文章编号:1000-5404(2009)12-1185-04

论著

红霉素体外诱导肺炎链球菌耐药的研究

王 强[1],王 跃[1],刘明方[2] (重庆医科大学:[1]临床检验诊断学教育部重点实验室,[2]基础医学院病原生物学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 通过体外诱导获得肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*,*S. pn*)耐药菌株,对比分析 *S. pn* 诱导耐药前后红霉素结合域的变异。**方法** 采用最低抑菌浓度(MIC)递增方法对 *S. pn* 标准菌株 tigr4、tigr2 临床分离敏感株进行红霉素体外诱导耐药,PCR 与 RT-PCR 对诱导前后 rplD、rplV 基因以及 23S rRNA 扩增并测序,CPHmodels-2.0 蛋白质空间构象预测系统对诱导前后 rplD、rplV 基因编码的核糖体蛋白 L4 和 L22 进行空间构象预测分析。**结果** 诱导后 tigr4 MIC 由 0.031 2 mg/L 增加到 256 mg/L,而临床分离敏感株 MIC 均由 0.031 2 mg/L 增加到 32 mg/L。诱导前后测序结果对比显示标准菌株 tigr4 核糖体蛋白 L4 发生 V32A 变异,L22 发生 D35G 变异,而临床分离敏感株核糖体蛋白 L4 发生 Q67R、K68E 变异。空间构象分析 L22 的 D35G 及 L4 的 Q67R、K68E 变异导致其相应的表面空间构象发生明显改变。**结论** *S. pn* 可通过红霉素体外诱导而导致耐药,其耐药机制与红霉素结合域发生新的变异有关。

关键词: 肺炎链球菌;红霉素;诱导;变异
中图法分类号: R378.12;R965;R978.15 **文献标识码:** A

Study on the *Streptococcus pneumoniae* resistance induced by erythromycin *in vitro*

WANG Qiang[1], WANG Yue[1], LIU Ming-fang[2] ([1]Key Laboratory of Clinical Laboratory Medicine of State Education Commission; [2]Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish erythromycin resistance models of Streptococcus pneumoniae for analysis of the mutations in the binding domain of erythromycin. Methods Streptococcus pneumonia tigr4 and two clinical sensitive isolates were induced with erythromycin by minimum inhibitory concentration (MIC) method for antimicrobial susceptibility, and then the rplD, rplV genes, and 23S rRNA in sensitive and resistant strains were amplified by PCR and RT-PCR for sequencing. CPHmodels-2.0 was used to predict the spatial structures of ribosomal protein L4 and L22 coded by rplD and rplV genes. Results MIC of Streptococcus pneumonia tigr4 increased from 0.0312 mg/L to 256mg/L while MICs of the two clinical isolates increased from 0.0312 mg/L to 32 mg/L. Comparison of the pre- and post-induction results showed V32A mutation in ribosomal protein L4, D35G mutation in ribosomal protein L22, and $_{67}$QK$_{68}$ to $_{67}$RE$_{68}$ mutations in ribosomal protein L4. Changes in spatial structure was found in SiThe ribosomal protein L22 and ribosomal protein L4 due to D35G, Q67R, and K68E mutations respectively. Conclusion Streptococcus pneumonia can be induced to resistant to erythromycin in vitro. The mechanisms of resistance may be relate to the new mutations in the binding domain of erythromycin.

Key words: Streptococcus pneumoniae; erythromycin; induce; mutation

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*,*S. pn*)是引起中耳炎、鼻窦炎、支气管炎、社区获得性肺炎的重要致病菌[1],大环内酯类抗生素被临床广泛运用于治疗 *S. pn* 感染。但自从 1967 年检测到耐红霉素 *S. pn* 以来,其耐大环内酯类抗生素的现象越来越严重,在中国、韩国、越南等国家,*S. pn* 分离株大环内酯耐药率已超过 70%[2,3]。

近年来,通过对临床分离大环内酯耐药菌株的研究来阐述红霉素结合域 23S rRNA 以及核糖体蛋白 L4、L22 的变异与耐药性、耐药水平相关性的报道越来

作者简介:王 强,男,四川省内江市人,硕士研究生,初级检验师,主要从事细菌耐药性方面的研究。E-mail:wqiang_1981@126.com
通信作者:王 跃,E-mail:wangyue_26@hotmail.com
收稿日期:2008-10-06;修回日期:2008-12-01

越多[4-6],然而此类研究均建立在对临床分离耐药株与标准菌株序列间接对比基础上。本研究通过对标准菌株和临床分离敏感株进行红霉素体外诱导耐药,建立耐药模型,直接对比分析 *S. pn* 诱导耐药前后红霉素结合域的变异,完善大环内酯类抗生素的耐药机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

S. pn tigr4 血清型(美国菌种保藏中心),2 株临床分离敏感株(代号为 C1 和 C2)由本室分离并保存,红霉素购于美国 Bio BASIC Inc.(BBI)公司(用无水乙醇配制成 5 120 mg/L 原液,分装,-20 ℃保存备用),rplD、rplV 和 23S rRNA 引物序列由大连宝生物工程有限公司合成,PCR、RT-PCR、TA 克隆试剂盒(pMD18-T 载体)及 Trizol 试剂盒均购于大连宝生物工程有限公司,DNA 提取试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司,胶回收试剂盒和质粒小量抽提试剂盒购于盖宁生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 最低抑菌浓度(MIC)测定 将受试菌株转种于 5% 兔血琼脂平板上,37 ℃、5% CO_2 环境下培养 18 h,用无菌生理盐水收集细菌,然后调整菌液浓度约为 1×10^7 CFU/ml,用琼脂稀释法测定抑菌浓度 MIC。

1.2.2 耐药性诱导 无菌生理盐水收集血琼脂平板上培养的 *S. pn*,调整菌液浓度约为 1×10^7 CFU/ml,分别取 0.1 ml 菌液接种于含红霉素的血琼脂平板上,37℃、5% CO_2 条件下培养 18 h。红霉素浓度由 0.5 倍 MIC 逐步增加到 1 倍 MIC、2 倍 MIC、4 倍 MIC,直至敏感株变为耐药株,测定耐药株的 MIC 值。将获得的耐药子代在无红霉素血琼脂平板上连续传代 20 次,测定耐药子代的 MIC 值。

1.2.3 PCR 参照 rplD、rplV 序列(登录号:AE005672)进行引物设计,序列如下:rplD 正义链:5′-AACGTAACATTATTT-GACCA-3′,反义链:5′-TCCTCGATTTTAGAGATAGC-3′,扩增片段为 605 bp;rplV 正义链:5′-ATGGCAGAAATTACTTCAGC-3′,反义链:5′-TTATTTTTCTGCAACAGCTA-3′,扩增片段为 345 bp。无菌生理盐水收集于血琼脂平板上培养 18 h 的诱导前后 *S. pn*,参考 DNA 抽提试剂盒说明书进行 DNA 提取。以提取的细菌基因组为模板进行 rplD、rplV 基因的扩增,扩增条件如下:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,35 次循环;72 ℃延伸 5 min。扩增产物以 1.3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 RT-PCR 参照 23S rRNA 序列(登录号:NC010380)进行引物设计,序列如下:正义链:5′-GTAGGCTAACTAAA GCAGAC-3′,反义链:5′-TATATAATCATGGGAAATCT-3′,扩增片段为 1 344 bp。无菌生理盐水收集于血琼脂平板上培养 18 h 的诱导前后 *S. pn*,参考 Trizol 说明书提取总 RNA,根据 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录和 PCR 反应。逆转录条件:30 ℃保温 10 min,45 ℃退火 15 min,99 ℃ 5 min 灭活 AMV,得到 cDNA。以 cDNA 为模板对 23S rRNA 进行扩增,扩增条件如下:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min 20 s,35 次循环;72 ℃延伸 5 min。扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 质粒的构建与鉴定 用胶回收试剂盒回收 PCR 及 RT-PCR 产物,按照 TA 克隆说明对 pMD18-T-rplD、rplV 及 23S rRNA 质粒进行构建,质粒小量抽提试剂盒进行质粒的提取,原始引物对相应的构建质粒进行 PCR 鉴定,构建成功的质粒交由大连宝生物工程有限公司测序。

1.2.6 核糖体蛋白空间构象分析 运用 CPHmodels-2.0 蛋白质空间构象预测系统对诱导前后菌株核糖体蛋白 L4 和 L22 空间构象进行预测分析,运用 PyMOL 蛋白质分析软件对其表面空间构象进行分析。

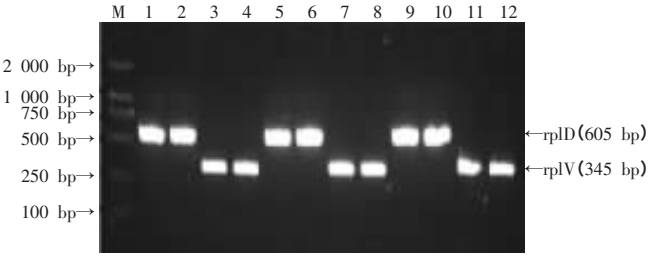
2 结果

2.1 *S. pn* 耐药模型建立

受试菌株通过红霉素体外诱导耐药途径均获得耐药性,其中 *S. pn* tigr4 经诱导传代 16 次,MIC 由最初的 0.031 2 mg/L 增加到 256 mg/L;临床分离株 C1 和 C2 分别经诱导传代 26 次和 28 次,MIC 均由最初的 0.031 2 mg/L 增加到 32 mg/L。将获得的耐药子代在无红霉素血琼脂平板上连续传代 20 次,MIC 值未发生改变。

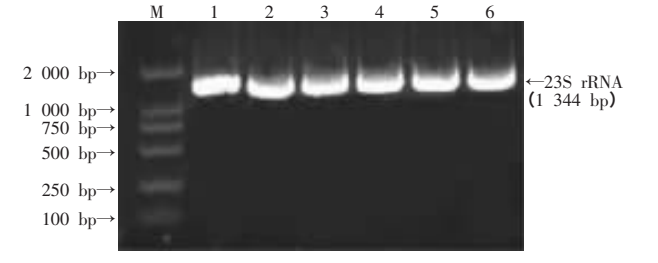
2.2 质粒的构建与鉴定

受试菌株诱导前及诱导后的 rplD、rplV 基因编码区及部分 23S rRNA 序列克隆入 pMD18-T 载体中,获得 pMD18-T-rplD、rplV、23S rRNA 质粒,通过质粒提取、PCR 鉴定证实质粒构建成功(图 1、2)。



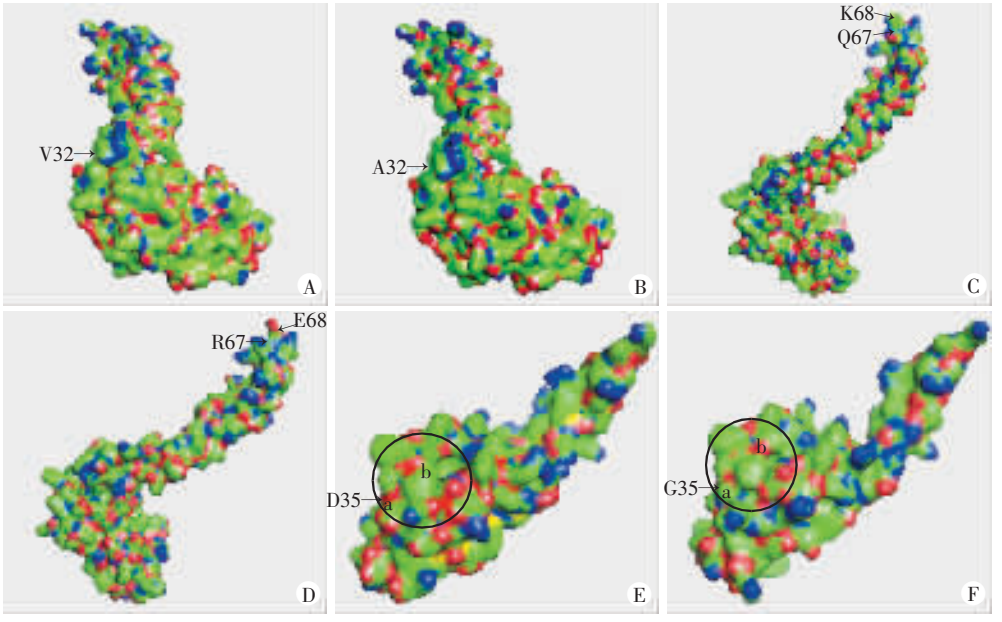
M:DNA 标准(DL 2000);1-4:tigr4 诱导前后构建的 pMD18-T-rplD、rplV 质粒;5-8:C1 诱导前后构建的 pMD18-T-rplD、rplV 质粒;9-12:C2 诱导前后构建的 pMD18-T-rplD、rplV 质粒

图 1 pMD18 -T-rplD、rplV 质粒鉴定结果



M:DNA 标准(DL 2000);1、2:tigr4 诱导前后构建的 pMD18-T-23S rRNA 质粒;3、4:C1 诱导前后构建的 pMD18-T-23S rRNA 质粒;5、6:C2 诱导前后构建的 pMD18 -T-23S rRNA 质粒

图 2 pMD18-T-23S rRNA 质粒鉴定结果



A:变异前 L4;B:V32A 变异后 L4;C:变异前 L4;D:Q67R、K68E 变异后 L4;E:变异前 L22;F:D35G 变异后 L22

图 3　核糖体蛋白 L4、L22 变异前后表面空间构象变化

2.3　诱导前后测序结果对比

通过对提取的质粒进行序列测定,显示 *S. pn* tigr4 的 rplD、rplV 基因序列分别发生新的 T95C、A104G 突变,导致其编码的核糖体蛋白 L4、L22 氨基酸序列发生 V32A、D35G 变异;临床分离株 C1 和 C2 的 rplD 基因序列均发生新的 A200G、A202G 突变,导致其编码的核糖体蛋白 L4 氨基酸序列发生 Q67R、K68E 变异,rplV 基因则无突变;3 株受试菌株均未发现 23S rRNA 突变(表 1)。

表 1　受试菌株 rplD 和 rplV 基因碱基变异前后对比

受试菌株	rplD		rplV	
	变异前	变异后	变异前	变异后
tigr4	$_{94}$GTT$_{96}$	$_{94}$GCT$_{96}$	$_{104}$GAT$_{106}$	$_{104}$GGT$_{106}$
C1	$_{199}$CAAAAA$_{204}$	$_{199}$ CGAGAA$_{204}$	–	–
C2	$_{199}$CAAAAA$_{204}$	$_{199}$ CGAGAA$_{204}$	–	–

表 2　受试菌株核糖体蛋白 L4 和 L22 变异前后对比

受试菌株	L4		L22	
	变异前	变异后	变异前	变异后
tigr4	V32	A32	D35	G35
C1	Q67、K68	R67、E68	–	–
C2	Q67、K68	R67、E68	–	–

2.4　核糖体蛋白空间构象分析结果

通过 CPHmodels-2.0 蛋白质空间构象预测系统对诱导前后菌株核糖体蛋白 L4 和 L22 空间构象进行预测分析,运用 PyMOL 蛋白质分析软件对其表面空间构象进行分析,显示核糖体蛋白 L4 发生 V32A 变异,其表面空间构象未发生明显改变(图 3A、B);而核糖体蛋白 L4 发生 Q67R、K68E 变异时,其表面空间构象发生较明显的改变,诱导后第 67 与 68 位氨基酸残基之间出现凹陷,且诱导后位于第 68 位氨基酸残基的凹陷明显较诱导前更窄(图 3C、D)。核糖体蛋白 L22 发生 D35G 变异时,其表面空间构象发生明显改变,诱导后 a 处多出现一个凹陷,b 处凹陷明显较诱导前更窄(图 3E、F)。

3　讨论

S. pn 对营养及培养条件要求较高,我们采用血琼脂稀释法来进行红霉素诱导,从而能更为直观地观测到细菌生长情况。通过对 3 株 *S. pn* 体外人工诱导耐药,根据 CLSI 标准[7]成功建立耐药模型,其中临床分离株 C1 和 C2 MIC 值均增加到 32 mg/L,而 *S. pn* tigr4 的 MIC 更是增加到 256 mg/L。通过对获得的耐药菌株在无药培养基上多次传代,MIC 值无改变,说明菌株获得了稳定的耐药性。

大环内酯是一类被临床运用于治疗 *S. pn* 感染的抗生素,而导致其耐药的机制主要有靶位改变和主动外排,靶位改变相关的基因主要有 erm(B)、rplD、rplV 及 23S rRNA,与主动外排相关的 mef 基因[2,8,9]。红霉素作为大环内酯类抗生素的代表,其结合域位于一个用于肽链延长的通道内,通道表面由 23S rRNA 的Ⅰ区到Ⅴ区及 rplD、rplV 基因编码的核糖体蛋白 L4 和 L22 等组成,红霉素通过阻断多肽出口和刺激 tRNA 过早的释放来阻止肽链延长和蛋白质的合成。核糖体蛋

白 L4、L22 发生单个氨基酸残基变异时可导致耐药，而 L4 核糖体蛋白第 59～90 位氨基酸和核糖体蛋白 L22 的 85～87 位氨基酸以及 C'羧基末端的变异是大环内酯耐药的重要区域。对 50S 核糖体的变异性研究显示，核糖体蛋白 L4 的 G69T、T70P、G71S 3 位氨基酸残基变异或者第 67 和 68 位氨基酸之间插入 SQ 2 个氨基酸残基，L22 的 3'羧基端插入了 6 个重复的氨基酸残基，即 103RTAHIT108，以及 23S rRNA 的第 2 058 位的变异均与耐大环内酯相关[4-6,10]。

通过对诱导前后菌株构成红霉素结合域的 rplD、rplV 基因以及 23S rRNA 的序列进行测定，发现 *S. pn* tigr4 的 rplD、rplV 基因分别发生新的 T95C、A104G 突变，并导致其编码的核糖体蛋白 L4、L22 氨基酸序列发生 V32A、D35G 变异，引起 *S. pn* tigr4 对红霉素的高水平耐药。对核糖体蛋白 L4 及 L22 变异前后的空间构象进行分析发现，L4 的 V32A 变异对其表面空间构象影响不大，这可能与 V、A 2 个氨基酸残基均为非极性疏水性氨基酸有关，而 L22 的 D35G 变异能导致第 35 位氨基酸残基所处位置及其周围表面空间构象发生明显的改变，而其原因可能与其由酸性氨基酸变为非极性疏水性氨基酸有关，因此我们认为 L22 的 D35G 变异是导致 tigr4 对红霉素高水平耐药的主要原因。临床分离株 C1 和 C2 的 rplD 基因发生新的 A200G、A202G 突变，导致其编码的核糖体蛋白 L4 氨基酸序列发生 Q67R、K68E 变异，引起 *S. pn* C1 和 C2 对红霉素的中等水平耐药。通过对核糖体蛋白 L4 变异前后表面空间构象进行分析发现，核糖体蛋白 L4 的 Q67R、K68E 变异能导致其表面空间构象发生较明显改变。因此我们认为，核糖体蛋白 L22 氨基酸序列发生 D35G 变异和核糖体蛋白 L4 氨基酸序列发生 Q67R、K68E 变异可能为 *S. pn* 耐大环内酯类抗生素的机制之一，这些变异导致 *S. pn* 红霉素结合域空间构象发生改变，使红霉素不能接近或不能结合作用靶点，从而出现耐药。

本实验证明 *S. pn* 能根据药物环境做出适应性的变化，当其在高水平抗生素环境中长期存在时，有可能通过基因突变改变其与抗生素的结合部位，从而导致其耐药性的产生。本研究通过琼脂稀释法对 *S. pn* 进行体外诱导耐药，其中标准菌株 tigr4 仅诱导传代 16 次即获得稳定的耐药模型，而此类方法对于细菌对药物的接触面远不及位于体液中，如果同时存在其他耐药机制时，在体内进行 *S. pn* 感染治疗时，耐药性的产生可能会更快，途径也会更多，这就有可能是治疗 *S. pn* 感染时快速产生耐药性的重要原因。

参考文献：

[1] Deshpande L M, Sader H S, Debbia E, *et al*. Emergence and epidemiology of fluoroquinolone-resistant Streptococcus pneumoniae strains from Italy: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2001-2004)[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 54(3): 157－164.

[2] Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in Streptococcus pneumoniae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9): 2727－2734.

[3] Song J H, Chang H H, Suh J Y, *et al*. Macrolide resistance and genotypic characterization of Streptococcus pneumoniae in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP)[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(3): 457－463.

[4] Doktor S Z, Shortridge V D, Beyer J M, *et al*. Epidemiology of macrolide and/or lincosamide resistant Streptococcus pneumoniae clinical isolates with ribosomal mutations[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 49(1): 47－52.

[5] Tait-Kamradt T, Davies T, Cronan M, *et al*. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(8): 2118－2125.

[6] Tait-Kamradt T, Davies T, Appelbaum P C, *et al*. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of Streptococcus pneumoniae from Eastern Europe and North America[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(12): 3395－3401.

[7] Gabashvili I S, Gregory S T, Valle M, *et al*. The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22[J]. Mol Cell, 2001, 8(1): 181－188.

[8] Dobay O, Rozgonyi F, Amyes S G. Molecular characterisation of Hungarian macrolide-resistant Streptococcus pneumoniae isolates, including three highly resistant strains with the mef gene[J]. Int J Antimicrob Agents, 2005, 25(6): 488－495.

[9] DiPersio L P, DiPersio J R, Beach J A, *et al*. Rise of Streptococcus pneumoniae isolates containing both erm(B) and mef(E) genes from an adult tertiary care community hospital system[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 55(4): 327－331.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16[M]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

（编辑 张 维）