

研究论著

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2023.12.007

吡嗪酰胺耐药的耐多药结核分枝杆菌 *pncA* 基因表达分析

王楠 杨瑜 邓丽 吴玲 刘志辉 孟繁荣

【摘要】 目的 比较吡嗪酰胺 (PZA) 耐药的耐多药结核分枝杆菌在 PZA 药物刺激前后 PZA 耐药基因 *pncA* 的表达, 探讨 *pncA* 基因表达与结核分枝杆菌 PZA 耐药的关系。方法 培养 PZA 耐药的耐多药结核分枝杆菌, 检测其利福平和 PZA 最小抑菌浓度 (MIC); 以 PZA 浓度为 0 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基培养菌株, 实时荧光定量 PCR 检测菌株 *pncA* 的表达水平。结果 21 株结核分枝杆菌 PZA 的 MIC $\geq 1\ 600\ \mu\text{g/mL}$ 、12 株为 400~800 $\mu\text{g/mL}$ 、5 株为 100~200 $\mu\text{g/mL}$; 分别定义相应 PZA 耐药水平为高、中、低, 其利福平的 MIC 中位数分别为 128、128、64 $\mu\text{g/mL}$, 任意 2 组利福平的 MIC 比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); 以相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PZA 高、中、低水平耐药结核分枝杆菌 *pncA* 表达水平, 无药组分别为 0.904 (0.202, 2.653)、1.157 (0.658, 1.511)、1.147 (0.372, 1.347), PZA 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 处理组分别为 1.544 (0.611, 3.191)、0.846 (0.421, 1.237)、0.726 (0.225, 3.017); 以无药组为对照, PZA 含药培养组与其对比, *pncA* 基因表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 PZA 耐药的耐多药结核分枝杆菌在 PZA 药物刺激前后 *pncA* 表达无明显变化。

【关键词】 结核分枝杆菌; 耐药; 吡嗪酰胺; 利福平; *pncA*

Analysis of *pncA* gene expression in pyrazinamide-resistant and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Wang Nan, Yang Yu, Deng Li, Wu Ling, Liu Zhihui, Meng Fanrong. Institute of Pulmonary Diseases, Guangzhou Chest Hospital, State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou 510095, China
Corresponding author, Meng Fanrong, E-mail: rendong.mfr@163.com

【Abstract】 Objective To compare the expression levels of *pncA* gene in pyrazinamide (PZA)-resistant and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* before and after PZA drug stimulation, and to explore the relationship between PZA-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and *pncA* gene expression. **Methods** PZA-resistant and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* was cultured, and the minimal inhibitory concentration (MIC) of rifampicin and PZA was detected. The strains were cultured in medium containing 0 and 50 $\mu\text{g/mL}$ PZA, and the expression level of *pncA* was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The MIC of PZA of 21 strains of *Mycobacterium tuberculosis* was $\geq 1\ 600\ \mu\text{g/mL}$, 400-800 $\mu\text{g/mL}$ for 12 strains, and 100-200 $\mu\text{g/mL}$ in 5 strains, and their corresponding PZA resistance levels were defined as high, medium and low, respectively. The median MIC of rifampicin was 128, 128 and 64 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Chi-square test showed that there was no significant difference between any two groups (all $P > 0.05$). According to the relative quantitative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, the expression levels of *pncA* in the high, medium and low levels of PZA drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* was 0.904 (0.202, 2.653), 1.157 (0.658, 1.511) and 1.147 (0.372, 1.347), and 1.544 (0.611, 3.191), 0.846 (0.421, 1.237) and 0.726 (0.225, 3.017) in the 50 $\mu\text{g/mL}$ treatment group, respectively. There was no significant difference in *pncA* gene expression between the control and PZA drug-containing culture groups ($P > 0.05$). **Conclusion** No significant changes are observed in the expression levels of *pncA* in multidrug-resistant and PZA-resistant *Mycobacterium tuberculosis* before and after PZA drug stimulation.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance; Pyrazinamide; Rifampicin; *pncA*

吡嗪酰胺 (PZA) 是目前唯一可杀灭巨噬细胞内结核分枝杆菌的关键一线抗结核药物, 其耐药

问题严峻而其耐药机制尚未完全阐明^[1]。已有的研究表明 PZA 作为前体药物, 在 *pncA* 基因编码的吡

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2023284); 广州市科技计划项目 (202201010697); 广州市卫生健康科技项目 (20241A011049); 广州市结核病研究重点实验室 (2023A03J0539)

作者单位: 510095 广州, 广州市胸科医院肺部疾病研究所 呼吸疾病国家重点实验室

通信作者, 孟繁荣, E-mail: rendong.mfr@163.com

噻酰胺酶催化作用下发挥抗结核作用, *pncA* 基因突变则是结核分枝杆菌 PZA 耐药的主要机制, 但 *pncA* 无热点突变区^[25]。此外研究表明部分 PZA 耐药结核分枝杆菌未发生 *pncA* 基因突变, 甚至其 PZA 酶仍有活性, 提示 *pncA* 突变并非结核分枝杆菌 PZA 耐药的唯一机制^[67]。Sheen 等^[8] 研究发现在 *pncA* 野生型 PZA 耐药菌株中观察到与 *pncA* 启动子区域突变相关的低水平 *pncA* 表达, 在 *pncA* 突变型 PZA 耐药菌中 *pncA* 基因表达水平如何, *pncA* 基因表达是否为 *pncA* 基因突变以外的结核分枝杆菌 PZA 耐药机制之一? 目前尚无明确的研究表明 *pncA* 的表达是否会影响结核分枝杆菌的 PZA 耐药, 本研究旨在通过分析 PZA 耐药的耐多药结核分枝杆菌 *pncA* 在 PZA 刺激前后菌株 *pncA* 基因表达情况, 探讨 *pncA* 表达在结核分枝杆菌 PZA 耐药中是否发挥作用。

材料与方法

一、材料

1. 结核分枝杆菌

试验所用结核分枝杆菌来自广州市胸科医院分枝杆菌样本库, 菌株入库前均已通过生化和分子方法鉴定为结核分枝杆菌且通过临床药敏诊断实验鉴定为耐多药(同时对异烟肼和利福平耐药), 且经 MGIT 960 系统检测其 PZA 药敏性。

2. 试剂与仪器

Middlebrook 7H9/7H10 培养基购自美国 BD 公司、PZA 购自美国 Sigma 公司、TRIzol (200 mL)、逆转录试剂盒 (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits) 和荧光定量 PCR 试剂盒为美国 Thermo 有限公司产品。细菌超声分散仪 BAC spreader™ 1100 [体必康生物科技(广东)股份有限公司]、MP Fastprep-24 5G 快速样品制备仪 (美国 MP Biomedicals)、超微量紫外分光光度计 (美国 Thermo)、荧光定量 PCR 仪 ABI Vii7 (美国 ABI)。

二、方法

1. 结核分枝杆菌复苏

从分枝杆菌菌种库中取出结核分枝杆菌, 37 °C 孵箱孵育过夜后转种于 7H10 米氏固体培养基, 37 °C 培养 3~4 周。刮取培养基斜面菌落, 细菌超声分散仪调整浓度至 1 麦氏。以 1×10^6 /mL 终浓度接种于 pH 为 7.0 的 7H9/10 米氏培养基、PZA 浓度

为 0 和 50 μ g/mL 且 pH 为 5.8 的 7H9 米氏液体培养基。固体培养基上结核分枝杆菌培养 4 周后阿尔玛蓝显色法检测目标菌株利福平和 PZA 的最小抑菌浓度 (MIC), PZA 刺激培养组培养 2 周后提取 RNA。

2. 利福平和 PZA 的 MIC 检测

取 pH 为 7.0 的 7H9/10 米氏固体培养基斜面上生长至对数生长期的结核分枝杆菌, 细菌超声分散仪调整浓度至 1 麦氏, 以 1×10^5 /mL 终浓度接种于含 PZA 终浓度为 0、50、100、200、400、800、1 600 μ g/mL 的 96 孔板中 (每孔 200 μ L, pH 5.8, 7H9 米氏液体培养基); 以 1×10^5 /mL 终浓度接种于含 0.015 265、0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、64、128、256、512 μ g/mL 利福平的 96 孔板中 (每孔 200 μ L, pH 7.0, 7H9 米氏液体培养基) 培养 14 d 后每孔加入 30 μ L 终浓度为 0.2% 的刃天青, 37 °C 培养 72 h 后观察显色发现, 培养液由蓝色变为玫红色指示结核分枝杆菌生长。

3. RNA 提取

对数生长期的培养菌液 8 mL, 以 10 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 加入 1 mL TRIzol 液体后颠倒混匀后转移至裂解介质管中, 并置于 MP 快速样品制备仪。快速振荡 30 s 后冰浴 2 min, 重复 4 次。于 4 °C 10 000 r/min 离心 15 min 后取上清至 RNase-free 1.5 mL EP 管, 加入 200 μ L 氯仿后颠倒混匀, 室温静置 5 min。4 °C 10 000 r/min 离心 15 min, 上层液体转移至新的 RNase-free 1.5 mL EP 管中, 加 600 μ L 异丙醇、60 μ L 3 mol/L NaAc (pH 5.3)、10 μ L glogen 后于 -70 °C 条件过夜。次日复融后, 4 °C 10 000 r/min 离心 15 min 后弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇重悬, 在 4 °C 10 000 r/min 离心 5 min, 轻柔弃去液滴后自然干燥 5 min, 加入 50 μ L RNase-free 水溶解。取 1 μ L RNA 样品检测浓度, 调整浓度后取 10 μ L 样品逆转录为 cDNA。

4. 检测 *pncA* 基因表达

实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 扩增 *pncA* 基因, *pncA* 引物为: 上游 5'-GGTGTCTACAAGGCTGCCT-3', 下游 5'-GGTGGCAATACCGACCACAT-3', 内参基因为 *rns*, 测得 *pncA* 基因的 Ct 值。相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *pncA* 基因相对表达量。

三、统计学处理

数据录入 Excel 表格, 以 SPSS 26.0、GraphPad 软件进行统计分析及绘图。根据试验菌株 *pncA* 基

因的 Ct 值计算相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。本研究数据经 Shapiro-Wilk (*W* 检验) 正态性检验显示数据为非正态分布, 以 $M(P_{25}, P_{75})$ 予以统计描述, PZA 刺激前后结核分枝杆菌 *pncA* 基因表达水平对比采用符号秩和检验, 多组比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、PZA 耐药水平分析

38 株 PZA 耐药的耐多药结核分枝杆菌, 经 MIC 检测显示: $>1\ 600\ \mu\text{g/mL}$ 者 9 株、 $1\ 600\ \mu\text{g/mL}$ 者 12 株、 $800\ \mu\text{g/mL}$ 者 6 株、 $400\ \mu\text{g/mL}$ 者 6 株、 $200\ \mu\text{g/mL}$ 者 2 株、 $100\ \mu\text{g/mL}$ 者 3 株。定义 PZA 的 MIC $\geq 1\ 600\ \mu\text{g/mL}$ 为 PZA 高水平耐药、 $400\sim 800\ \mu\text{g/mL}$ 为中等水平耐药、 $100\sim 200\ \mu\text{g/mL}$ 为低水平耐药, 将 PZA 耐药菌分为 3 组。

二、RFP 耐药水平分析

PZA 高、中、低水平耐药的 3 组菌株利福平的 MIC 经 Shapiro-Wilk (*W* 检验) 正态性检验显示 $P < 0.001$, 提示数据为非正态分布。PZA 高、中、低水平耐药菌株利福平的 MIC 分别为 128 (64, 128)、128 (64, 128)、64 (18, 96) $\mu\text{g/mL}$ 。PZA 高、中、低水平耐药组结核分枝杆菌利福平耐药状况示意图见图 1。Kruskal-Wallis 秩和检验比较 PZA 高、中、低水平耐药组利福平的 MIC 比较差异无统计

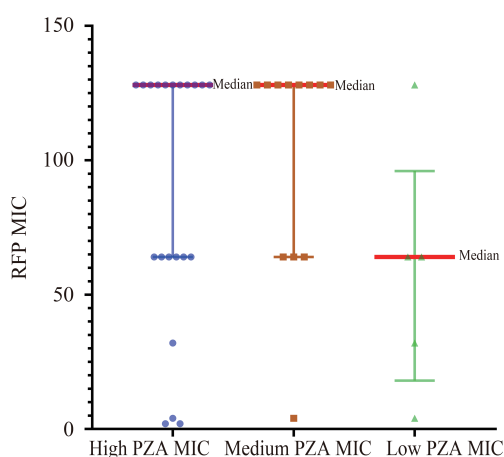


图 1 PZA 高、中、低水平耐药结核分枝杆菌利福平 MIC

学意义 ($P = 0.203$)。

三、*pncA* 本底表达水平检测

以荧光定量 PCR 检测菌株 *pncA* 基因和内参基因 *rrs* 的 Ct 值, 2 株耐多药 PZA 敏感菌株为对照 (Ct 平均值为 15.49), 计算相对表达值 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。 *pncA* 基因相对表达值经 Shapiro-Wilk (*W* 检验) 正态性检验显示 $P < 0.001$, 提示其为非正态分布。PZA 高、中、低水平耐药结核菌 *pncA* 本底表达分别为 0.904 (0.202, 2.653)、1.157 (0.658, 1.511)、1.147 (0.372, 1.347), *pncA* 本底表达情况见图 2。Kruskal-Wallis 秩和检验对比 PZA 耐药水平不同组之间 *pncA* 基因表达水平比较差异无统计学意义 ($P = 0.731$)。

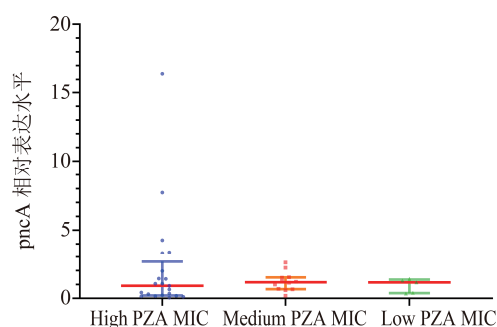


图 2 PZA 高、中、低水平耐药结核分枝杆菌 *pncA* 基因表达情况

四、PZA 药物处理前后结核分枝杆菌的 *pncA* 表达差异分析

以 pH 5.8 的 7H9 米氏培养基培养菌株为对照, 以 pH 5.8 的 $50\ \mu\text{g/mL}$ PZA 含药 7H9 米氏培养基培养菌株为实验组, 计算相对表达值 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。 *pncA* 基因相对表达值经 Shapiro-Wilk (*W* 检验) 正态性检验显示 $P < 0.001$, 提示数据为非正态分布。PZA 高、中、低水平耐药菌株在 PZA 药物刺激下的相对表达值分别为 1.516 (0.654, 3.319)、0.846 (0.421, 1.237)、0.726 (0.225, 3.017)。见图 3。Kruskal-Wallis 秩和检验对比 PZA 耐药高、中、低水平组在 PZA 药物刺激下组间 *pncA* 基因表达水平, 差异无统计学意义 ($P = 0.120$)。符号秩和检验菌株 PZA 药物刺激前后 *pncA* 基因表达水平比较差异无统计学意义 ($P = 0.249$)。见图 4。

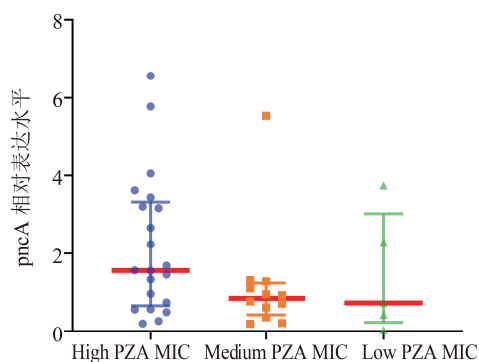


图3 PZA高、中、低水平耐药结核分枝杆菌经PZA刺激后pncA基因表达情况

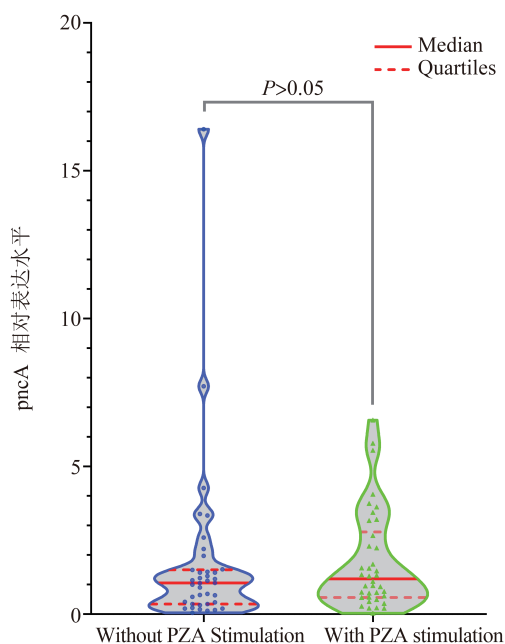


图4 PZA耐药耐多药结核分枝杆菌在有无PZA刺激时pncA基因表达对比

讨论

已有的研究表明pncA基因突变是结核分枝杆菌PZA耐药的主要机制，而高达30%的PZA耐药菌表现出PZA酶活性且拥有野生型pncA基因，提示pncA基因突变以外PZA耐药机制的存在^[9-12]。前期对所纳入研究的结核分枝杆菌进行pncA测序，同时检测到pncA突变型和野生型。此外我们前期研究还在耐多药PZA敏感结核分枝杆菌中检测到pncA基因突变，也表明pncA基因突变不足以单独解释结核分枝杆菌PZA耐药。pncA基因编码吡嗪酰胺酶催化PZA发挥抗结核作用，在PZA

耐药结核分枝杆菌中其表达状况如何，pncA基因低水平表达是否为pncA基因突变外结核分枝杆菌PZA耐药机制？本研究聚焦此问题，主要通过对比分析PZA耐药结核分枝杆菌经PZA药物刺激后pncA基因表达与无PZA药物刺激时本底表达之间的差异。

因PZA耐药主要发生在耐多药结核分枝杆菌中，非耐多药结核患者PZA耐药率较低^[12-18]。故本研究以耐多药PZA耐药结核分枝杆菌为研究对象，检测菌株PZA的耐药水平并定义了其高、中、低。结核分枝杆菌利福平耐药主要由rpoB基因突变引起，rpoB基因编码RNA聚合酶β亚基，其突变引起的RNA聚合酶β亚基结构的改变可能会影响下游RNA转录和蛋白质的翻译。而PZA为前体药物经pncA基因编码的PZA酶催化发挥抗结核作用，是否会受到利福平耐药的影响？为解答这一问题，我们首先检测了PZA耐药高、中、低水平组菌株利福平耐药水平，结果显示3组利福平的MIC中位数均超过64 μg/mL，为较高水平耐药。对比PZA高、中、低水平耐药组之间利福平耐药水平，结果显示无差异。考虑原因可能为本研究86.84% (33/38)的菌株利福平MIC超过32 μg/mL，即PZA耐药菌株多为利福平较高水平耐药。耐多药菌株较高水平的利福平耐药是否会影响pncA基因的表达水平？本研究检测了PZA药物刺激结核分枝杆菌相对于无药刺激组的表达水平，并将其与菌株pncA基因本底表达(pH 7.0的7H10米氏固体培养基)水平对比，发现PZA高、中、低水平耐药组接受PZA药物刺激后pncA基因的表达与本底表达无明显差异。PZA耐药结核分枝杆菌在PZA药物作用下pncA基因表达未发生变化，pncA基因低水平表达是否为结核分枝杆菌PZA耐药的可能机制需要进一步深入研究。关于pncA基因表达的研究，Rueda等^[19]研究提示，11株pncA基因突变菌中2株呈现相对低水平pncA表达、9株pncA基因表达水平升高。与本研究所不同的是，其pncA表达为体外构建质粒载体表达，本研究直接检测结核分枝杆菌临床分离株pncA基因的表达与其略有不同。此外，我们对4例PZA敏感一线抗结核药物全敏结核分枝杆菌同样进行PZA药物刺激试验，结果发现PZA刺激后其pncA基因表达有3倍及以上的升高。

本研究不足之处在于：首先纳入PZA耐药耐多药结核分枝杆菌38株属于小样本量探索性研究，

进一步扩大样本量后检测菌株接受 PZA 药物刺激后 *pncA* 基因表达是否升高有待继续探究。另外未深入探讨非耐多药 PZA 耐药结核分枝杆菌的 *pncA* 基因表达状况, 我们前期研究发现非耐多药结核菌 PZA 耐药率为 6.22%^[15]。Therese 等^[20]报道印度儿童结核患者中分离到的 PZA 单耐药结核菌 *pncA* 突变率为 20%, 故非耐多药 PZA 耐药 *pncA* 基因突变结核菌难于收集。后续研究将收集非耐多药 PZA 耐药及 PZA 敏感结核分枝杆菌, 探究 *pncA* 表达是否影响结核分枝杆菌 PZA 耐药。

参 考 文 献

- [1] Wang Z, Tang Z, Heidari H, et al. Global status of phenotypic pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates: an updated systematic review and meta-analysis. *J Chemother*, 2023 : 1-13.
- [2] Lamont E A, Dillon N A, Baughn A D. The bewildering antitubercular action of pyrazinamide. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2020, 84 (2) : e00070-19.
- [3] Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*, 1998, 78 (2) : 117-122.
- [4] Wang G, Jiang G, Jing W, et al. Prevalence and molecular characterizations of seven additional drug resistance among multidrug-resistant tuberculosis in China: a subsequent study of a national survey. *J Infect*, 2021, 82 (3) : 371-377.
- [5] Whitfield M G, Soeters H M, Warren R M, et al. A global perspective on pyrazinamide resistance: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2015, 10 (7) : e0133869.
- [6] Kim H J, Kwak H K, Lee J, et al. Patterns of *pncA* mutations in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2012, 16 (1) : 98-103.
- [7] Hameed H A, Tan Y, Islam M M, et al. Detection of novel gene mutations associated with pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Southern China. *Infect Drug Resist*, 2020, 13 : 217-227.
- [8] Sheen P, Lozano K, Gilman R H, et al. *pncA* gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2013, 93 (5) : 515-522.
- [9] Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M, et al. Systematic analysis of pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56 (10) : 5186-5193.
- [10] Bhuju S, de Souza Fonseca L, Marsico A G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rio de Janeiro reveal unusually low correlation between pyrazinamide resistance and mutations in the *pncA* gene. *Infect Genet Evol*, 2013, 19 : 1-6.
- [11] Wu X, Lu W, Shao Y, et al. *pncA* gene mutations in reporting pyrazinamide resistance among the MDR-TB suspects. *Infect Genet Evol*, 2019, 72 : 147-150.
- [12] Che Y, Bo D, Lin X, et al. Phenotypic and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Ningbo, China. *BMC Infect Dis*, 2021, 21 (1) : 605.
- [13] Ngabonziza J C S, Diallo A B, Tagliani E, et al. Half of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from tuberculosis patients in Sub-Saharan Africa have concomitant resistance to pyrazinamide. *PLoS One*, 2017, 12 (10) : e0187211.
- [14] Kuhlin J, Davies Forsman L, Mansjö M, et al. Genotypic resistance of pyrazinamide but not minimum inhibitory concentration is associated with longer time to sputum culture conversion in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 2021, 73 (9) : e3511-e3517.
- [15] 王楠, 邓丽, 牛群, 等. 中国南方地区结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药特征分析. *实用医学杂志*, 2022, 38 (6) : 696-700.
- [16] Khan M T, Malik S I, Ali S, et al. Pyrazinamide resistance and mutations in *pncA* among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *BMC Infect Dis*, 2019, 19 (1) : 116.
- [17] Naluyange R, Mboowa G, Komakech K, et al. High prevalence of phenotypic pyrazinamide resistance and its association with *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Uganda. *PLoS One*, 2020, 15 (5) : e0232543.
- [18] Juma S P, Maro A, Pholwat S, et al. Underestimated pyrazinamide resistance may compromise outcomes of pyrazinamide containing regimens for treatment of drug susceptible and multi-drug-resistant tuberculosis in Tanzania. *BMC Infect Dis*, 2019, 19 (1) : 1-6.
- [19] Rueda D, Bernard C, Gandy L, et al. Estimation of pyrazinamidase activity using a cell-free *in vitro* synthesis of *pncA* and its association with pyrazinamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mycobacteriol*, 2018, 7 (1) : 16-25.
- [20] Therese K L, Gayathri R, Balasubramanian S, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pediatric population of Chennai, India. *Indian J Med Microbiol*, 2012, 30 (4) : 411-417.

(收稿日期: 2023-09-25)

(本文编辑: 杨江瑜)