DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000885

新基因 MTB139 在儿童结核临床分离株中的表达及其临床意义的初步研究

苏　薇，黄延凤，许红梅，朱朝敏，郑改焕，郭　倩
（重庆医科大学附属儿童医院感染科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室，重庆　400014）

【摘　要】**目的**：检测并验证新基因 MTB139 在儿童结核临床分离株中的表达，通过比较其在不同耐药性结核结核分枝杆菌中的表达差异，探讨其与结核耐药性的关系。**方法**：应用逆转录聚合酶链式反应（reverse transcription polymerase chain reaction，RT-PCR）的方法检测 60 例临床结核分离株（9 例耐多药株，24 例非耐多药株，27 例敏感株）中基因 MTB139 的表达。**结果**：60 例结核分离株样本中有 7 例检测到 MTB139 基因的阳性表达，3 个组（耐多药组、非耐多药组、敏感组）结核菌株中 MTB139 基因阳性表达率比较有统计学差异（P=0.000），其中耐多药组 MTB139 基因阳性表达率（5 例，阳性表达率 55.56%）明显高于非耐多药组（1 例，阳性表达率 4.17%）及敏感组（1 例，阳性表达率 3.70%），差异有统计学意义（P=0.003、P=0.002），非耐多药组与敏感组 MTB139 基因阳性表达率无统计学差异（P=1.000）。**结论**：新基因 MTB139 在耐多药结核菌株有高表达，可能与结核耐多药性相关。

【关键词】新基因 MTB139；结核结核分枝杆菌；逆转录聚合酶链式反应；耐多药性
【中图分类号】R378.91+1　　【文献标志码】A　　【收稿时间】2015-08-24

Clinical significance of MTB139 expression in clinical tuberculosis isolates of children

Su Wei, Huang Yanfeng, Xu Hongmei, Zhu Chaomin, Zheng Gaihuan, Guo Qian
(*Department of Infection and Gastroenterology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics*)

【Abstract】***Objective***: To verify the expression of new gene MTB139 in clinical tuberculosis isolates, and to explore its relevance to TB drug resistance by detecting the differentially expressed MTB139 gene among clinical *mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) isolates with various resistances. ***Methods***: MTB139 gene expressions in 60 clinical isolates (including 9 multidrug resistant isolates, 24 non-multidrug resistant isolates and 27 drug sensitive isolates) were detected by semi quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction technique. ***Results***: The expression MTB139 gene was observed in 7 (11.67%) out of the 60 study isolates. Statistical analysis revealed that the difference in the expression of MTB139 among the three groups (multidrug resistant group, non-multidrug resistant group, drug sensitive group) was significant (P=0.000). The positive expression rate of MTB139 in multidrug resistant group (5 isolates, 55.56%) was significantly higher than that in both non-multidrug resistant group (1 isolates, 4.17%) and drug sensitive group (1 isolates, 3.70%), with statistical significances (P=0.003; P=0.002). There was no significant difference in the expression of MTB139 gene between non-multidrug resistant group and drug sensitive group (P=1.000). ***Conclusion***: The expression rate of new gene MTB139 is high among the isolates in multidrug resistant group, and MTB139 gene may be associated with multidrug resistance of *M.tuberculosis*.

【Key words】MTB139 gene; *mycobacterium tuberculosis*; reverse transcriptase polymerase chain reaction; multidrug resistance

作者介绍：苏　薇，Email：994510745@qq.com，
研究方向：儿科感染消化。
通信作者：郑改焕，Email：gaihuan168@163.com。
基金项目：重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划基金资助项目（编号：20142047）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160318.1146.010.html（2016-03-18）

近年来，随着抗结核药物的大量、广泛使用或滥用，耐药性结核的发病率逐渐增长，尤其是异烟肼、利福平同时耐药的耐多药结核病（multidrug resistant tuberculosis，MDR-TB）的流行使结核病的防治面临巨大挑战[1]。目前，全球约 2/3 的结核病患者正处于耐多药的危险中，每年约 50 万新发 MDR-TB 病例[2-3]。我国作为结核病高负担国家，MDR-TB 形势相当严峻，我国总 MDR-TB 率接近于世界平均水平的 2 倍，严重威胁了我国公共卫生安全[4-5]。深入研究耐药尤其耐多药结核菌产生的分子机制，是结核病防治面临的重要任务。

结核耐单药的主要分子机制是染色体相关耐药基因突变改变菌体内相应的药物作用靶点所致，但仍有部分结核杆菌的耐药性机制不明，尤其是结核耐多药机制，并不是单纯耐单药靶基因突变的简单叠加，同时部分耐多药株尚未发现已知耐药基因突变，提示结核的耐多药存在其他分子机制，仍需深入探索[6-7]。本课题组在前期研究中应用抑制消减杂交技术，从差异表达基因角度对耐多药相关基因进行筛选，发现耐多药菌株中特异表达的未知新基因序列，命名为 MTB139[8]。在此基础上，本实验通过分析 MTB139 基因在 60 例临床儿童不同耐药性结核分离株中的差异性表达，进一步验证新基因MTB139 的表达，并探讨其与儿童结核菌耐多药的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2008 年 10 月至 2010 年 8 月，由重庆医科大学附属儿童医院病感染消化科提供临床诊断为结核病的临床标本（痰液、胃液等）72 例，每 1 例临床分离株对应 1 个患儿。严格遵守《结核病诊断实验室检验规程》的规定，对样本进行处理、培养、复苏。采用改良罗氏培养基做为中性对照，采用对硝基苯甲酸（p-Nitrobenzoic acid，PNB）和噻吩-2-羧酸肼（2-Thiophene carborylic acid hydrazide，TCH）培养基生长试验对分离株进行初步菌种鉴定。同时收集结核病患儿的性别、年龄等临床资料。72 例临床结核分离株复苏失败 9 例，污染菌株 3 例，将剩余 60 例分离株作为本实验研究对象。60 例结核分离株中男性患儿 32 例，女性患儿 28 例；0~3 岁患儿 14 例、3~14 岁患儿 46 例；肺结核患儿 48 例，肺外结核患儿 17 例，肺结核合并肺外结核患儿 5 例。

1.2 耐药分析判定标准

按照《肺结核诊断与治疗指南》采用比例法检测菌株对异烟肼（isoniazid，INH）、利福平（rifampicin，RFP）、链霉素（streptomycin，SM）、乙胺丁醇（ethambutol，EMB）的耐药性。药物临界浓度分别为 0.2、40.0、4.0、2.0 μg/ml，以耐药百分比大于 1%为阳性。按照《耐药结核病规划管理指南》标准，根据不同耐药性将本实验研究样本分为耐多药组、非耐多药组、敏感组 3 个组，其中耐多药组菌株为至少同时耐 INH 和 RFP 2 种抗结核药物的菌株；非耐多药组为不同时耐 INH 和 RFP的耐药菌株，包括单耐药（指对一种抗结核药物耐药）和多耐药结核菌株（指对一种以上的抗结核药物耐药，同时耐 INH 和 RFP 除外）；敏感组为对 4 种药物均无耐药的菌株。

1.3 MTB139 基因同源性分析

本课题组前期研究将 MTB139 基因的单克隆样本送往测序公司进行测序，确定 MTB139 基因序列。登录 NCBI（National Center of Biotechnology Information）网站（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/），在 GenBank 中利用 BLAST 软件功能对 MTB139 基因进行 DNA 序列同源性分析。按照序列与公共数据库同源性比较结果给出的 score 值，结合基因的长度将所测定的基因序列分为 3 类：已知序列（同源性>90%）（染色体、线粒体、蛋白）、同源序列（同源性 40%~90%）和未知序列（同源性<40%）。

1.4 引物合成

新基因 MTB139 引物以及内参照基因 sigA 的引物（表1）由 ABI 公司的 Primer Express Software v2.0 设计，由华大基因公司合成。

表 1 新基因 MTB139 及内参基因 sigA 的引物

Tab.1 Primers of MTB139 gene and sigA by RT-PCR

序列号	引物名称	序列（5'→3'）	扩增产物长度（bp）
1	MTB139	F-TTTCGGAGTTTCCCGCATAT	159
		R-TGGCTTCTGGCACTGTCAAT	
2	sigA	F-TCGAGGTGATCAACAAGCTG	254
		R-CTGCAGCAAAGTGAAGGACA	

1.5 RT-PCR

1.5.1 总 RNA 的提取 离心菌液，吸尽上清，加液氮充分研磨，在菌体中加 1 ml Trizol 试剂，按说明书进行操作提取总 RNA，-80 ℃冻存。用紫外分光光度仪测 $A_{260\,nm}/A_{280\,nm}$ 的比值，并定量。通过 1.5%的凝胶电泳检测其完整性。

1.5.2 cDNA 合成及 PCR 扩增

1.5.2.1 逆转录反应体系及反应条件 以提取的总 RNA 为模板，按照反应体系：DEPC 水 6 μl，RNA 酶抑制剂（50 U/μl）0.5 μl，随机引物（50 pmol/μl）2 μl，RNA 2 μl。混匀后，65 ℃水浴 5 min，室温放置 10 min。高速离心 5 s 后，向上述离心管中加入反应物：RNA 酶抑制剂（50 U/μl）0.5 μl，5 × buffer 4 μl，dNTP Mixture 2μl，DTT 2 μl，AMV 逆转录酶（200 U/μl）1 μl。混匀后，40 ℃逆转录 60 min，90 ℃处理 5~10 min，冷却

5 min，高速离心 5 s。-20 ℃冰箱保存反转录产物。

1.5.2.2 PCR 反应 采用 25 μl 反应体系，反应条件如下：95 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 10 s，59 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 40 s，72 ℃最后延伸 5 min，共 35 个循环。

1.6 PCR 产物分析

取 PCR 产物 6 μl 在 2%的琼脂糖凝胶中电泳，120 V 电泳 40 min，阳性结果可见 159 bp 与 254 bp 处各有 1 条亮带，分别为 MTB139 和 sigA 基因，用紫外投射仪观察并用粘胶成像仪照相，照片经 Metamorphose Imaging Sight 软件进行分析。每个样本均重复实验 3 次，以确保实验的准确性。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。统计新基因 MTB139 在 3 组结核菌株中阳性表达率。样本率比较 Fisher 确切概率法，3 组 MTB139 基因阳性表达率比较分析，检验水准 α=0.05；3 组 MTB139 基因阳性表达率两两之间比较分析，检验水准 α'=0.016 7(0.050/3)。

2 结 果

2.1 菌种鉴定及药敏实验结果

60 例结核分枝杆菌样本最终药敏实验结果如表 2，按上述分组标准，60 例结核分枝杆菌株中耐多药组菌株 9 例、非耐多药组菌株 24 例及敏感组菌株 27 例。

表 2 结核分枝杆菌 33 株耐药结核菌株药敏试验结果

Tab.2 Results of drug sensitivity of 33 drug-resistant TB isolates

耐药种类	菌株编号	菌株数
INH	65、101、107、239、362、381	6
RFP	208	1
SM	19、75、80、93、149、192、201、226、309	9
EMB	79、108、122、206、213	5
INH+ SM	142、181	2
SM+ EMB	85	1
INH+ RFP+ SM[a]	88、155	2
INH+ RFP+ SM+ EMB[a]	13、47、98、147、168、185、374	7

注：a，均为耐多药结核菌株

2.2 MTB139 测序及同源性分析结果

利用 Blastn 软件将所获得的 MTB139 基因序列与公共数据库 GenBank 进行同源性分析（见图 1）。同源性分析结果发现新基因 MTB139 score 值小于 40，且发现 MTB139 序列与一个功能未知的结核菌保守膜蛋白基因（Mycobacterium canettii CIPT 140070010）序列具有 29%的相似性。

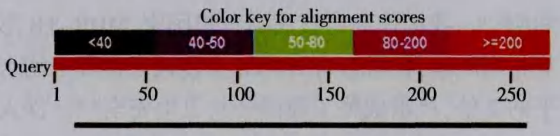


图 1 新基因 MTB139 同源性分析结果

Fig.1 Homology analysis results of MTB139

2.3 结核分枝杆菌 RNA 抽提结果

紫外分光测得 2 组 $A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$ 比值均在 1.8~2.0 之间，可以认为样品较纯，排除蛋白质等杂质的污染。1.5%琼脂糖凝胶电泳可清晰看见 RNA 条带清晰明亮，无弥散拖尾现象，见图 2。



图 2 结核菌总 RNA 提取凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of total RNA

2.4 MTB139 基因在各组结核分离株中的表达率比较

MTB139 及 sig A 基因 RT-PCR 扩增结果见图 3 及表 3，在阳性表达菌株中包含两 2 条亮带，分别代表 MTB139（159 bp）和 sigA（254 bp）。耐多药组结核菌株中 MTB139 基因阳性表达率为 55.56%，非耐多药组结核菌株中 MTB139 基因阳性表达率为 4.17%，敏感组结核菌株中 MTB139 基因阳性表达率为 3.70%。3 个不同耐药组中 MTB139 阳性表达率有统计学差异（P=0.000）。3 个组两两之间比较分析显示，耐多药

表 3 MTB139 基因在各个组中表达情况附图

Tab.3 Expression of MTB139 by group

组别	例数	MTB139表达例数（%）	3个组比较[a]	两两之间比较[b]
耐多药组	9	5（55.56%）		耐多药组 vs. 敏感组 P=0.002
非耐多药组	24	1（4.17%）	P<0.001	非耐多药组 vs. 敏感组 P=1.000
敏感组	27	1（3.70%）		耐多药组 vs. 非耐多药组 P=0.003
合计	60	7（11.67%）		

注：a，P<0.05 有统计学差异；b：P<0.016 7 有统计学差异

组临床结核分离株 MTB139 基因阳性表达率(55.56%)明显高于非耐多药组(4.17%)及敏感组(3.70%)，差异均有统计学意义(P=0.003、P=0.002)，非耐多药组与敏感组中 MTB139 阳性表达率比较无统计学差异(P=1.000)。



图 3 结核分离株内 MTB139 基因的表达

Fig.3 Expression of MTB 139 gene in *M.tuberculosis*

3 讨 论

结核病作为一种古老的传染性疾病，给公众的健康和生命造成严重的威胁。儿童特别是婴幼儿免疫功能尚不成熟，易被结核分枝杆菌感染，发展为重症结核病如结核性脑膜炎、粟粒型肺结核等。由于儿童结核病发病率较成人少，症状不典型，诊断较困难，目前对儿童结核病的研究相对较少。研究表明儿童结核病的传染源主要来源于排菌的亲密接触的成人结核患者，故儿童结核病在一定程度上可反映并预测社区结核病疫情的流行趋势，因此，儿童结核病常被视为检测结核耐药的重要指标[9]。本研究中 60 例临床结核菌分离株均来源于儿童，与成人相对比，儿童结核病多为原发性，其活动范围较窄，且菌种来源多样化，同时患儿较少伴发其他疾病，干扰因素相对较少。因此，研究 MTB139 基因在儿童结核病临床分离株中的表达更具有代表意义。本实验研究结果显示，60 个临床结核菌临床分离株中有 7 株(5 株耐多药菌株、1 株耐 INH 菌株和 1 株敏感菌株)检测到 MTB139 基因表达，MTB139基因总体阳性表达率为 11.67%。耐多药组、非耐多药组及敏感组均检测出 MTB139 基因阳性表达菌株，3 个组中 MTB139 基因阳性表达率分别为55.56%，4.17%及 3.70%。经统计学分析，3 个组 MTB139 基因阳性表达率存在统计学差异(P=0.000)。两两之间比较分析结果显示，耐多药组菌株中 MTB139 基因阳性表达率明显高于非耐多药组及敏感组(P=0.003、P=0.002)，但非耐药组与敏感组阳性 MTB139 基因表达率无统计学差异(P=1.000)。结果表明 MTB139 基因在不同耐药性结核菌株中存在差异性表达，且在耐多药结核菌株中高表达，提示 MTB139 基因可能与结核病的耐多药性有密切关系。

目前国内外尚未发现 MTB139 基因的相关报道，其作用靶点及功能尚不清楚。我们通过对MTB139 基因同源性分析发现：其与结核菌保守膜蛋白基因(Mycobacterium canettii CIPT 140070010)的相似性达 29%，推测新基因 MTB139 可能属于结核菌保守膜蛋白基因家族的新成员，或者功能相似。膜蛋白占整个基因组的五分之一，在细菌繁衍生长过程中发挥着重要作用：首先其具备完整的细胞功能，如跨膜运输、结构支撑、维持细胞电势、信号传递和代谢等，其次介导结核菌的胞内寄生，参与宿主的免疫应答等[10]。结核膜蛋白包括耐多药外排泵中的 AT 载体蛋白(carrier protein)和通道蛋白(channel protein)类蛋白。目前大多学者认为外排泵是细菌耐药性的一种重要机制，外排泵基因编码蛋白可以转运一种或多种化合物，其在结核分支杆菌耐药方面的作用逐渐被重视，目前已有研究证实了药物外排泵在结核菌对异烟肼、利福平、氨基糖苷类、四环素类等药物产生耐药的过程中发挥重要作用[11]。现研究认为膜蛋白可作为外排泵基因编码抗结核药物的主要作用靶点，并已有 20 种膜蛋白被定义为假想的药物外排泵。膜蛋白通过表达的上调或下调屏蔽或外排药物导致结核耐药性的产生[12]。目前研究发现 Rv1410、Rv1819c 和 Rv1258c 等编码的膜蛋白均参与了结核药物的外排泵耐药机制[13-16]。虽然本实验结果提示新基因 MTB139 可能与结核耐多药相关，但由于本实验随机抽取的临床结核菌样本量及菌种来源有限，只能反映 MTB139 基因在重庆地区的儿童结核菌表达的大致情况，无法代表其在不同地区、人群、样本量的表达情况。此外，MTB139 基因的功能有待进一步探索，因此，本研究仅作为 MTB139 基因与结核耐多药相关性的初步研究，其是否参与结核病耐多药性及产生耐药的机制仍需深入研究。

综上所述，本实验研究初步证实了本课题组的前期推测，验证了新基因 MTB139 在结核分枝杆菌中的表达，并且研究结果提示 MTB139 基因及 MTB139 基因差异表达可能与结核分支杆菌耐多药

密切相关。但是要证实 MTB139 基因与结核病耐多药性的相关性仍需扩大样本量及菌株来源。同时本课题组今后将深入探索 MTB139 基因的功能，以鉴定其是否参与结核分支杆菌的耐多药性，并阐明机制。如果这一推测得到印证，将有助于进一步揭示耐多药结核菌的基因表达特征及结核耐多药产生的基因调节机制，为广大结核患者带来福音。

参 考 文 献

[1] Marais BJ, Zumla A. History of tuberculosis and drug resistance [J]. N Engl J Med, 2013, 368(1): 88-89.

[2] 刘 毅. 耐多药结核病研究进展[J]. 中国现代医生, 2013, 51(21): 12-15.

[3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2014[R]. Geneva: World Health Organization, 2014: 1-171.

[4] Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. New Engl J Med, 2012(366): 2161-2170.

[5] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 505.

[6] Cohen KA, Bishai WR, Pym AS. Molecular basis of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Microbiol Spectrum, 2014, 2(3): MGM2-0036-2013.

[7] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Provisional CDC guidelines for the use and safety monitoring of bedaquiline fumarate(Sirturo) for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis[J]. MMWR Recomm Rep, 2013(62): 1-12.

[8] Zhang Y, Zheng G, Wang Y, et al. Screening and comparison of differentially expressed genes between one MDR-TB strain and the virulent M. tuberculosis H37Rv[J]. Gene, 2012, 506(1): 223-229.

[9] 彭 哲, 朱朝敏, 幸琳琳, 等. 结核分枝杆菌北京基因型菌株与重庆地区结核患儿耐药表型的相关分析[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(23): 2545-2548.

[10] Malen H, Berven FS, Softeland T, et al. Membrane and membrane-associated proteins in Triton X-114 extracts of Mycobacterium bovis BCG identified using a combination of gel-based and gel-free fractionation strategies[J]. Proteomics, 2008, 8(9): 1859-1870.

[11] 张运玲, 郑改焕, 刘芮汐, 等. 应用抑制消减杂交技术构建耐多药结核杆菌差异表达基因消减 cDNA 文库[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(10): 868-872.

[12] Li G, Zhang J, Guo Q, et al. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0119013.

[13] Bailo R, Bhatt A, Ainsa JA, et al. Lipid transport in Mycobacterium tuberculosis and its implications in virulence and drug development[J]. Biochemical Pharmacology, 2015, 96(3): 159-167.

[14] Ramon-Garcia S, Martin C, Thompson CJ, et al. Role of the Mycobacterium tuberculosis P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(9): 3675-3682.

[15] Jiang X, Zhang W, Zhang Y, et al. Assessment of efflux pumps gene expression in a clinical isolate Mycobacterium tuberculosis by real-time reverse transcription PCR[J]. Microb Drug Resist, 2008, 14(1): 7-11.

[16] Lee RE, Hurdle JG, Liu J, et al. Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux [J]. Nat Med, 2014, 20(2): 152-158.

（责任编辑：冉明会）

更 正

本刊 2016 年第 41 卷第 3 期第 61 页刊登的《胃肠道肿瘤术后并发韦尼克脑病的诊断与治疗》一文，其 DOI 号和优先出版网址更正如下：

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.000913

优先出版: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160408.1557.002.html