肺痨康抗耐异烟肼结核的分子机制与 katG 基因突变的关系初探*

卢振方　叶品良[1**]　张传涛[2]　卢润生[3]　王燕平[1]　陈　欢[1]
(1. 成都中医药大学,四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院,四川 成都 610072;
3. 四川省疾病预防控制中心,四川 成都 610041)

摘　要:目的 初步探讨肺痨康抗耐异烟肼结核杆菌的分子机制与 katG 基因突变的关系。**方法** 将耐异烟肼肺结核模型小鼠随机分为空白组、模型组、异烟肼组、肺痨康组、联合用药组,并设标准菌株组。造模成功后,灌胃 56 d 后,观察并记录小鼠一般体征和体重变化,取出相同部位肺脏组织,HE 染色观察小鼠肺组织病理变化,提取部分样本结核杆菌 DNA,进行全基因测序,观察 katG 基因突变位点变化。**结果** 各治疗组的病理损伤均明显轻于模型组异烟肼组见结核小节形成,肺痨康组及联合用药组未见典型结核结节,全基因测序发现模型组、异烟肼组、肺痨康组以及联合组 katG 基因第 315、463 位密码子由 AGC、CGG 突变为 ACC、CTG,标准菌株未显示 katG 基因突变。**结论** 肺痨康可以改善耐异烟肼结核小鼠的生存状态,减少肺组织的炎性反应,其发挥作用的分子机制与 katG 基因回复突变相关性较弱。

关键词:肺痨康;耐异烟肼结核杆菌;分子机制;katG 基因突变
中图分类号: R 285　R 52　　**文献标识码:** A　　**文章编号:**1672-0571(2015)05-0151-05
DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2015.05.058

A Study on Relationships Between the Molecular Mechanism of Feilaokang Capsule Counteracting Isoniazid-resistant Tuberculosis and Its Associated katG Gene Mutations

Lu Zhenfang[1], Ye Pinliang[1], Zhang Chuantao[2], Lu Runsheng[3], Wang Yanping[1], Chen Huan[1]
(1. Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;
2. The Affiliated Hospital of Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610072, China;
3. Sichuan Center of Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China)

Abstract　Objective: To preliminarily explore the correlations between the molecular mechanism of Feilaokang Capsule to counteract isoniazid-resistant tuberculosis and katG gene mutations. **Methods** The isoniazid-resistant tuberculosis mice were randomly divided into blank, model, isoniazid, Feilaokang and combination groups, with a standard strain group set up. After the model mice created and fed for 56 days, the changes of their body's general signs and weight were observed and recorded. The same parts of the lung tissues were removed to observe their pathological changes by HE staining and take mycobacterium tuberculosis DNA from part samples for complete gene sequencing to watch the site changes of KatG gene mutation. **Results:** The pathological damages of each treatment group were significantly lighter than model

* **基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81173382)
** **通讯作者:**叶品良(1957-),男,成都中医药大学教授,硕士研究生导师,研究方向:呼吸系统疾病复方配伍规律的理论、临床及实验研究,E-mail:mrypl@163.com

group and the tubercles were formed in isoniazid group, but there were no typical tuberculous nodules in Feilaokang and combination groups. The complete gene sequencing results showed that the 315th and 463rd codon of katG genes mutated from AGC and CGG into ACC and CTG in model, isoniazid, Feilaokang and combination groups while standard strains did not show katG gene mutations. **Conclusion**: Feilaokang Capsule can improve the existent state of isoniazid-resistant tuberculosis mice and reduce the inflammatory reaction of lung tissues. The molecular mechanism of its function has lesser correlations with katG gene reverse mutations.

Keywords Feilaokang Capsule; isoniazid-resistant tuberculosis; molecular mechanism; KatG gene mutation

我国是世界上结核病负担最重的国家之一,年发病人数约为 130 万,占全球发病率的 14.3 %,位居世界第 2 位,且一线抗结核药物的耐药率达 36.8 %,寻找有效抗耐药结核方法刻不容缓。肺痨康是根据多年实践经验,在前人辨治“肺痨”经验的基础上总结出的一张实用方剂。前期临床研究发现肺痨康治疗肺结核有较好疗效[1];对结核分枝杆菌,尤其是耐药结核菌有明显的抗菌作用,且能明显抑制炎性反应,减轻组织损伤[2-3];高剂量肺痨康能显著升高 CD4+T 细胞数,具有明显免疫调节抗结核的作用[4]。目前已知的异烟肼(INH)产生耐药的相关突变基因主要有 katG、inhA 等。编码过氧化氢酶-过氧化物酶的 katG 基因和编码烯酰基还原酶的 inhA 基因的突变是结核分枝杆菌耐 INH 的主要分子机制[5]。基于肺痨康前期研究成果,提出“肺痨康抗耐异烟肼结核的主要分子机制在于可以修复耐异烟肼结核菌 katG、inhA 等突变基因”的假说,并在国家自然基金的资助下对肺痨康抗耐异烟肼结核的分子机制与 katG 基因突变之间的关系进行实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *动物* SPF 级昆明种小鼠 120 只,雌雄各半,体重 18-22 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号:SCXK(川)2013-24。

1.1.2 *实验菌株* 结核分枝杆菌单耐异烟肼菌株和结核杆菌标准菌株由四川省疾病预防控制中心结核病防治研究所提供。

1.1.3 *治疗用药* 肺痨康水煎液:蒸百部、白及、天门冬、川贝母、猫爪草、北沙参、阿胶、蛤蚧粉等 12 味中药组成。中药均购于北京同仁堂成都分店。药液制备:将全方药物(阿胶、蛤蚧粉除外)按常规煎煮方法熬制,用电子恒温水箱 60 ℃低温浓缩成 1 g 生药/mL 的药液,趁热加入阿胶、蛤蚧粉,放 4 ℃冰箱保存备用,临用时加热。实验所需药液为一次性熬制完成。

异烟肼片:沈阳红旗制药有限公司,批号:1309021。1 mg/片。研粉,加生理盐水稀释。

1.1.4 *主要试剂* DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, 69504);TruSeq DNA LT Sample Preparation Kit(Illumina,FC-121-2001);Agencourt® AMPure XP Beads(Beckman,A63881);Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Q32854); Agilent High Sensitivity DNA Kit(Agilent,067-4626);HiSeq PE Cluster Kit v4(Illumina,PE-401-4001);HiSeq SBS Kit v4(Illumina,FC-401-4003)。

1.1.5 *主要仪器及设备* 电子称重天平(广州中山市金利电子衡器有限公司);4 ℃冰箱(海尔集团);手动轮转式切片机(德国 Leica 公司);电子恒温水箱:(北京中兴伟业仪器有限公司);光学显微镜:(Olympu 公司);Qubit® 2.0 Fluorometer(Invitrogen);Magnetic Stand-96(Life Technologies);GeneAmp PCR System 9700(Life Technologies);MicroCentrifuge (Eppendorf); Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent),; ThermalStat Plus (Eppendorf); cBot Clonal Amplification System (Illumina)。

1.2 实验方法

1.2.1 *肺结核小鼠模型制备及分组* 参照文献[6]采用小鼠尾静脉注射法建立肺结核动物模型。选取 120 只 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,随机分为空白组、模型组、异烟肼组、肺痨康组、标准菌株组,每组 20 只小鼠。模型组、异烟肼组、肺痨康组小鼠尾静脉注射耐异烟肼菌悬液 0.1 mL(含 105 cfu 细菌),同样方法对标准菌株组造模。

1.2.2 *治疗给药* 各组动物于造模一周后开始灌胃治疗。①肺痨康组:参照前期实验研究结果[2]并

按国家中药管理局的相关规定,以 6 g/kg 为高剂量进行灌胃治疗;②异烟肼组:给予同体积的异烟肼灌胃。参照相关指南[7],对耐药结核病给予高剂量异烟肼(0.016-0.02 g·kg-1·d-1)治疗,以正常成人体重 70 kg,小鼠体重 20 g 按体表面积比(0.0026)等效剂量进行换算,小鼠给药量为 0.15 g·kg-1·d-1;③异烟肼联合肺痨康组:给予同体积的异烟肼及肺痨康混悬液灌胃(配伍比例 1:1);④标准菌株组、空白组及模型组:分别给予同体积的生理盐水灌胃。以上 6 组均每日灌胃一次,连续灌胃 56 d。

1.3　观察指标

1.3.1　小鼠一般体征观察　观察小鼠的毛发光泽度、毛发稀疏度、小鼠活动度、食欲、大便,以及有无死亡情况,并记录。

1.3.2　肺脏组织 HE 染色　颈椎脱臼法处死小鼠,用 75 % 酒精消毒小鼠体表 5 分钟,无菌条件下解剖小鼠,分离出肺脏,取部分浸泡于含生理盐水的无菌试管内;由低浓度到高浓度酒精作脱水剂,逐渐脱去组织块中的水份,再将组织块置于二甲苯中透明;将已透明的组织块置于已溶化的石蜡中进行包埋;待包埋好的组织块变硬后,在切片机上切片;一般 3-5 um 厚;切片经 80 ℃烤片半小时后进行一系列 HE 染色处理,将制作好的病理切片在镜下观察。

1.3.3　基因测序　各组随机取 1-2 只小鼠肺组织标本,采用 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506)按照生产厂商提供的操作流程进行 DNA 抽提及纯化,纯化后的 DNA 经 Qubit® 2.0 Fluorometer 和 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳进行质检,质检合格的 DNA 进行后续的测序实验。按照实验说明书对基因组 DNA 进行片段化,末端修复、3' 末端加 A、连接接头、富集等步骤,完成测序样本文库构建。所建文库使用 Qubit® 2.0 Fluorometer 检测浓度,按照 cBot User Guide 所示相应流程,在 Illummina HiSeq 2500 测序仪配套的 cBot 上完成 Cluster 生成和第一向测序引物杂交。按照 HiSeq 2500 User Guide 准备测序试剂,将携有 cluster 的 flow cell 上机测序。测序过程由 Illumina 提供的 data collection software 进行控制,并进行实时数据分析。

1.4　统计学方法　测序得到的原始图像文件,经过碱基识别及误差过滤,得到可以用于分析的原始测序片段(Reads,见图 1),它包括序列的碱基组成信息以及其对应的序列质量信息。对测序得到 Reads 进行过滤,去除总体质量偏低的 reads,将质量大于 20 碱基所占比例小于 50 % 的 reads 去除;去除 3' 端质量 Q 低于 10 的碱基,即碱基错误率小于 0.1;去除长度小于 20 的测序片段(reads)等。使用 bwa 软件(version 0.7.8)对预处理后的 reads 进行序列对比(Mapping),生成的比对结果为 BAM 文件,结果由 GATK UnifiedGenotyper 对样品 bam 文件同时处理,得到的 vcf 文件,snpEff 软件完成突变的注释,通过 Perl 脚本处理得到最终的结果。同一个项目下的所有样品放在同一个 excel 表格下进行筛选比较。

```
1 @HWI-ST1283:64:C202MACXX:2:1101:8277:2404 1:N:0:GTCCGC
2 GTCTTCTTTAATGCCACCAACAAATATCTTTTTCACAGTTAAGTGGGCACCTGGTCTTTGAGAATCTTCTCTGGAGACAGCTCTCTTTGGTTCCACAACT
3 +
4 CCCFFFFFHHHHHJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJIGIIIIIJJJJJJJJJFHJJJJIJJJIIJIIJJJJJIEHHHFFFFFFEEEEEDDDDEDDDDD
5 @HWI-ST1283:64:C202MACXX:2:1101:8738:2405 1:N:0:GTCCGC
6 CCCATCTCAGCAGCCTCCTTCTCAAATTTTTCAATGGTTCTTTTGTCGATGCCACCGCATTTATAGATCAGATGGCCAGTAGTGGTGGACTTGCCCGAAT
7 +
8 CCCFFFFFHHHHHJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJIJJFHGIJJJJIJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJJIJIHHHHHHBDFFEEEEEEDDDDDDDDDDDDDDD
9 @HWI-ST1283:64:C202MACXX:2:1101:8528:2492 1:N:0:GTCCGC
10 GGGGCATCAATGATAGTCACATAGTACTTGCTGGTCTCAAATTTCCACAAGGAGATATCAATGGTGATACCACGTTCACGCTCAGCTTTCAGTTTATCCA
11 +
12 CCCFFFFFHHHHHJJJJJJJIIJIHJJJJHIJJJHHIJJJJJJJJIJIFIIIJJJIJJJJJJIJFHCHFGHIJJGEEEHHHFFFEEEEEEDDCFEDDDDD
13 @HWI-ST1283:64:C202MACXX:2:1101:8548:2496 1:N:0:GTCCGC
14 GTTGTGGTCTGAGGTTGAGCGTATGCATGAGCAGGTTCTGGGATCCCATAACTGTTGGAATTCCTATTTCCATGCTTTCCGTGTGGTGAGGATCTCACAA
15 +
16 BBBFFFFDHHHHHJIJJIJJJHJJJJJJJJJGJJJHJJJJJJIIJJIIJJJJJJIJJJJJJJJJJJJ3AHHHHHFEFFFFDEDEDDDDDDDDDDDDDDD
17 @HWI-ST1283:64:C202MACXX:2:1101:8853:2312 1:N:0:GTCCGC
18 CGCCATTCGAATTTCAGTTCTGTACATCTGCCTATATTCCTTGTGATAGTGCTTTGCTTTTTCATAGATAAGCTTCCTCCTTGCCTTTCGAAGCATCTTT
19 +
20 CCCFFFFFHHHHHJJJJHIJJJJJIJIJJJJJJIJIJJJJJIJHIGIIJIIIHHIJJJJJJJIJJJJJGJHIJIJHIJJJJJIJJHHHHHDEEDDEEEDD
```

图 1　Reads 部分截取展示如下

注:每条 Reads 由四行组成,分别为 Reads 名称、碱基序列、+(无意义)、Reads 测序质量值。

2　结果

2.1　小鼠一般体征　空白组小鼠皮毛光滑、有光泽,无脱毛现象,饮食正常,无小鼠死亡。模型组小鼠皮毛稀疏、无光泽,部分喜扎堆蜷缩,反应迟钝,进食减少,死亡 9 只,解剖发现小鼠肺脏密布粟粒样结节,或散在大小不等结节,治疗组小鼠状况介于空白组与模型组之间。标准菌株组小鼠皮毛较稀疏、无光泽,部分喜静懒动,部分反应较迟钝,小鼠死亡 5 只,经解剖发现小鼠肺组织布满粟粒样大小结节。

2.2　光镜下观察小鼠肺、肝、脾病理形态学变化(HE 染色)　200 倍光镜下观察发现空白组小鼠肺组织结构完整,清晰可见,细胞形态正常无变异;模型组病变以渗出为主,组织结构破坏,白细胞聚集,有大量炎性细胞浸润,肺脏可见朗罕氏巨细胞形成,炎症反应严重;各治疗组均以少量渗出或少量增生性病变为主;异烟肼组见结核小节形成,肺痨康组及联合用药组未见典型结核结节(见表 1)。

表 1　小鼠脏器病理组织学结果(HE 染色)

组别	动物(n)	肺脏炎症(只)			
		无	轻	中	重
空白组	10	2	8	0	0
模型组	10	0	0	1	9
异烟肼组	10	0	4	5	1
肺痨康组	10	0	8	1	1
联合用药组	10	0	8	2	0
标准菌株组	10	0	0	2	8

注:无病变:组织结构完整,细胞形态无变异,无白细胞浸润;病变轻:组织结构完整,有白细胞浸润;病变中:组织结构部分破坏,白细胞聚集,形成小的结核结节;病变重:组织坏死,形成空洞或大的结核结节。

2.3　组 katG 基因突变情况　见表 2。

表 2　耐异烟肼结核杆菌 katG 基因突变形式以及氨基酸改变

序号	样本名称	核苷酸改变	密码子位点	氨基酸改变	变异类型
1	标准菌	/	/	/	/
2	模型组	AGC->ACC 和 CGG->CTG	315 和 463	Ser->Thr 和 Arg-->Leu	错义突变
3	异烟肼	AGC->ACC 和 CGG->CTG	315 和 463	Ser->Thr 和 Arg-->Leu	错义突变
4	肺痨康	AGC->ACC 和 CGG->CTG	315 和 463	Ser->Thr 和 Arg-->Leu	错义突变
5	联合组	AGC->ACC 和 CGG->CTG	315 和 463	Ser->Thr 和 Arg-->Leu	错义突变

3　讨论

基因突变是指基因组 DNA 分子发生的突然的、可遗传的变异,一般在结构上发生碱基对组成或排列顺序的改变。基因虽然十分稳定,能在细胞分裂时精确地复制自己,但这种隐定性是相对的。目前研究发现,基因突变修复的机制主要包括尿嘧啶糖基酶系统(复制错误的修复)、重组修复等,这些机制促使基因突变的可逆性和可修复性。突变基因的回复突变为治疗很多疾病提供了可能并有可能成为治疗疾病一种可能的方法。如涎腺多形性腺瘤发生过程中具有较高频率的 p53 基因突变,突变方式多样,涉及多个密码子,外源性野生型 p53 可有效地修复涎腺多形性腺瘤细胞中突变的 p53 基因位点,为治愈涎腺多形性腺瘤提供了希望[8]。

INH 是防治结核病的一线用药,它可以被 MTB 内过氧化氢酶一过氧化物酶激活,作用于 enoyl-酰基载体蛋白(acyl carrier protein,ACP)还原酶,抑制细胞壁分支菌酸的生物合成,造成细胞壁的破损,使分支杆菌抵抗氧化和侵袭的屏障受到损害。目前已知的 INH 耐药相关突变基因有 katG、inhA、kasA、ahpC 和 oxyR。编码过氧化氢酶-过氧化物酶的 KatG 基因和编码烯酰基还原酶的 inhA 基因的突变是结核分枝杆菌耐异烟肼的主要分子机制[5]。

katG 是过氧化氢酶一过氧化物酶的编码基因,katG 基因的变异导致的 MTB 触酶一过氧化物酶活性降低或缺失可以解释 90 % 以上的异烟肼耐药。KatG 的完全缺失主要出现于高耐异烟肼分离株中;katG 随机突变最常见的位点是 315 位密码子[9-11]。该位置的变异通过对 katG 活性位点甲基化阻碍了异烟肼与 katG 的结合,导致酶失去活化异烟肼的能力。中药复方成分复杂,其作用机制研究历来是中医药现代化研究过程的难点。前期研究证明,肺痨康治疗肺结核有较好疗效,对结核分枝杆菌,尤其是耐药结核菌有明(下转第 185 页)

平。80 % 乙醇提取时,能避免用水作为溶剂时提取杂质多,过滤操作困难等不利因素,也能提取出较多的组份,保证药效物质的充分溶出,是一种比较适合大量提取的方法。

参考文献

[1]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)(2010 年版)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:260.
[2]张廷模. 中药学[M]. 北京:高等教育出版社,2002:265.
[3]颜永刚,邓翀,刘静,等. 桃仁与山桃仁石油醚部位气相色谱-质谱联用分析比较[J]. 时珍国医国药,2011,22(8):1812-1814.
[4]裴瑾,颜永刚,万德光,等. 桃仁脂肪酸 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2360-2362.
[5]裴瑾,颜永刚,万德光. 桃仁油对动物血液流变学及微循环的影响[J]. 中成药,2011,33(4):587-589.
[6]裴瑾,颜永刚,万德光. 桃仁中脂肪酸的含量分析研究[J]. 中药材,2009,32(6):908-910.
[7]颜永刚. 桃仁质量研究[D]. 成都中医药大学,2009.
[8]颜永刚,裴瑾,万德光. 桃仁和山桃仁中的氨基酸分析[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(6):63-64.
[9]颜永刚,裴瑾,邓翀. 桃仁的酸败度及其限制的分析[J]. 河南中医,2010,30(5):510-512.
[10]颜永刚,裴瑾,万德光. HPLC 法测定不同产地和品种桃仁中苦杏仁苷[J]. 中草药,2008,39(9):1415-1416.
[11]颜永刚,裴瑾,杨新杰,等. 中药桃仁的品种、品质与药效相关性分析研究[J]. 成都医学院学报,2011,6(4):296-298.
[12]颜永刚,雷国莲,刘静,等. 中药桃仁的研究概况[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2262-2264.

(收稿日期:2015-04-02　**编辑**:文颖娟)

(上接第 154 页)显的抗菌、抗炎、调节免疫等作用[1-4],所以提出肺痨康具有回复 katG 基因突变的假说,然而目前初步的实验结果显示,肺痨康在治疗耐异烟肼结核小鼠方面依然具有重要作用,它不仅能改善模型小鼠的生存状况,还能控制肺脏炎症反应的发生(表 1),研究发现实验提供的结核杆菌 katG 基因突变类型为错义突变,手工筛选对比数据库发现,模型组第 315、463 密码子发生改变,核苷酸序列分别由 AGC、CGG 突变为 ACC、CTG,对应的氨基酸改变分别 Ser->Thr 和 Arg-->Leu,而异烟肼组、肺痨康组以及联合组 katG 基因突变位点与模型组一致(见表 2),可见肺痨康对耐异烟肼结核杆菌的分子机制与 katG 基因回复突变关系不大,对于肺痨康对耐药肺结核的分子机制的还需从其他层次探讨。另外,在 bam 导出的数据库中我们还发现了大量的核苷酸多态性(SNP)位点,需要进一步结合国内外最新研究成果加以对比、筛选研究。

参考文献

[1]叶品良,卢润生,黄秀深,等. 肺痨康治疗肺结核 69 例[J]. 江西中医药,2009,40(2):33.
[2]王帅,叶品良,申金贵,等. 肺痨康对结核杆菌体内抑菌实验研究[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(1):37-38.
[3]刘婷婷,叶品良,王帅,等. "肺痨康"对耐多药结核分枝杆菌抑菌效力的体外研究[J]. 光明中医,2008,19(10):1453-1454.
[4]申金贵,叶品良,王帅,等. 肺痨康对小鼠结核病模型的免疫指标观察[J]. 浙江中医药大学学报,2010,34(1):48-49.
[5]HerreraL, ValverdeA, SaizP, et al. Molecular characterization of isoniazid - resistant Mycobacterium tuberculosis clinical strainsi solated in the Philippines[J]. Int J Antimicrob Agents,2004,23(6):572.
[6]漆浩珊,卢润生,杨奇,等. 不同毒力菌株与感染途径在树造结核动物模型中的作用[J]. 四川医学,1997,18(3):150-152.
[7]肖和平. 耐药结核病化学治疗指南[J]. 中国防痨杂志,2010,27(4):181-198.
[8]王旭,王洁,董福生,等. 野生型 p53 对涎腺多形性腺瘤细胞突变基因的修复[J]. 中华口腔医学杂志,2007,42(3):144-147.
[9]张俊仙,吴雪琼,刑婉丽,等. 应用基因芯片技术检测耐利福平结核分枝杆菌基因型[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(13):1572-1577.
[10]吴雪琼. 耐药性结核分枝杆菌的分子生物学研究现状[J]. 中华结核和呼吸杂志,2006,29(12):837-840.
[11]Wang Y, Zhang WH, Zhao JR, et a1. Detection of katG 315 gene mutation associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis by templatmdirected dyeterminator incorporation with fluorescence polarization detection technology[J]. Zhonghua Jie He Hu xi Za Zhi, 2004,27(3):179-182.

(收稿日期:2015-07-15　**编辑**:文颖娟)