 parE 基因 D426→N,这一突变与以往报道的对 Mh 诱导株和分离株检测结果一致^[4,8-10]。与以往实验所不同的是 1 株氧氟沙星和左氧氟沙星均中介的表型株被检测出 parE 基因 R447→K。其中有 1 株对 3 种药物均中介的 Mh 未检测出氨基酸变异,其耐药性可能与参考文献^[11]所提出的基因重排机制,控制多药排出泵表达的基因突变机制以及质粒假说、环境因素假说等有关。

体外诱导试验的结论认为,不同的喹诺酮类药物存在不同的首要作用靶位^[12]。司帕沙星作用的首要靶位是 DNA 螺旋酶,而氧氟沙星、环丙沙星、诺美沙星、培氟沙星和曲伐沙星作用的原始靶位是拓扑异构酶 IV。本研究中对氧氟沙星耐药或中介的 7 株 Mh 临床分离株均检出了 parC 基因 K134→R 变异,而氧氟沙星、左氧氟沙星敏感表型株,不管对司帕沙星表型如何,均未检出该氨基酸变异,表明本地区的 Mh 临床流行耐药株的耐药性可能与 parC 基因所编码的氨基酸残基发生 K134→R 变异有关。由于临床标本数量有限另外 3 个氨基酸变异与 Mh 耐喹诺酮类药物的关系还有待进一步确认。

参考文献

[1] Pereyre S, Renaudin H, Charron A, et al. Emergence of a 23S rRNA mutation in mycoplasma hominis associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin[J]. J Antimicro Chemother, 2006, 57(4): 753-756.

[2] 孟冬娅, 薛文成, 陈瑜宁, 等. 2003~2007 年沈阳地区泌尿生殖道支原体感染流行病学及耐药性变异[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(2): 237-240.

[3] Karabay O, Topcuoglu A, Kocoglu E, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of genital mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum in a university hospital in Turkey[J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2006, 33(1): 36-38.

[4] Bebear CM, Renaudin H, Charron A, et al. Alterations in topoisomerase IV and DNA gyrase in quinolone-resistant of mycoplasma hominis obtained in vitro[J]. Antimicrob Agents (下转第 1796 页)

株克隆中均表达为 A 峰,直接测序结果却为 G 峰。上述现象可能与选取的克隆数量有关,如适当扩大测序的克隆数量,可能得到更全面的统计结果。

患者感染了 HBV,经过免疫逃避机制后,可能出现新的病毒株。而在免疫压力下,优势株不断改变,HBV 各病毒株间的比率也是不断变化的,患者体内可能同时有几种病毒基因的不同突变组合,所以会在同一位点表达不同的碱基,造成同一患者不同病毒株的基因序列的差异。在本研究中,实验组的碱基突变率远高于对照组,差异有统计学意义($P=0.000$),说明实验组病毒群体复杂程度更高,这似乎解释了为何实验组更易出现套峰的原因,同时这也可能是导致 HBsAg 与 HBsAb 同时阳性的乙型肝炎患者病程长,预后差的原因之一。

本研究中对照组与实验组的进化距离和同源性差异均无统计学意义。HBV 同 HCV、HIV 类似,也可能存在准种现象^[13]。在病毒复制过程中,由于 HBV 多聚酶的逆转录功能域缺少 3'~5' 校对功能,从而形成核苷酸序列高度一致但又存有差异的一群子代病毒组,即形成准种群,但各准种之间的差别不至于构成不同的基因型或血清型。

综上所述,在免疫压力下,患者血清中的病毒株部分发生突变,使得直接测序图中部分位点出现套峰,而 HBsAg+/HBsAb+ 患者发生碱基突变更多,其病毒基因组的复杂程度更高。然而 HBV 不同克隆株的这些碱基差异不至于构成不同的基因型或血清型,仍然属于准种。另外,直接测序法快速简便^[14],有利于宏观上了解病毒株整体的基因序列状况,在了解其突变特点时可以进行初筛。但要研究特定序列的突变特点,在病毒基因组复杂性较高、序列差异较大时,应对其 PCR 产物进一步克隆纯化后再测序确定其序列。

参考文献

- [1] Luo Z, Xie Y, Deng M, et al. Prevalence of hepatitis B in the southeast of China: a population-based study with a large sample size[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 23(8): 695-700.
- [2] Zhao SS, Tang LH, Dai XH, et al. Comparison of the efficacy of tenofovir and adefovir in the treatment of chronic hepatitis B: a systematic review[J]. *Virology*, 2011, 8: 111.
- [3] Tabor E, Gerety RJ, Smallwood LA, et al. Coincident hepatitis B

surface antigen and antibodies of different subtypes in human serum[J]. *J Immunol*, 1977, 118(1): 369-370.

- [4] Biswas R, Gerlich WH, Schober A, et al. Determination of antibodies against subtypes of hepatitis B surface antigen (HBsAg) (proceedings) [J]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*, 1976, 235(1-3): 310-315.
- [5] Lada O, Benhamou Y, Poynard T, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of "a" determinant variants [J]. *Virology*, 2006, 80(6): 2968-2975.
- [6] Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(9): 1161-1169.
- [7] Colson P, Borentain P, Motte A, et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers [J]. *Virology*, 2007, 367(1): 30-40.
- [8] Zhang Z, Li L, Tian Y, et al. HBsAg/HBsAb double positive hepatitis B virus infection model in vitro and in vivo [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(5): 575-579.
- [9] Zhang ZH, Peng J, Xia JB, et al. S gene mutations in HBsAg/HBsAb double positive chronic hepatitis B patients [J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2009, 17(4): 266-270.
- [10] Wang L, Liu H, Ning X, et al. Sequence analysis of the S gene region in HBV DNA from patients positive for both HBsAg and HBsAb tests [J]. *Hepatol Res*, 2010, 40(12): 1212-1218.
- [11] 王蕾, 刘华, 宁小晓, 等. HBsAg 和 HBsAb 双阳性慢性乙肝患者血清中 HBV 基因型与 S 区突变的关系 [J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2010, 30(10): 1226-1230.
- [12] Guo YB, Hou JL, Dai W, et al. Establishment of the consensus sequence of hepatitis B virus prevailing in the mainland of China [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 1999, 19(3): 197-200.
- [13] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 62.
- [14] 李媛, 侯可雷, 张静, 等. 杪椽 atpB-rbcL 序列 2 种测序方法的比较分析 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(20): 9405-9406.

(收稿日期: 2011-05-20)

(上接第 1793 页)

Chemother, 1998, 42(9): 2304-2311.

- [5] 褚小玲, 孙立元, 朱英, 等. 急性泌尿生殖道症状患者支原体感染及抗生素的选择 [J]. *中国皮肤性病杂志*, 2003, 17(2): 115-116.
- [6] Kenny GE, Young PA, Cartwright FD, et al. Sparfloxacin selects gyrase mutation in first-step mycoplasma hominis mutants, whereas ofloxacin selects topoisomerase IV mutation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(10): 2493-2496.
- [7] Bebear CM, Renaudin H, Charron A, et al. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of ureaplasma spp. and mycoplasma hominis resistant to fluoroquinolones [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(10): 3323-3325.
- [8] 张冉, 吴祺谋, 陈丽丽, 等. 次抑菌浓度喹诺酮类药物体外诱导人型支原体 ParE 基因突变的研究 [J]. *衡阳医学院学报*, 2000, 28(1): 8-10.

- [9] Bebear CM, Bove JM, Charron A, et al. Mutations in gyrA, parC, and parE genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of mycoplasma hominis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(4): 954-956.

- [10] 陈志和, 黄澎志, 吴志周, 等. 人型支原体对 8 种药物的敏感性及喹诺酮类药物耐药基因 gyrA 突变的研究 [J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2003, 19(5): 424-425.
- [11] 张庆, 张洪文. 人型支原体对喹诺酮类药物的耐药机制 [J]. *国外医学计划生育: 生殖健康分册*, 2007, 27(4): 218-222.
- [12] Bebear CM, Bove JM, Bebear C, et al. Characterization of mycoplasma hominis mutations involved in resistance to fluoroquinolones [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(2): 269-273.

(收稿日期: 2011-05-09)