

gyrA 和 parC 基因突变与解脲支原体 喹诺酮类药物耐药相关性研究

王春燕 杜 江 吴森林 孙爱华

摘 要 目的 探讨解脲支原体 gyrA 和 parC 基因喹诺酮耐药决定区(QRDR)突变与喹诺酮类药物耐药的相关性。方法 用支原体培养、鉴定和药敏一体化试剂盒分离获得 42 株解脲支原体并检测对 3 种喹诺酮类药物的耐药性,同时 PCR 法扩增临床分离株的 gyrA 和 parC 基因喹诺酮耐药决定区并进行测序分析。结果 对 3 种喹诺酮均敏感 1 株,41 株至少对 1 种药物呈现不同程度耐药。gyrA 和 parC 基因喹诺酮耐药决定区测序发现上述敏感株和 1 株耐药株不发生突变,其余 40 株耐药株 gyrA 和 parC 基因发生 D112E 和(或)S83L 突变。结论 3 种喹诺酮类药物耐药均较严重,已不适合作为临床推荐用药,解脲支原体 gyrA 和 parC 基因喹诺酮耐药决定区突变与耐药密切相关。

关键词 解脲支原体 gyrA 和 parC 基因 突变 序列分析 耐药性

Correlation of Mutation Patterns in gyrA and parC Genes in *Ureaplasma Urealyticum* Isolates with Quinolones Resistance. Wang Chunyan, Du Jiang, Wu Senlin, Sun Aihua. Department of Clinical Laboratory, Shanghai East Hospital, Shanghai 200120, China

Abstract Objective To analyze mutations in the quinolone – resistance – determining – region (QRDR) within genes of gyrA and parC patterns in gyrA and parC genes and quinolones resistance in *ureaplasma urealyticum* (Uu) isolates. **Methods** Mycoplasma detection kits were used to culture and identificate mycoplasma as well as drug sensitivity. PCR and DNA sequencing were conducted to analyze QRDR associated genes of gyrA and parC in 42 isolates. **Results** Only 1 isolate susceptible to all quinolones. Forty – one isolates showed varying degree resistance to at least one kind of quinolones. Sequencing analysis of gyrA and parC revealed that the susceptible isolate and 1 resistance isolate had no mutation, Fourty resistance isolates had mutation of D112E and/or S83L in GyrA and ParC. **Conclusion** Three quinolones should not be routine therapy for *ureaplasma urealyticum* infections. Mutations in gyrA and parC genes play an important role in the development of quinolones resistance in *ureaplasma urealyticum*.

Key words *Ureaplasma urealyticum*; gyrA and parC genes; Mutation; Sequence analysis; Drug resistance

解脲支原体(*ureaplasma urealyticum*, UU)是引起泌尿生殖道感染的一种重要条件致病病原体^[1]。喹诺酮类药物是一类人工合成的具有高效广谱抗菌作用的药物。随着喹诺酮类药物的大量和广泛的应用,解脲支原体临床分离株对该类药物的敏感性逐渐下降出现耐药^[2-5]。

解脲支原体对喹诺酮类药物的耐药机制复杂,研究认为Ⅱ型拓扑异构酶(包括 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶Ⅳ)是其作用靶酶,gyrA 和 parC 基因分别编码 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶Ⅳ,基因上的一段与喹诺酮类耐药相关的核苷酸序列被称为喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance determining regions, QRDR),

其中 gyrA 基因 5'末端第 202 ~ 531 位碱基(即编码 GyrA 第 68 ~ 177 位氨基酸残基的碱基)和 parC 基因 5'末端第 152 ~ 456 位碱基(即编码 GyrA 第 51 ~ 152 位氨基酸残基的碱基)组成各自的 QRDR 区,QRDR 区碱基突变导致编码的氨基酸突变抑制细菌 DNA 螺旋酶或拓扑异构酶Ⅳ的活性导致耐药^[6]。本研究分离了 42 株解脲支原体临床菌株并检测其对环丙沙星、氧氟沙星和司帕沙星 3 种喹诺酮类药物的耐药性,PCR 扩增所有菌株 gyrA 和 parC 基因包括 QRDR 在内的核苷酸序列并直接测序,以探讨本地区解脲支原体 gyrA 和 parC 基因的 QRDR 突变与喹诺酮类药物耐药的相关性。

材料与方法

1. 菌株的来源:2007 年 11 月 ~ 2010 年 11 月上海市东方医院性病皮肤病门诊拟诊断为非淋性尿道炎病人泌尿生殖道分泌物。女性患者取宫颈分泌物,先用无菌棉签拭去宫颈分泌物,然而用新的无菌棉拭子插入宫颈 1 ~ 2cm 旋转 360°后停

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:200120 上海市东方医院(王春艳、杜江);310053 杭州,浙江医学高等专科学校(吴森林、孙爱华)
通讯作者:孙爱华,教授,硕士生导师,电子信箱:sunah123@126.com

留 30s,取柱状上皮细胞;男性患者禁尿 2h 以上用无菌细棉拭子缓慢插入尿道 2~4cm 处,捻转 1 周并停留 30s 后取柱状上皮细胞标本。血清 3 型解脲支原体标准株 ATCC 700970 来自浙江大学病原生物系。

2. 支原体分离与鉴定及药敏试验:支原体鉴定及药敏试验一体化试剂盒由珠海黑马生物工程公司生产,将取样棉拭子进行洗脱,按试剂盒说明书操作,与生长对照孔比较,培养 24h 后 UU 孔由黄色变为橙色或红色且未见浑浊为阳性,表示有 UU 生长,不变色表示阴性。筛选获得的 42 株解脲支原体菌株,-70℃ 保存。

3. 药敏试验结果判断:支原体鉴定药物环丙沙星、氧氟沙星和司帕沙星 3 种药物高、低两个浓度各设 1 孔,根据支原体鉴定及药敏试验一体化试剂盒操作及结果判断说明,两孔均不变色表示敏感,都变红色表示耐药,低浓度孔变红色,高浓度孔不变色表示中介。

4. DNA 模板的制备:采用申能博彩(BioColor)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:取耐药菌株培养物 500μl,10000r/min 离心 10min,沉淀中加入 25μl 细菌裂解液,充分混匀后沸水浴 10min,13000r/min 离心 10min 取 5μl 上清作为 PCR 的 DNA 模板。

5. 引物设计:参考 GenBank 登录血清 3 型解脲支原体 gyrA 和 parC 基因参考序列(Genbank:AF222894.1)及 QRDR 位置设计上、下游引物。gyrA 基因上游引物序列:5'-GGA ATG ACA CAT GAT AAG CC-3',下游引物序列:5'-TTC TGA TGC ATC ATA ATT AGG-3'。parC 基因上游引物序列:5'-TAC GCA ATG AGT GAA TTA GGA-3',下游引物序列:5'-

TGA TAA TCG AGC AAC TGT ATA-3'。委托上海生工生物技术有限公司(Sangon)合成引物。

5. PCR 扩增及扩增产物检测:PCR 总体积为 100μl,内含 2.5mol/L 各 dNTP、250nmol/L 各引物、2.5U Ex-Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)、DNA 模板 5μl、1×PCR 缓冲液(pH 8.3)。PCR 参数:94℃ 4min;94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 30s,35 个循环;72℃ 5min。采用 1μg/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 294bp 和 237bp,扩增产物包括 gyrA 和 parC 基因 QRDR 区域。

6. 核苷酸序列测定及分析: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 PCR 纯化产物 gyrA 和 parC 基因片段的核苷酸序列。参照已报道的血清 3 型解脲支原体标准株 ATCC 700970 gyrA 和 parC 基因核苷酸序列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。

结 果

1. 药敏结果:42 株解脲支原体对 3 种喹诺酮类药物药敏试验结果见表 1。除 1 株对 3 种喹诺酮类药物均敏感外,其余 41 株至少对 1 种药物呈现不同程度耐药。对环丙沙星耐药和中介的分别有 71.4% (30/42) 和 26.2% (11/42),对氧氟沙星耐药和中介分别有 21.4% (9/42) 和 35.7% (15/42),对司帕沙星的耐药和中介的分别占 23.8% (10/42) 和 31.0% (13/42)。

表 1 解脲支原体对 3 种药物的敏感性及 gyrA 和 parC QRDR 变异情况

菌株编号	药敏试验			gyrA		parC	
	环丙沙星	氧氟沙星	司帕沙星	336 位碱基	112 位氨基酸	248 位碱基	83 位氨基酸
血清 3 标准株	S	S	S	-	-	-	-
14	S	S	S	-	-	-	-
40	I	I	I	c→a	D112E	c→t	S83L
3,5	I	S	R	c→a	D112E	c→t	S83L
32	I	S	S	-	-	c→t	S83L
8	I	R	S	c→a	D112E	c→t	S83L
6	I	I	R	c→a	D112E	c→t	S83L
31,34,41	I	I	S	c→a	D112E	-	-
19,35	I	R	I	c→a	D112E	c→t	S83L
25,42	I	R	R	c→a	D112E	c→t	S83L
10,26,39	R	S	S	c→a	D112E	c→t	S83L
33	R	S	S	-	-	-	-
12	R	I	S	c→a	D112E	c→t	S83L
7,17,21,38	R	I	S	c→a	D112E	c→t	S83L
4,9,15,29,30	R	S	I	c→a	D112E	c→t	S83L
13,23,28,37	R	I	I	c→a	D112E	c→t	S83L
11,16,20	R	S	R	c→a	D112E	c→t	S83L
22,27	R	I	R	c→a	D112E	c→t	S83L
18,24,1	R	R	S	c→a	D112E	c→t	S83L
2	R	R	I	c→a	D112E	c→t	S83L
36	R	R	R	c→a	D112E	c→t	S83L

R、I 和 S:分别表示菌株对药物耐药、中介和敏感;-:表示无突变发生

2. PCR 扩增结果:42 株解脲支原体 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在 294bp 和 237bp 位置有 *gyrA* 和 *parC* 基因扩增的目的片段。同样条件下血清 3 型解脲支原体标准株 ATCC 700970 PCR 扩增结果为阳性(图 1、图 2)。

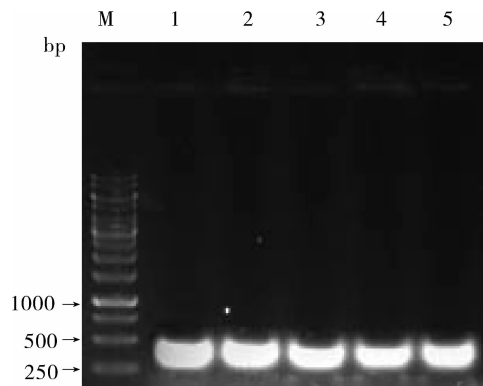


图 1 解脲支原体 *gyrA* 基因 PCR 扩增条带

M. 250 bpDNA Marker;1. ATCC 700970 标准株扩增条带;2. 对 3 种药物均敏感的 14 号临床菌株;3. 对 3 种药物均中介耐药的 40 号临床菌株;4. 对 2 种药物耐药的 20 号临床菌株;5. 对 3 种药物均耐药的 36 号临床菌株

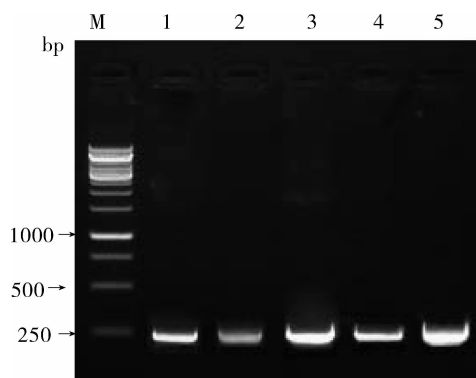


图 2 解脲支原体 *parC* 基因 PCR 扩增条带

M. DNA Marker;1. ATCC 700970 标准株扩增条带;2. 对 3 种药物均敏感的 14 号临床菌株;3. 对 3 种药物均中介耐药的 40 号临床菌株;4. 对 2 种药物耐药的 20 号临床菌株;5. 对 3 种药物均耐药的 36 号临床菌株

3. PCR 测序结果:42 株菌株 *gyrA* 和 *parC* 基因目的片段 PCR 测序结果与血清 3 型标准株 ATCC 700970 对应序列比较见表 1,对 3 种喹诺酮类药物均敏感菌株测定序列与标准菌株完全相同。至少对 1 种喹诺酮类耐药解脲支原体临床菌株 41 株, *gyrA* 和 *parC* 基因 QRDR 区核苷酸序列与标准株 ATCC700970 对应区域对比,发现 *gyrA* 基因存在 12 处碱基突变,但除 336 位碱基 c 突变为 a 导致编码氨

基酸发生替换突变(D112E)外其余均为同义突变; *parC* 基因也存在 11 处突变,其中 248 位碱基 c 突变为 t 结果导致 83 位丝氨酸被亮氨酸替换(S83L),其余 10 处碱基突变引起氨基酸同义突变。33 号耐药株 *gyrA* 和 *parC* 基因 QRDR 区均不发生突变,有 4 株只发生 1 个突变,其中 3 株耐药株(31、34 和 41 号) *gyrA* 基因发生 c336a(D112E)单突变,1 株(32 号) *parC* 基因 c248t(S83L)发生单突变。其余 36 株耐药株均发生 *gyrA* 基因 c336 a(D112E)和 *parC* 基因 c248 t(S83L)双突变。

讨 论

支原体感染导致的泌尿生殖道感染时有报道,其中又以解脲支原体检出率最高。由于支原体没有固定的细胞壁,部分针对细菌细胞壁合成的抗生素如 β -内酰胺类、万古霉素等完全不敏感,喹诺酮类药物是一类对支原体敏感的抗菌药物,主要作用于支原体繁殖传代中 DNA 的复制过程,通过抑制细菌 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV 的活性达到抗菌目的^[5,6]。近年由于抗生素滥用和用药不规范使支原体对喹诺酮类药物出现耐药,且不同地区报道耐药率有较大差异,因此研究本地区支原体对喹诺酮类药物耐药情况具有现实意义^[3-5]。

喹诺酮类药物耐药主要机制作用靶酶的突变,国内、外对大肠杆菌和淋病奈瑟菌喹诺酮类药物耐药与 *gyrA* 和 *parC* 基因突变位点集中发生在基因上的一段与喹诺酮类耐药相关的 QRDR 区。其中最主要的是与 *gyrA* 和 *parC* 基因编码蛋白 GyrA 和 ParC 空间结构密切相关的 D112 和 S83 氨基酸突变^[3-6]。本研究发现对 3 种喹诺酮类药物都敏感的菌株 GyrA 和 ParC 氨基酸编码与解脲支原体血清 3 型标准株序列完全相同,有 5 株耐药株 GyrA 或 ParC 氨基酸序列不发生突变或只发生单个突变,1 株 ParC 氨基酸序列发生 S83L 替换突变,3 株 GyrA 氨基酸发生 D112E 替换突变,上述 4 株菌株只对 1 种或 2 种喹诺酮类药物产生中介耐药,说明解脲支原体 GyrA 和 ParC 氨基酸序列突变发生率与耐药程度有关,另有 33 号菌株对环丙沙星耐药 GyrA 和 ParC 氨基酸序列与解脲支原体血清 3 型标准株序列完全相同,可能有不在检测范围与耐药相关的突变存在或还有其他喹诺酮类药物的耐药机制存在。

解脲支原体的 GyrA 和 ParC 氨基酸序列存在 D112E 和 S83L 双突变菌株有 36 株,占 41 株耐药株的 87.8%,提示 GyrA 和 ParC 氨基酸序列存在

D112E 和 S83L 双突变与诺酮类药物耐药密切相关,此结果与 2002 年我国湖南张文波等^[2]和 2006 年浙江谢鑫友等^[4]报道相似,与 2003 年法国 Bebear 等^[3]和 2009 年英国 Beeton 等^[5]报道解脲支原体除存在与我们一致的 D112E 和 S83L 双突变外尚有 ParC 氨基酸序列第 125 位或 136 位的苏氨酸(Thr)替换丙氨酸(Ala)突变,提示解脲支原体 gyrA 和 parC 基因 QRDR 区与喹诺酮类耐药相关的突变类型与分布存在区域性差异,检测本地区解脲支原体 gyrA 和 parC 基因 QRDR 区点突变对于临床治疗药物的选择有参考价值。41 株耐药株中只有 1 株发生双突变菌株对 3 种药物都呈中介耐药,其余 35 株至少对 1 种喹诺酮类药物耐药,耐药程度高的菌株占 97.2%。41 株耐药株中 5 株不存在突变或只发生单位点突变,其中只有 1 株对环丙沙星耐药程度高呈耐药,其余 4 株只呈现中介耐药,耐药程度高的菌株占 20.0%。两者比较有显著性差异($P < 0.01$),提示 GyrA 和 ParC 氨基酸序列 D112 和 S83 突变发生与耐药密切相关且突变数目与耐药程度相关。

参考文献

1 Farkas B, Ostorházi E, Pónyai K, *et al.* Frequency and antibiotic re-

sistance of *ureaplasma urealyticum* and *mycoplasma hominis* in genital samples of sexually active individuals[J]. *Orv Hetil*, 2011, 152(42): 1698 - 1702

2 Zhang W, Wu Y, Yin W, *et al.* Study of isolation of fluoroquinolone - resistant *ureaplasma urealyticum* and identification of mutant sites[J]. *Chin Med J*, 2002, 115(10): 1573 - 1575

3 Bébér 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]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(10): 3323 - 3325

4 Xie X, Zhang J. Trends in the rates of resistance of *ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance - determining region in Chinese patients[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 259: 181 - 186

5 Beeton ML, Chalker VJ, Kotecha S, *et al.* Comparison of full gyrA, gyrB, parC and parE gene sequences between all *ureaplasma parvum* and *ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non - resistance polymorphism[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(3): 529 - 538

6 Chen FJ, Lo HJ. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2003, 36(1): 1 - 9

(收稿: 2012 - 01 - 16)

(修回: 2012 - 02 - 20)

大肠黏膜组织 sialyl lewis X 表达及生物学意义

于秀文 吴 甜

摘 要 目的 探讨大肠肿瘤 sLex(sialyl lewis X)表达及其与大肠癌临床病理参数的关系。**方法** 应用免疫组织化学方法对 55 例大肠腺癌、15 例远切端大肠黏膜及 20 例大肠腺瘤进行 sLex 检测。**结果** 大肠腺瘤、大肠腺癌 sLex 阳性表达率分别为 50.0% (9/18), 80.0% (44/55) ($P = 0.005$); 34 例大肠腺癌、相应的癌旁正常黏膜及相应远切端正常黏膜 sLex 阳性表达率分别为 79.4% (27/34), 41.2% (14/34), 5.88% (2/34) ($P < 0.05$); 55 例大肠腺癌 sLex 阳性表达与患者的性别、部位、浸润深度、淋巴结转移、Duke's 分期及生存时间无关 ($P > 0.05$), 而与分化程度有关 ($P = 0.021$)。**结论** sLex 是检测大肠肿瘤发生及大肠癌分化程度的重要生物学标志物。

关键词 大肠腺癌 sLex 免疫组织化学

Expression and Biological Significance of Sialyl Lewis X in Colorectal Mucosal Tissues. Yu Xiuwen, Wu Tian. Department of Pathology, Qiqihaer Medical College, Heilongjiang 161006, China

Abstract Objective To explore relationship between expression sLex(sialyl lewis X) and clinicopathological parameters in colorectal tumors. **Methods** The expression of sLex was detected in 20 colorectal adenomas, 55 colorectal adenocarcinomas and 15 normal colorectal mucosal tissues by immunohistochemical method. **Results** The positive expression rates of sLex in colorectal adenoma and colorectal adenocarcinomas and normal colorectal mucosal tissues were 50.0% (9/18), 80.0% (44/55) ($P = 0.005$). The positive ex-

基金项目: 黑龙江省教育厅高等学校青年学术骨干支持计划项目基金资助项目(1155G66)

作者单位: 161006 齐齐哈尔医学院病理教研室