

- 12 Kobayashi T, Oda T, Yoshimura Y, *et al.* Androstenedione and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid correlate with successful fertilization and cleavage of human oocytes in vitro [J]. *Fertil Steril*, 1991, 56(2):301-305
- 13 Stadtmayer LA, Toma SK, Riehl RM, *et al.* Impact of metformin therapy on ovarian stimulation and outcome in 'coasted' patients with polycystic ovary syndrome undergoing in-vitro fertilization [J]. *Reprod Biomed Online*, 2002, 5(2):112-116
- 14 Yarali H, Yildiz BO, Demiroglu A, *et al.* Co-administration of metformin during rFSH treatment in patients with clomiphene citrate-resistant polycystic ovarian syndrome; a prospective randomized trial [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(2):289-294
- 15 Rittmaster RS, Deshwal N, Lehman L. The role of adrenal hyperandrogenism, insulin resistance, and obesity in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76(5):1295-1300
- 16 Barbieri RL, Makris A, Randall RW, *et al.* Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 62(5):904-910
- 17 Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD, *et al.* Ovulatory response to treatment of polycystic ovary syndrome is associated with a polymorphism in the STK11 gene [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(3):792-800
- 18 Jakubowicz DJ, Luorno MJ, Jakubowicz S, *et al.* Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(2):524-529
- 19 Deaton JL, Dempsey RA, Miller KA. Serum from women with polycystic ovary syndrome inhibits fertilization and embryonic development in the murine in vitro fertilization model [J]. *Fertil Steril*, 1996, 65(6):1224-1228
(收稿:2011-08-10)
(修回:2011-09-08)

淋病奈瑟菌 *gyrA* 和 *parC* 基因喹诺酮耐药决定区突变与环丙沙星耐药相关性研究

高家良 王黎芳 李洵璐 周娇萍 孙爱华

摘 要 **目的** 分析宁波地区淋病奈瑟菌临床菌株 *gyrA* 和 *parC* 基因喹诺酮耐药决定区(QRDR)突变类型及与喹诺酮类药物耐药的相关性。**方法** 采用琼脂稀释法检测 137 株淋病奈瑟菌临床菌株对 6 种抗生素的最小抑菌浓度(MIC),PCR 法扩增 50 株环丙沙星耐药的淋病奈瑟菌临床菌株 *gyrA* 和 *parC* 基因喹诺酮耐药决定区,并进行测序分析。**结果** 137 株淋病奈瑟菌临床菌株对大观霉素、头孢曲松、四环素、青霉素、氧氟沙星和环丙沙星的耐药率分别为 0、0、75.2%、76.6%、97.1% 和 100%。50 株临床菌株测序发现,*gyrA* 基因存在 3 种核苷酸序列发生错义突变,其中 S91F 突变发生在所有检测菌株,49 株 D95 位发生突变;*parC* 基因突变位点较多且相对比较分散,其中 28 株 *parC* 基因 85、86、87、88 和 91 位发生单位点突变,9 株 *parC* 基因发生双重突变。**结论** 青霉素、四环素、氧氟沙星和环丙沙星已不能作为治疗淋病的常规用药,大观霉素和头孢曲松仍可推荐用药。*gyrA* 和 *parC* 基因突变在淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药中起重要作用。

关键词 淋病奈瑟菌 *gyrA* 和 *parC* 基因 突变 序列分析 耐药性

Correlation of Mutation Patterns in *gyrA* and *parC* Genes in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with Quinolone Resistance. Gao Jialiang, Wang Lifang, Li Xunlu, Zhou Jiaoping, Sun Aihua. *Yinzhou People's Hospital, Zhejiang 315040, China*

Abstract Objective To analyze mutations patterns in the quinolone-resistance-determining-region (QRDR) in *gyrA* and *parC* genes and study the correlation with quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Ningbo. **Methods** The MICs of 6 antimicrobials were determined by agar dilution method. PCR and DNA sequencing were conducted to analyze QRDR associated genes of *gyrA* and *parC* in 50 isolates. **Results** The resistance rate of the 137 strains were 0, 0, 75.2%, 76.6%, 97.1% and 100% to spectinomycin, ceftriaxone, tetracycline, penicillin, ofloxacin and ciprofloxacin respectively. Sequencing analysis of *gyrA* revealed that all 50 isolates had mutation of S91F and 49 resistant isolates had mutation of D95G/A/N/E. Mutations in *parC* gene were at 85, 86, 87 and 91. And 37 resistant isolates had at least one mutation in QRDR within *parC*, in which 28 isolates had single mutation, and 9 isolates had double mutations in *parC*. **Conclusion** Tetracycline, penicillin, ofloxacin and ciprofloxacin should not be routine therapy for gonorrhoea, while the use of spectinomycin and ceftriaxone is recommended. Mutations in *gyrA* and *parC* genes play an important role in the development of

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2004A018)

作者单位:315040 浙江省宁波市鄞州人民医院(高家良、李洵璐、周娇萍);310053 浙江医学高等专科学校(王黎芳、孙爱华)

通讯作者:孙爱华,硕士研究生导师,电子信箱:sunah123@126.com

quinolone resistance in *N. gonorrhoeae*.

Key words *Neisseria gonorrhoeae*; gyrA and parC genes; Mutation; Sequence analysis; Drug resistance

鉴于淋病奈瑟菌对青霉素和四环素高度耐药世界卫生组织于 20 世纪 80 年代提出将第三代头孢菌素及喹诺酮类药物推荐为治疗淋病的一线药物^[1]。但随着喹诺酮类药物的大量和广泛的应用,临床对该类药物的敏感性逐渐下降出现耐药,我国淋病奈瑟菌耐药监测组连续 20 年对耐药率变化检测发现,淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星的耐药率从 1995 年的 15.48% 增至 2000 年的 85.20%, 2005 年为 94.3%, 而 2008 年达到 96.13%^[2-4]。

淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物的耐药机制复杂,目前认为编码 DNA 螺旋酶 A 亚单位 gyrA 基因及拓扑异构酶 IV C 亚单位 parC 基因的喹诺酮耐药决定区 (quinolone resistance determining regions, QRDR) 突变起了重要作用^[5]。为探讨淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物环丙沙星的耐药机制,我们收集了 137 株淋病奈瑟菌临床菌株并检测其对 6 种抗生素的耐药性,对 50 株环丙沙星耐药的临床菌株 gyrA 和 parC 基因 QRDR 区 PCR 扩增并直接测序,探讨 gyrA 和 parC 基因的 QRDR 突变与细菌耐药的相关性。

材料与方法

1. 菌株的来源:2009 年 6 月~2010 年 6 月从浙江省宁波地区多家医院及计划生育指导站收集淋病奈瑟菌 137 株,已按常规细菌学分离及鉴定。青霉素、四环素、环丙沙星、氧氟沙星、头孢曲松和大观霉素购自 Sigma 公司,药敏质控及 PCR 阳性对照株淋病奈瑟菌 ATCC49226 和 PCR 阴性对照大肠杆菌标准株 ATCC25922 由浙江大学医学院病原生物系提供,采用琼脂稀释法测定各抗生素最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)^[4]。配制含 10% 脱纤维羊血、抗生素浓度均分别为 0.015~32mg/L (大观霉素为 1.0~256mg/L 三管) 的 GC 琼脂平板,37℃ 孵育 24h 检菌。各淋病奈瑟菌临床菌株和质控菌株在 GC 培养基上传代 2 次后,用 24h 新鲜培养物制成 10^7 cfu/ml 的菌悬液,接种于检菌合格的药敏平板,36℃ 培养 48h 后观察结果,以细菌生长被抑制的药物最高稀释度为 MIC。对各抗生素耐药的判断标准如下:青霉素、四环素和氧氟沙星均为 MIC $\geq$ 2mg/L,头孢曲松为 MIC $\geq$ 0.5mg/L,大观霉素为 MIC $\geq$ 128mg/L,对环丙沙星 $\geq$ 4mg/L 为高度耐药, MIC $\geq$ 1mg/L 为低度耐药, 0.06mg/L < MIC $\leq$ 0.5mg/L 为中介, MIC $\leq$ 0.06mg/L 为敏感^[4]。

2. 实验方法:(1) DNA 模板的制备:采用申能博彩 (Bio-Color) 生物有限公司提供的 DNA 提纯试剂盒制备 DNA 模板,具体步骤如下:挑取 5 个菌落置于 50 μ l DNA 提取液中,混匀后沸水浴 10min,取 5 μ l 作为 PCR 的 DNA 模板。(2) 引物设

计:参考 GenBank 登录淋病奈瑟菌 gyrA 和 parC 基因参考序列 (Genbank accession no: U08817 和 U08907) 及 QRDR 位置设计上、下游引物。gyrA 基因上游引物序列:5'-CGG CGC GTA CTG TAC GCG -3', 下游引物序列:5'-CGA GCC GTT GAC GAG CAG -3'。parC 基因上游引物序列:5'-AAG GCC GCG CGC TGC CTG -3', 下游引物序列:5'-CGG ACA ACA GCA ATT CCG -3'。委托上海生工生物技术有限公司 (Sangon) 合成引物。(3) PCR 扩增及扩增产物检测:PCR 总体积为 100 μ l, 内含 2.5mol/L 各 dNTP、250nmol/L 各引物、2.5U Ex - Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa)、5 μ l 细菌 DNA 提取物为模板、1 $\times$ PCR 缓冲液 (pH8.3)。PCR 参数:94℃ 4 min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 35 个循环; 72℃ 5 min。采用 1 μ g/ml 溴乙锭预染色的 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,目的基因扩增片段预期大小分别为 378 bp 和 321bp, 扩增产物包括 gyrA 和 parC 基因 QRDR 的区域。(4) 核苷酸序列测定及分析:随机选取对环丙沙星耐药的淋病奈瑟临床菌株 50 株,采用 BioColor 公司的 3S 柱离心式琼脂糖 DNA 小量快速纯化试剂盒提纯,委托 Sangon 公司测定 50 株淋病奈瑟菌 PCR 产物 gyrA 和 parC 基因片段的核苷酸序列。参照已报道的淋病奈瑟菌野生株 gyrA 和 parC 基因 (Genbank accession no: U08817 和 U08907) QRDR 核苷酸序列,对随机抽取的 50 株淋病奈瑟菌 gyrA 和 parC 基因 QRDR 核苷酸及推测的氨基酸序列进行比较,以确定上述菌株 gyrA 和 parC 基因 QRDR 的突变情况。

3. 统计学方法:检测结果的分析和比较采用 Stata 8.0 统计学软件中的 χ^2 检验,对检测结果进行比较, $P < 0.05$ 认为有差异。

结 果

1. PCR 扩增结果:137 株淋病奈瑟菌 DNA 都能用自行设计引物扩增出 gyrA 和 parC 基因目的片段, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳显示 gyrA 和 parC 基因目的片段为预期大小 (此处不显示)。同样条件下 PCR 扩增淋病奈瑟菌标准株 ATCC49226 DNA 结果为阳性, 大肠杆菌标准株 ATCC25922 DNA 结果为阴性。

2. MICs 检测结果:137 株淋病奈瑟菌临床菌株对 6 种检测抗生素的 MICs 和耐药情况见表 1。未发现对大观霉素和头孢曲松耐药菌株。对环丙沙星全部耐药, 对其余 3 种抗生素青霉素、四环素和氧氟沙星的耐药率分别为 76.6% (105/137)、75.2% (103/137) 和 97.1% (133/137)。

3. gyrA 和 parC 基因 QRDR 变异情况:137 株淋病奈瑟菌临床菌株中随机抽取 50 株 PCR 扩增 gyrA 和 parC 基因, PCR 产物纯化后测序。结果 QRDR 测

表 1 137 株淋病奈瑟菌临床分离株对 6 种抗生素的耐药率比较

抗生素	敏感株 (n)	敏感率 (%)	MIC 范围 (mg/L)	耐药株 (n)	耐药率 (%)	MIC 范围 (mg/L)
青霉素	32	23.4	0.5 ~ 1.0	105	76.6	2.0 ~ 32
四环素	34	24.8	0.06 ~ 1.00	103	75.2	2.0 ~ 32
环丙沙星	0	0	—	137	100	0.5 ~ 32
氧氟沙星	4	2.9	0.06 ~ 1.00	133	97.1	2 ~ 16
头孢曲松	137	100	0.03 ~ 0.25	0	0	—
大观霉素	137	100	4.0 ~ 64.0	0	0	—

序的 50 株淋病奈瑟菌临床菌株中 13 株只存在 *gyrA* 基因点突变, 占 26.0%, 其余 37 株 (74.0%) 淋病奈瑟菌临床菌株除 *gyrA* 基因存在突变外同时伴有 *parC* 基因至少 1 个位点突变。在 *gyrA* 基因共检测到 3 种编码氨基酸的核苷酸序列发生错义突变, 其中 S91F 突变发生在所有检测菌株, 49 株 (98.0%) D95 位发生突变, 其中 D95G、D95A、D95N 和 D95E 突变分别有 12、25、11 和 1 株, 1 株 (2.0%) 不发生 D95 突变而发生 A92P 突变。37 株 (74.0%) 淋病奈瑟菌临床菌株有 *parC* 基因至少 1 个位点突变, 且 *parC* 基因突变位点较多且相对比较分散, 其中 28 株 (28/35, 75.7%) *parC* 基因 85、86、87、88 和 91 位发生单位点突变, 包括 G85C (1 株)、D86N (7 株)、S87R/N/I (23 株)、S88P (1 株) 和 E91G/Q/K/A (7 株); 9 株 (9/37, 24.3%) *parC* 基因发生双重突变, 包括 S87R + E91A (7 株) 和 S86N + S87I (2 株) (表 2)。

表 2 50 株对环丙沙星耐药的淋病奈瑟菌临床菌株 *gyrA* 和 *parC* QRDR 变异情况

<i>gyrA</i> PHGDSA VYD (87 ~ 95)	<i>parC</i> GDSSAYE (85 ~ 91)	MIC ≥ 1 μg/ml (n)	MIC ≥ 4 μg/ml (n)	菌株 总数
----FP----	-----	1	1	
---F---G	-----	2		2
---F---A	-----	5	3	8
---F---N	-----	2		2
---F---G	-----Q	1		1
---F---G	--N----	1		1
---F---N	C-----	1		1
---F---N	-----G	1		1
---F---N	-----k	1		1
---F---E	-N-----	1	4	5
---F---A	---P---	1		1
---F---A	-----G	1	2	3
---F---N	--R----		2	2
---F---G	--R----		1	1
---F---G	--R----	1	6	7
---F---N	--R----		4	4
---F---A	--R---A		7	7
---F---A	-NI-----		2	2
合计		19	31	50

rA 基因突变的 13 株菌株, 其中 10 株对环丙沙星呈低度耐药 (10/13, 76.9%), 3 株对环丙沙星呈高度耐药 (3/13, 23.1%)。37 株淋病奈瑟菌临床菌株除 *gyrA* 基因存在突变外伴有 *parC* 基因 QRDR 至少 1 个位点突变, 其中 9 株对环丙沙星呈低度耐药 (9/37, 24.3%), 28 株对环丙沙星呈高度耐药 (28/37, 75.7%)。*gyrA* 基因突变不伴 *parC* 基因突变引起淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星高度耐药占 23.1% (3/13), *gyrA* 基因突变伴有 *parC* 基因突变引起淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星高度耐药占 75.7% (28/37), 两组间有统计学显著性差异 ($\chi^2 = 11.3, P < 0.01$)。28 株淋病奈瑟菌临床菌株发生 *parC* 基因单个位点突变, 其中 9 株 (9/28, 32.1%) 对环丙沙星呈低度耐药, 19 株 (19/28, 67.9%) 对环丙沙星呈高度耐药, 发生 *parC* 基因两个位点突变的 9 株淋病奈瑟菌临床菌株药敏结果对环丙沙星全部呈高度耐药 (9/9, 100%), *parC* 基因单个位点突变与两个位点突变引起淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星高度耐药有显著性差异 ($\chi^2 = 3.8, P < 0.01$) (表 2)。

讨 论

流行病学调查显示, 20 世纪 80 年代开始环丙沙星用于淋病的治疗, 随着环丙沙星等喹诺酮类药物的广泛使用, 90 年代其敏感性开始下降, 到了 2000 年前后, 许多国家与地区环丙沙星耐药率已达 90% 以上^[2-4], 笔者收集的 137 株淋病奈瑟菌临床菌株对 6 种抗生素的耐药试验表明, 环丙沙星耐药率为 100%, 其他喹诺酮类药物如氧氟沙星的耐药率也达 97.1%, 说明喹诺酮类药物已不能成为本地区治疗淋病的药物。137 株淋病奈瑟菌临床菌株未检测到对大观霉素和头孢曲松耐药, 提示大观霉素和头孢曲松可作为淋病治疗的推荐药物。

淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药机制较为复杂, 但最主要与编码 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 的基因的突变有关, 国外研究已发现, *gyrA* 和 *parC* 基因突变位点集中发生在核苷酸序列 N 端 199 ~ 318 的区间

4. *gyrA* 和 *parC* 基因与耐药的相关性: 只存在 *gyrA*

内,即所谓喹诺酮耐药决定区(QRDR),淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药性的发生与 *gyrA* 和 *parC* 基因 QRDR 突变有关^[4]。其中 *gyrA* 基因参与编码的 DNA 旋转酶是喹诺酮类药物的主要作用靶位, Deguchi 等研究发现对喹诺酮类敏感的淋病奈瑟菌 *gyrA* 基因没有突变,耐药株一般都有 *gyrA* 基因突变,其中编码 91 位丝氨酸(S91)和 95 位天冬氨酸(D95)的密码子最易发生突变^[6,7],我们对 50 株耐环丙沙星的淋病奈瑟菌临床菌株的测序结果发现 S91F 突变发生在所有检测菌株,49 株(49/50,98.0%)淋病奈瑟菌临床菌株 G/A/N/E 突变,其中 1 株发生 D95E 突变未见文献报道,1 株 D95 不发生突变而发生 A92P 突变,表明 *gyrA* 基因发生点突变特别 S91 和 D95 突变是造成淋病奈瑟菌临床菌株产生喹诺酮类耐药的主要原因。Deguchi 等也发现对喹诺酮类耐药的淋病奈瑟菌临床菌株 *parC* 基因存在 86、87、88 和 91 的突变,而药物敏感株没有这些突变,另有研究发现,*parC* 基因突变基因仅出现在已存在 *gyrA* 基因双突变且高度耐药的菌株中^[6,7],提示 *parC* 基因突变可能与淋病奈瑟菌对喹诺酮类药物耐药程度相关。我们检测了 50 株淋病奈瑟菌临床菌株 *parC* 的 QRDR 核苷酸序列,37 株淋病奈瑟菌临床菌株除 *gyrA* 基因存在突变同时伴有 *parC* 基因 QRDR 至少 1 个位点突变引起高度耐药 28 株占 75.7%,13 株 *gyrA* 基因突变不伴 *parC* 基因突变引起高度耐药 3 株占 23.1%,两组间有统计学显著性差异($\chi^2 = 11.3$, $P < 0.01$),说明是否伴随 *parC* 基因突变与淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星高度耐药明显相关。28 株淋病奈瑟菌临床菌株发生

parC 基因单位点突变中 19 株对环丙沙星呈高度耐药占 67.9%,所有发生 *parC* 基因双位点突变的 9 株淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星全部呈高度耐药,有显著性差异($\chi^2 = 3.8$, $P < 0.01$)。说明 *parC* 基因突变位点数目与淋病奈瑟菌临床菌株对环丙沙星耐药程度明显相关性,这与国外文献报道相似^[2-4,7]。

参考文献

- 1 Campos - Outcalt D. CDC update: guidelines for treating STDs [J]. J Fam Pract, 2011, 60(3):143 - 146
 - 2 Furuya R, Tanaka M. Neisseria gonorrhoeae infections [J]. Nippon Rinsho, 2009, 67(1):129 - 135
 - 3 Yang Y, Liao MM, Gu WM, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular determinants of quinolone resistance in *N. gonorrhoeae* isolates from Shanghai [J]. J Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(4):868 - 872
 - 4 Zhang TJ, Zhou XM, Zhang JL, et al. Fluoroquinolone resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Shanghai, China; detection of quinolone resistance determining region mutations [J]. Indian J Med Res, 2009, 129(6):701 - 706
 - 5 Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard [M]. 7th ed. 2006; M7 - A7
 - 6 Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, et al. Quinolone - resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996, 40(4):1020 - 1023
 - 7 Pérez - Losada M, Crandall KA, Bash MC, et al. Distinguishing importation from diversification of quinolone - resistant *Neisseria gonorrhoeae* by molecular evolutionary analysis [J]. BMC Evol Biol, 2007, 7(1):84 - 93
- (收稿:2011 - 05 - 30)
(修回:2011 - 06 - 16)

舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞的凋亡的影响

秦文燕 曹群奋 李昌平

摘 要 目的 探讨舒肝颗粒作用于体外培养的大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)其是否对大鼠肝星状细胞凋亡有影响,及其可能的作用机制。**方法** 体外培养大鼠肝星状细胞株(HSC - T6),分实验组和对照组,实验组加入舒肝颗粒,分3个浓度组:4.2、2.8、1.4mg/ml,作用24h后,加入AnnexinV/FITC和碘化丙锭,流式细胞仪检测肝星状细胞的凋亡;加入CD95抗体,流式细胞仪检测CD95的表达;采用免疫细胞化学法检测Bax和Bcl - 2的表达。**结果** 实验组肝星状细胞凋亡率较对照组明显增高,且呈浓度依赖性,差异具有统计学意义($P < 0.05$);随着浓度增高,CD95、Bax的表达率增高,呈浓度依赖性,Bcl - 2的表达,实验组与对照组差别无统计学意义,但Bax/bcl - 2的比值随着药物浓度组的增加而升高。**结论** 舒肝颗粒可诱导肝星状