

人型支原体对喹诺酮类药物耐药的分子机制研究

于静波 综述, 孟冬娅[△], 薛文成 审校

(中国人民解放军沈阳军区总医院检验科, 沈阳 110840)

关键词: 支原体, 人型; 喹诺酮类; 耐药机制**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.027**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2011)19-2226-02

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,其单独感染不常见,只有 0.8% 常与解脲脲原体混合感染^[1-2]。其不仅可感染泌尿生殖系统引起子宫内膜炎、盆腔炎、不孕、自然流产、早产、胎膜早破、产后感染等,还可引起非泌尿生殖系统感染,特别是免疫力低下的人群^[3-5]。喹诺酮类药物是治疗 Mh 的常用药物之一,但近年来其耐药性增加有统计学意义,本地区耐药率已高达 70% 左右^[1,6]。其作用机制是作用于细菌或支原体的 II 型 DNA 螺旋酶,即 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV,阻止 DNA 复制、修复,染色体的分离、转录等,从而达到杀菌的目的。DNA 旋转酶由 *gyrA*、*gyrB* 两个亚基组成,分别由 *gyrA*、*gyrB* 基因编码;拓扑异构酶 IV 由 *parC*、*parE* 两个亚基组成,分别由 *parC*、*parE* 基因编码。当碱基发生突变时,导致所编码的氨基酸残基变异,从而全酶改变,阻止喹诺酮类药物进入作用区,发生耐药或交叉耐药现象。现就近年来所研究的 Mh 耐喹诺酮类药物的分子机制综述如下。

1 利用喹诺酮类药物诱导敏感菌株使其耐药,对所筛选出的耐药菌株进行基因序列分析

Bebear 等^[7]于 1996 年用次抑菌浓度喹诺酮类药物对 Mh 野生菌株 PG21 进行诱导耐药,既进行了一步诱导又进行了多步诱导。进行一步诱导的菌株耐药性和基因均未发现任何变化,而进行多步诱导的菌株,耐药程度最高的 4 株均发生 *gyrA* Ser(丝氨酸)83→Leu(亮氨酸),但是 *gyrB* 无论是一步诱导还是多步诱导均未发生任何变化。研究认为 Mh *gyrA* Ser83→Leu 与对喹诺酮类药物的耐药性有关,因此揭示了对 Mh 耐喹诺酮类药物分子机制的研究。

随后有学者又于 1998 年利用氧氟沙星、斯帕沙星逐步诱导 Mh 耐药基因的产生,与以往实验所不同的是,其补充了对 Mh 拓扑异构酶 IV 两个亚基的检测,而且还分析了诱导时间长短与耐药强度的关系^[8]。对于氧氟沙星,经一步诱导产生 6 株耐药株,仅是 *parE* Asp(天冬氨酸)426→Asn(天冬酰胺),第 2 步诱导产生 6 株耐药株,第 3 步诱导产生 5 株耐药株,此时出现了 *gyrA* Ser83→Leu 或 Trp(色氨酸),经第 4 步诱导又产生 2 株耐药株。对于斯帕沙星经一步诱导产生 4 株耐药株,第 2 步诱导产生 7 株耐药株,第 3 步诱导产生 10 株耐药株,与氧氟沙星相比较仅经一步诱导便出现了 *gyrA* Ser83→Leu 或 Ser84→Trp,而 *parC* Glu(谷氨酸)84→Lys(赖氨酸)需第 2 步诱导后才产生。此外还发现了 *parC* 非热点突变 Asp69→Tyr 和 Arg(精氨酸)73→His(组氨酸),并分析了抑菌浓度氧氟沙星、诺氟沙星、盐酸环丙沙星和培氟沙星在液体培养基中传 12 代的耐药菌株的基因突变情况。发现经盐酸环丙沙星和诺氟沙星诱导株均发生 *parE* 基因 Asp426→Asn;经氧氟沙星和培氟沙星诱导株均发生 *parC* Ser(丝氨酸)80→Ile(异亮氨酸);而经诺氟沙星和氧氟沙星诱导株均发生 *gyrA* Ser83→Leu,认为氧氟沙星的首要作用靶位是拓扑异构酶 IV。而 Kenny 等^[9]于

1999 年用斯帕沙星和氧氟沙星诱导 Mh 标准株 GX55 导致耐药,分别于一步诱导和 2 步诱导后检测其耐药和基因突变情况,经斯帕沙星一步诱导株检测到 *gyrA* Ser83→Leu 和 Glu(谷氨酸)87→Lys(赖氨酸);经氧氟沙星一步诱导株检测到 *parC* Ser80→Ile 和 Glu84→Lys。再选择 *parC* Ser80→Ile 株利用氧氟沙星进一步诱导,且第 2 步诱导发生了 *gyrA* Ser83→Leu。选择一步诱导后发生 Glu84→Lys 菌株,利用斯帕沙星进一步诱导产生 *gyrA* Glu87→Lys。选择 *gyrA* Glu87→Lys 的菌株利用斯帕沙星进一步诱导产生 *parC* Ser80→Ile,利用氧氟沙星进一步诱导产生 *parC* Glu84→Lys。选择 *gyrA* Ser83→Leu 突变株利用氧氟沙星和斯帕沙星进一步诱导产生 *parC* Ser80→Ile。且发现经 2 步诱导的氧氟沙星和斯帕沙星的最小抑菌浓度均显著增加。他们认为斯帕沙星诱导 *gyrA* 突变,其首要作用靶位是 DNA 旋转酶,而氧氟沙星诱导 *parC* 突变,其首要作用靶位是拓扑异构酶 IV,长期诱导可导致交叉耐药。

Bebear 等^[10]还于 2000 年利用曲伐沙星对 Mh 标准菌株 PG21 进行多步诱导耐药,一步诱导后仅产生 3 株耐药株,其只存在 1 个位点的突变,即 *parE* Glu84→Leu;2 步诱导产生 12 株突变株,突变位点是 *gyrA* Ser83→Leu, Glu87→Lys, Ala119→Glu 或 Val;经 3 步诱导产生 14 株耐药株,突变位点又增加了 *parC* 的 Ser80、Ser81、Glu84 和 *parE* 的 Leu440。研究者认为经多步诱导产生高水平的耐药,且高水平的耐药株 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV 的基因同时存在突变。表明曲伐沙星在 Mh 上的首要作用位点与金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌一致,均为拓扑异构酶 IV。

国内在这方面也有研究。张冉等^[11]于 2000 年利用喹诺酮类药物(氧氟沙星、左氧氟沙星、盐酸环丙沙星、斯帕沙星)对 Mh 标准菌株 PG21 进行诱导耐药,对所筛选出的耐药株的 *parE* 基因进行序列分析,氧氟沙星和左氧氟沙星所诱导的 *parE* 基因第 70 位 G→A,导致 *parE* Asp426→Asn,他们认为 *parE* 基因第 70 位突变与 Mh 对喹诺酮类药物耐药有关。随后其利用同样的方法对临床敏感株也进行了诱导耐药,在分析 *parE* 的同时还对 *gyrA* 进行分析,除了得出与前述实验一致的结论外,还发现经环丙沙星诱导后的耐药株的 *gyrA* 第 113 位 G→A 导致 Ser83→Leu^[12]。叶萍等^[13]于 2009 年也作了类似的试验,与以往不同的是他们不但进行了长期诱导耐药试验(传 12 代),还进行了短期诱导耐药试验(传 3 代)。结果发现短期诱导仅呈现较低程度的耐药和交叉耐药,且仅斯帕沙星诱导株发生了 *gyrA* Ser83→Leu;长期诱导株呈现高度耐药和交叉耐药,除了环丙沙星诱导株发生 *gyrA* Ser83→Leu 外,还发现斯帕沙星的长期诱导可引起新的突变位点,即 Ser84→Trp。

2 直接检测临床分离耐药株,发现与耐药性有关的基因突变

Bebear 等^[14]于 1999 年首次对 Mh 临床分离株进行耐药机制分析,他们取 5 株对喹诺酮类药物耐药的 Mh 作为实验对

[△] 通讯作者, E-mail: mengdongya@hotmail.com。

象,结果发现 4 株均发生了 gyrA 83Ser→Leu,另 1 株发生了 Glu 87→Lys;未发现 GyrB 突变。认为检测临床分离株对喹诺酮类药物耐药基因与体外诱导所得到的耐药基因突变基本一致。詹惠英糜祖煌^[15]于 2002 年对 2 株耐环丙沙星临床分离株的 gyrA 进行序列分析,结果发现临床分离株与诱导耐药株的耐药机制一致。陈志和等^[16]于 2003 年选取 3 株对氧氟沙星和左氧氟沙星均耐药的临床分离株进行基因测定,结果发现临床分离株也存在与体外诱导耐药一致的耐药机制。

孟冬娅等^[17]于 2009 年对泌尿生殖道分泌物中分离出的 10 株 Mh 的耐药基因进行检测,结果显示对斯帕沙星耐药的 7 株均检测出了 gyrA Ser83→Leu,而对斯帕沙星敏感菌株均没有此变化。表明 Mh 对斯帕沙星的耐药性可能与 Ser83→Leu 有关,自然界流行菌株与体外诱导实验耐药机制一致。此外还发现了 gyrA 基因非热点突变 Ser56→Ile。

3 小 结

综上所述,临床分离株与次抑菌浓度药物体外诱导耐药株的耐药机制一致。通过诱导耐药可以发现不同喹诺酮类药物的首要作用靶位不同:氧氟沙星的首要作用靶位是拓扑异构酶Ⅳ,斯帕沙星的首要作用靶位是 DNA 旋转酶。短时间诱导所致的耐药或交叉耐药水平较低,而长时间诱导所致耐药水平较高。耐药株 gyrA 基因的热点突变是 Ser83→Leu,非热点突变有 Ser83→Trp、Ser84→Trp、Glu87→Lys、Ala119→Glu 和 gyrA Ser56→Ile;gyrB 基因目前尚未发现突变;parC 的热点突变是 Glu84→Lys 和 Ser80→Ile,非热点突变有 Asp69→Tyr 和 Arg73→His;parE 的热点突变是 Asp426→Asn 和 Ser80→Ile,非热点突变有 Leu440。目前,体外诱导实验研究 Mh 对喹诺酮类药物的耐药机制较为透彻,但临床分离株虽然存在与诱导株相同的机制,但是从上述研究表明临床分离耐药株存在着与诱导株不同的突变位点,因此,为了指导临床合理利用喹诺酮类药物治疗 Mh 感染,对临床分离株的耐药机制还有待进一步的研究。

参考文献

[1] 费成英. 泌尿生殖道支原体感染情况及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(4):329-333.
[2] 刘厚明,詹能勇,罗凯,等. 女性泌尿生殖道支原体感染及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(5):653-656.
[3] Nguyen DP, Gerber S, Hohlfield P, et al. Mycoplasma hominis in mid-trimester amniotic fluid: relation to pregnancy outcome[J]. J Perinat Med, 2004, 32(4): 323-326.
[4] Judlin P. Genital mycoplasmas[J]. Gynecol Obstet Fertil, 2003, 31

(11):954-959.
[5] Baezyska A, Svenstrup HF, Fedder J. Development of real-time PCR for detection of mycoplasma hominis[J]. BMC Microbiol, 2004, 4(1):35.
[6] 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.
[7] 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.
[8] 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 Chemother, 1998, 42(9):2304-2311.
[9] 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.
[10] Bebear CM, Grau JA, Charron K, et al. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrAse(gyrA) gene from mycoplasma hominis and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(10):2719-2727.
[11] 张冉,吴移谋,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.
[12] 张冉,吴移谋,向斌,等. 喹诺酮类药物诱导人型支原体耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(5):273-275.
[13] 叶萍,邓超干,王辉,等. 体外获得性人型支原体喹诺酮耐药株 gyrA 基因研究[J]. 中国热带医学, 2009, 9(3):435-437.
[14] 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.
[15] 詹惠英,糜祖煌. 人型支原体 gyrA 基因突变与喹诺酮耐药的关系研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(6):38-39.
[16] 陈志和,黄澎杰,吴志周,等. 人型支原体对 8 种药物的敏感性及其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.
[17] 孟冬娅,王璐,马均,等. 人型支原体对喹诺酮类药物耐药机制的初步研究[J]. 中国皮肤性病性病学杂志, 2010, 24(11):997-999.

(收稿日期:2011-05-27)

• 综 述 •

DNA 甲基化在卵巢癌研究中的进展

马 敏 综述,曹兴建 审校

(南通大学附属第二医院检验科,江苏 226001)

关键词:DNA 甲基化; 阿片肽结合蛋白基因; 卵巢肿瘤; 循环 DNA
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 19. 028 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2011)19-2227-03

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,严重威胁着女性的健康。由于缺少有效的早期诊断方法,其死亡率一直居妇科肿瘤之首。随着对卵巢癌发病机制的深入研究,人们认识到肿瘤的发生不仅与遗传学机制有关,表观遗传异常也是肿瘤发

生、发展的原动力之一,DNA 甲基化作为表观遗传的主要方式之一,显示出与卵巢癌的发生、发展、治疗和预后密切相关,深入研究其作用机制将有助于卵巢癌早期诊断、辅助治疗和预后判断。