258-261.
[5] 陈继明,郭元吉,吴昆昱,等. 乙型流行性感冒病毒两大谱系的起源及其演变特征[J]. 病毒学报,2001,17(4):321-327.
[6] Shao HX. Influenza vaccine: present and future[J]. Int J Virol, 2010,17(4):110-115.
[7] Shi WX, Cui SJ, Hang F, et al. Establishment of testing capacity evaluation system on avian influenza viruses[J]. International J Virology, 2011,18(2):52-54.
[8] Brady RC, Treanor JJ, Atmar RL, et al. Safety and immunogenicity of a sub-virion inactivated influenza A/H5N1 vaccine with or without aluminum hydroxide among healthy elderly adults[J]. Vaccine, 2009,27(37):5091-5095.
[9] Palache B. New vaccine approaches for seasonal pandemic influenza[J]. Vaccine, 2008,26(49):6232-6236.
[10] 史芳芳,李红叶. 不同方法检测流感病毒的敏感度[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(18):2119-2120.
[11] Quattrocchi M, Campa A, Guido M, et al. Evaluation of arapid diagnostic test for influenza viruses A and B[J]. Ig Sanita Pubbl, 2010,66(3):345-356.
[12] 丘立文,廖志勇,王压娣. B 型流感病毒核衣壳蛋白 ELISA 捕获法的建立和临床应用[J]. 广东医学,2009,10(30):1435-1438.
[13] Jia N, Yan ZQ, Liu G, et al. Colloidal gold and dot-ELISA rapid tests for screening influenza A virus[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010,30(10):2267-2269.
[14] Kaiser L, Briones MS, Hayden FG. Performance of virus isolation and Directigen Flu A to detect influenza A virus in experimental human infenction[J]. J Clin Virol, 1999,14(3):191-197.
[15] Chan KH, Lam SY, Puthavathana P, et al. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2, and H5N1[J]. J Clin Virol, 2007,38(2):169-171.
[16] Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza[J]. Science, 2003,302 (5650):1519 - 1522.
[17] 张德玺,朝洪彦,王希良. 一种快速检测甲型流感病毒的方法[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(1):42-45.
[18] 张洁,姚文清,刘敏. 急性呼吸系统疾病暴发疫情多重巢式 PCR 检测分析[J]. 中国公共卫生,2012,28(11):1455-1457.
[19] Janette T, Kenneth M, Julian D, et al. Evaluation of twenty rapid antigen tests for the detection of human influenza A H5N1, H3N2, H1N1, and B Viruses[J]. J Med Virol, 2009,81(11):1918-1922.
[20] 卢亦愚,严菊英,冯燕. 荧光定量 RT-PCR 快速检测乙型流感病毒核酸[J]. 浙江预防医学,2005,17(3):1-3.
[21] Lizheng Guo, Rebecca J, Garten, et al. Rapid identification of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses with H274Y mutation by RT-PCR/restriction fragment length polymorphism assay [J]. Antiviral Res, 2009,82:29-33.
[22] 姚栩,张彩云,陈智伟. 应用 PCR-RFLP 技术进行乙型流感病毒鉴别的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(11):1948-1950.
[23] Moore C, Corden S, Sinha J, et al. Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA[J]. J Virol Methods, 2008,153(2):84-89.
[24] Fung YW, Lau LT, Yu AC. The necessity of molecular diagnostics for avian flu[J]. Nat Biotech, 2004,22:267-269.
[25] Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, et al. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation [J]. J Virol Methods, 2006,135(2):272-275.

(收稿日期:2013-01-19)

·综　　述·

整合子介导细菌耐药调控机制的研究进展*

冯　银,陈　体 综述,伍　勇△审校
(中南大学湘雅三医院检验科,湖南长沙 410013)

关键词:整合子;　耐药基因盒;　启动子;　SOS 反应;　重组位点
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.028　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2013)10-1260-03

自从青霉素出现的半个多世纪以来,抗菌药物一直都是临床抗感染治疗的最重要、最有力武器。然而,近年来,随着抗菌药物的广泛使用甚至是滥用,细菌在抗菌药物的选择性压力作用下不断地产生耐药菌株,并且多重耐药菌株也在不断增加。在对细菌耐药机制的研究中,1989 年 Stokes 和 Hall 提出了整合子-基因盒耐药系统的概念。整合子是细菌特别是革兰阴性菌中的一种可移动性基因元件,通常位于转座子、接合性质粒、噬菌体或染色体上。它能够识别外源性基因盒,通过位点特异性重组捕获或切除耐药性基因盒,并能使捕获的耐药性基因盒表达。在耐药基因的水平转移中,整合子起到了至关重要的作用。

1　整合子的结构和分类

整合子的基本结构由 5′-保守末端(5′-CS)、3′-保守末端(3′-CS)及中间的可变区组成。5′端为高度保守的核心区,含有编码整合酶(integrase, IntI)的基因、整合酶基因(intI)的启动子 Pint、整合子重组位点 attI 及整合子可变区启动子 Pant;可变区含有不同数量和功能的耐药基因盒,也有少数整合子的可变区是不含基因盒的;3′端的结构根据整合子种类不同而异[1](见图 1)。在整合酶的作用下,整合子能够特异性地识别移动性耐药基因盒的 attC 位点而将其捕获,并将基因盒插入到 attI 位点,使耐药基因成为整合子的一部分,也可在 attC 位点特异性地切除耐药基因盒。

根据整合酶基因的不同,现在发现的整合子至少可以分为 9 类。目前,对Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类整合子的研究相对较多,而且它们在细菌耐药方面也起着主要作用。Ⅰ类整合子在临床菌株中

* 基金项目:湖南省自然科学基金(08JJ3069);湖南省科技厅计划(2010FJ3079);中南大学研究生创新基金(2011ssxt197)。
作者简介:冯银,女,检验技师,主要从事临床微生物学与检验研究。　△ 通讯作者,E-mail:wuyong_xy@yahoo.com.cn。

最常见，与 Tn21 转座子家族有关，3′端包含 3 个开放阅读框：季铵盐化合物及溴化乙锭的耐药基因（qacE ⊿1）、磺胺耐药基因（sulI）、功能不明的 ORF5；Ⅱ类整合子与 IntI1 有 46%的同源性，位于 Tn7 转座子及衍生物中，在 3′端有 5 个编码张力蛋白的 tns 基因，且与转座子 Tn7 的转移有关；Ⅲ类整合子与 IntI1 有 61%的同源性，两侧是一对反向重复序列末段，催化环状基因盒的插入与删除[2]。

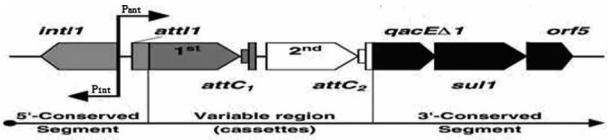

图 1　Ⅰ类整合子结构示意图

2　整合子介导的细菌耐药

国内外大量文献已报道，整合子与细菌耐药密切相关[3-5]。在抗菌药物选择性压力作用下，整合子通过捕获、切除及表达耐药基因盒介导细菌耐药，而整合子功能的表达又是依靠整合酶来催化的。在整合子中，整合酶有两个特异性识别位点：一个是与整合酶基因相邻的 attI 位点，另一个是基因盒上的 attC 位点。整合酶催化的基因盒的整合可以发生在 attI 和 attC 之间、两个 attI 之间或两个 attC 之间，但以 attI 和 attC 之间最常见，效率也最高[6]。整合酶介导的基因盒的切除主要发生在两个 attC 之间。整合酶正是通过这种位点特异性重组机制促进了耐药基因在不同菌株间的传播。耐药基因插入到整合子上后，在上游可变区启动子 Pant 的作用下进行表达。在整合子作用下，细菌可以不断地通过整合酶从周围环境中识别捕获耐药基因盒，一个整合子可以捕获一个或多个耐药基因盒，同时一个耐药基因盒也可以在多个整合子之间传播，致使不同菌株稳定地表达对不同抗菌药物的多重耐药性。

3　整合子的调控机制

3.1　启动子的调控机制　细菌的耐药性需要耐药基因盒的表达来体现，而耐药基因盒的表达需要有启动子来启动。大多数基因盒是不含启动子的，故基因盒的转录需要依靠整合子可变区上的启动子 Pant 来启动。在整合子中，启动子 Pant 位于整合酶基因的阅读框内，因此启动子的差异会影响整合酶的重组活性，同时也影响其催化功能。已有研究证实，可变区启动子 Pant 的种类、强度和与基因盒的距离是影响基因盒转录水平最重要的因素之一。

Pant 启动子从 5′-保守末端的内部边界开始，有 214 个碱基，定位于整合酶基因的编码序列上。目前，根据 Pant 启动子-35 区和-10 区序列的不同，已经命名了 4 种常见的启动子：PcS、PcW、杂合 1 型 PcH1、杂合 2 型 PcH2，它们-35 区与-10 区的间隔都是 17 个碱基。其中 PcS 的强度最强，PcW 的强度最弱，两种杂合型启动子的强度居中。最近，又发现了一种更强的启动子 PcSS 及另外 3 种启动子 Pcln42、Pcln116 和 PcPUO。当前的研究热点主要集中在前 4 种启动子上。另外，在部分Ⅰ类整合子中还存在二级启动子（secondary promoter）P2，它位于 Pant 启动子下游约 150bp 处，是通过在-35 区与-10 区之间间隔的 17 个碱基中插入 3 个 G 碱基而形成的。在多种整合子中，它对 Pant 弱启动子起辅助作用，可以与不同类型的 Pant 启动子组成 Pant-P2 联合体的形式发挥作用[7]。P2 有 2 种类型：一种是-35 区与-10 区之间相隔 14 个碱基的无活性启动子，较常见；另一种是-35 区与-10 区之间相隔 17 个碱基的有活性启动子（见表 1）。

表 1　整合子启动子 Pant 和 P2 结构及强度

启动子	类型	-35 区	-10 区	间隔（碱基数）	强度
Pant	PcS	TTGACA	TAAACT	17	强
	PcW	TGGACA	TAAGCT	17	弱
	PcH1	TGGACA	TAAACT	17	中等
	PcH2	TTGACA	TAAGCT	17	中等
	PcSS	TTGATA	TAAACT	17	超强
	Pcln42	TTGGCA	TAAACT	17	未知
	Pcln116	TTGACA	TGAACT	17	未知
	PcPUO	TCGACA	TAAACT	17	未知
P2	P2	TTGTTA	TACAGT	14	无活性
	P2	TTGTTA	TACAGT	17	有活性

Jové 等[8]首先检测了在不同的整合子中前 4 种 Pant 启动子和 Pant-P2 联合体的强度，而后又检测了这几种整合子中基因盒的类型和表达水平，同时又分别测定了它们整合酶的整合频率和切除效率。最后的研究结果表明，在Ⅰ类整合子中，基因盒的表达主要是由前 4 种 Pant 启动子和 Pant-P2 联合体控制的，而且启动子的强度不同，基因盒的表达水平也不相同，启动强度越强，基因盒表达水平就会越高。另一发现是启动子的强度与整合酶的切除活性呈负相关，即 Pant 启动子的强度越弱，整合酶的活性就越强，而且其切除活性明显高于整合活性。此外，Ⅰ类整合子 Pant 启动子位于整合酶基因的阅读框内，转录方向与整合酶基因相反，二者的转录产物之间有一段互补序列，可能对基因盒和整合酶之间的表达有一定影响。

3.2　SOS 反应（SOS response）的调控机制　SOS 反应也称应急反应，由克罗地亚人 Miroslav Radman 在 1975 年发现和命名，是指染色体 DNA 受到严重损伤时细胞做出的应激反应。DNA 分子严重损伤时，正常的复制和修复系统无法完成 DNA 的复制，此时会启动应急反应。与 SOS 反应密切相关的蛋白有两种：LexA 蛋白和 RecA 蛋白。LexA 蛋白是一种阻遏蛋白，它是 SOS 反应中的主要控制蛋白。SOS 系统包括 42 个功能不同的基因，这些基因共用上游的同一段序列——SOS 盒。这些基因能够编码功能性蛋白，这些蛋白具有稳定复制叉、修复 DNA、促进跨损伤合成和阻止细胞分裂的能力。在正常情况下，LexA 阻遏蛋白与 SOS 盒结合附着在 SOS 基因启动子区域的高特异性结合位点上，使 SOS 基因群无法表达。当细菌处于不利环境中导致 DNA 受到损伤无法进行复制时，就会产生游离的单链 DNA（ssDNA）片段，ssDNA 片段非特异性结合在重组蛋白 RecA 上而使 RecA 蛋白激活，在其催化作用下，LexA 蛋白发生自动裂解失去活性而从 SOS 盒上脱离，从而使 SOS 基因群表达，诱发 SOS 反应[9]。

研究表明，当细菌暴露于抗菌药物环境中时，可以通过诱发自身的 SOS 反应来修复抗菌药物对 DNA 带来的损伤，从而使 DNA 恢复复制而继续生存[10-11]。Hastings 等[12]也发现，抗菌药物诱导的 SOS 反应能够促进耐药基因盒的整合与转移。于是就有学者研究发现了 SOS 反应与整合子之间的相互作用：当某些抗菌药物（甲氧苄啶、喹诺酮类及 β-内酰胺类）作用于细菌后，会诱发细菌的 SOS 反应，而 SOS 反应会促进细菌整合子中整合酶的表达[13-14]。Cambray 等[15]通过对大肠杆菌和霍乱弧菌的研究发现：在整合酶基因 Pint 启动子上存在 LexA 蛋白的结合位点，称为 LexA 蛋白盒（LexA box），当 LexA 蛋

白与 LexA 蛋白盒结合时，整合酶的表达明显提高。这表明 LexA 蛋白通过 Pint 启动子上结合位点来控制整合子中整合酶基因的表达，从而影响整合子上的耐药基因盒的重组及表达。

3.3　重组位点的调控机制　在细菌整合子中，耐药基因盒的整合和切除都是通过位点特异性重组来完成的，因此参与重组的两个特异性位点 attI 和 attC 的地位就显得尤为重要。attI 位点位于 5′保守末端，相对比较保守，长度为 40～70 bp。attI 位点在 5′末端有一个重组核心位点，序列为 GTTRRRY，重组位点也位于核心位点 GTT 中的 G 与 T 之间。研究发现，Ⅰ类整合子的整合酶主要结合在 attI 位点上，它与 attC 位点结合的能力较弱。整合酶在 attI 位点上的结合域有 4 个，其中有 3 个结合域都含有 GTTA 序列，这些序列与核心位点的序列很相似，这说明 GTTA 是整合酶识别中最重要的序列。在Ⅰ类整合子中，整合酶主要与双链的 attI 位点结合，在重组交叉点左侧 24～37 bp 的位置有一个长度为 14 bp 的区域，它是重组发生的关键位点，与整合酶的结合最强。在重组交叉点左侧 41～55 bp 的位置有一个不完全的正向重复序列，这个序列上含有一个较弱的整合酶结合位点。结合位点上任何一个碱基对发生改变都可以导致结合位点与整合酶结合强度的改变。

attC 位点位于基因盒上的 3′末端，通常长度有 57～141 bp，由于第一个被发现的 attC 长度有 59 bp，因此 attC 又被称为 59 碱基元件(59base elements，59be)。不同的 attC 位点有一部分相似的特征：attC 位点两端都各存在着长度为 7 个碱基对的保守片段，一个称为核心位点(CS)，序列为 GTTRRRY；另一个称为反向核心位点(ICS)序列为 RYYYAAC。反向核心位点与核心位点之间有一段长度和序列不同的回文序列。基因盒的切除主要发生在两个 attC 位点之间。attC 位点的两条 DNA 链一条被称为顶链(ts)，一条被称为底链(bs)，Bouvier 等[16]研究发现在 attC 位点上基因盒的整合和切除主要在底链上进行，因为整合酶会特异性地结合在 attC 位点的底链上。当切除发生时，底链发生折叠，由于不完全的配对就会产生一些茎环结构，在这些茎环结构中未配对的碱基被称为螺旋外碱基(EHB)。EHB 在整合酶的识别过程中具有非常重要的作用。Larouche 等[17]通过研究对比 5 种不同类型的整合酶与不同的 EHB 相结合时的切除效率发现，如果 EHB 中碱基的顺序和距离不同，基因盒被切除的难易程度也不同；对于同一种 EHB，不同种类的整合酶的切除效率也不同。

4　小　　结

当前，细菌对抗菌药物的耐药现象日趋严重。探讨细菌的耐药机制已成为研究的重点和热点。整合子作为介导细菌耐药的重要因素之一，它的发现为细菌耐药机制的研究带来了新的方向。现在国内外对整合子的研究已从最初的筛选检测深入到了对其调控机制探索的领域。虽然研究已经发现了启动子、SOS 反应和重组位点等因素与整合子捕获、切除及表达耐药基因盒之间具有一定联系，但其具体调控机制尚不清楚。另外，还有一些因素，如整合子的 3′保守末端、整合酶基因上的侧翼序列以及细菌细胞中的辅助蛋白等，它们对整合子的作用也值得进一步探讨。鉴于整合子与细菌耐药之间的密切联系，深入探寻整合子的调控机制已迫在眉睫。研究整合子不仅可以为人类寻找沉默耐药基因、解决整合子在临床菌株间的传播提供一个良好的研究基础，同时，也能为寻找减缓或控制细菌耐药的途径开辟新的思路。

参考文献

[1] Alonso H, Gready J E. Integron-sequestered dihydrofolate reductase: a recently redeployed enzyme[J]. Trends Microbiol, 2006, 14(5): 236-242.

[2] Correia M, Boavida F, Grosso F, et al. Molecular characterization of a new class 3 integron in Klebsiella pneumoniae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(9): 2838-2843.

[3] Seputiené V, Povilonis J, Ruzauskas M, et al. Prevalence of trimethoprim resistance genes in Escherichia coli isolates of human and animal origin in Lithuania[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 3): 315-322.

[4] Jin Y, Ling JM. Prevalence of integrons in antibiotic-resistant Salmonella spp. in Hong Kong[J]. Jpn J Infect Dis, 2009, 62(6): 432-439.

[5] 胡芳，付英梅，马佳毓. 整合子与细菌耐药性[J]. 微生物学杂志，2006，26(2)：79-81.

[6] Bouvier M, Demarre G, Mazel D. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate[J]. EMBO J, 2005, 24(24): 4356-4367.

[7] Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS, Miriagou V. Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active p2 promoter[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 277-280.

[8] Jové T, Da Re S, Denis F, et al. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons[J]. PLoS Genet, 2010, 6(1): e1000793.

[9] 药立波. 分子生物学[M]. 3 版. 北京：人民卫生出版社，2008：52-53.

[10] Dörr T, Lewis K, Vulic M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in Escherichia coli[J]. PLoS Genet, 2009, 5(12): e1000760.

[11] Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through ingegron activation[J]. PLoS Genet, 2010, 6(10): e1001165.

[12] Hastings PJ, Rosenberg SM, Slack A. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance[J]. Trends Microbiol, 2004, 12(9): 401-404.

[13] Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes[J]. Nature, 2004, 427(6969): 72-74.

[14] Guerin E, Cambray G, Sanche-Alberola N, et al. The SOS response controls integron recombination[J]. Science, 2009, 324(5930): 1034.

[15] Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, et al. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons[J]. Mob DNA. 2011, 2(1): 6.

[16] Bouvier M, Ducos-Galand M, Loot C, et al. Structural features of single-stranded integron cassette attC sites and their role in stand seletion[J]. PLoS Genet, 2009, 5(9): e1000632.

[17] Larouche A, Roy PH. Effect of attC structure on cassette excision by integron integrase[J]. Mob DNA, 2011, 2(1): 3.

(收稿日期：2013-01-19)