

结核分枝杆菌贝达喹啉耐药基因及耐药机制研究进展

杨军¹, 邓强^{2*}, 李军杰³, 杜健强¹, 张丽娟¹

1. 甘肃中医药大学 研究生院, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院 医务处, 3. 脊柱骨二科, 兰州 730050

【摘要】 耐药性结核病一直是传染病研究中的重难点之一, 其在全球蔓延已严重威胁公共卫生, 成为WHO消灭结核病策略的一大阻碍。新型抗结核药物贝达喹啉成为耐药性结核病患者的希望, 提高了治愈率, 降低了结核病复发率和死亡率, 与传统抗结核药物相比具有降低耐药性的优势, 但在我国临床使用时间相对较晚, 其耐药相关基因研究较少, 临床使用经验有限。本文结合相关文献, 对结核分枝杆菌贝达喹啉耐药相关基因(rv0678、atpE、pepQ、rv1979c)及耐药机制研究进展进行综述, 以期为我国结核病防治工作者提供借鉴与参考。

【关键词】 结核分枝杆菌; 贝达喹啉; 耐药基因; 耐药性结核病; 研究进展

【中图分类号】 R978.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-3384(2023)09-0017-04

Doi: 10.3969/j.issn.1672-3384.2023.09.004

Research progress on bedaquiline resistance gene and mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*

YANG Jun¹, DENG Qiang^{2*}, LI Jun-jie³, DU Jian-qiang¹, ZHANG Li-juan¹

1. Graduate School, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Medical Administration, 3. Department of Spine and Bone, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

【Abstract】 Drug-resistant tuberculosis has always been one of the major difficulties in infectious disease research, and its global spread has posed a serious threat to public health, becoming a major obstacle to WHO's tuberculosis eradication strategy. The new anti-tuberculosis drug, bedaquiline, has become a hope for patients with drug-resistant tuberculosis, improving the cure rate and reducing the recurrence rate and mortality rate of tuberculosis. Compared with traditional anti-tuberculosis drugs, it has the advantage of reducing drug resistance. However, its clinical use in China is relatively late, the research on its resistance-related genes is lacking, and the clinical use experience is limited. Based on the relevant literature, this paper reviews the research progress on the genes related to bedaquiline resistance (rv0678, atpE, pepQ, rv1979c) and the mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*, in order to provide reference for tuberculosis prevention and control workers in China.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; bedaquiline; resistance genes; drug-resistant tuberculosis; research progress

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)入侵人体而引起的慢性传染性疾病, MTB可能会入侵人体全身各器官^[1]。2019年全球耐多药结核病(multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB)或耐药性结核病患病人数为46.5万, 我国约有6.5万耐药性结核病患者, 占全球患病人数的14%^[2]。耐药性结核病的治疗非常困难, 成功率仅为57%, 每年只有1/3的耐药性结核病患者获得治疗^[3]。耐药性结

核病的防治一直是世界传染病防治工作的重难点, 难以被治愈, 需要使用强效、潜在有毒副作用的药物进行长期治疗, 且其耐药机制仍是一个尚未完全阐明的全球性问题。贝达喹啉(bedaquiline)作为新型抗结核药物, 与传统抗结核药物相比具有降低耐药性的优势, 但在我国临床使用时间相对较晚, 其耐药相关基因研究较少, 临床使用经验有限。本文结合最新文献, 对结核分枝杆菌贝达喹啉耐药性相关基因及机制研究进行综

基金项目: 甘肃省财政转移支付地方项目(20210140305)

*通信作者: 邓强, 硕士, 主任医师, 研究方向: 中西医诊疗脊柱疾患及常见骨伤科疾病。E-mail: znzsjzez@163.com

述,以期为我国结核病防治工作者提供借鉴与参考。

1 贝达喹啉抗结核分枝杆菌作用机制

2016年,贝达喹啉获得国家食品药品监督管理总局的批准,2020年首次进入我国市场并纳入医疗保险目录,贝达喹啉(研发代号:TMC-207或R207910)是二芳基喹啉类的代表药物,作为全新机制的抗结核药物,相比于其他抗结核药物,其作用机制新颖独特、抗MTB活性强、疗效好^[4]。贝达喹啉通过与MTB的腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)合成酶亚基c结合,降低ATP合成酶活性,导致ATP合成受阻,最终减少MTB中的ATP能量供应而发挥抗菌作用^[5]。贝达喹啉在降低结核病复发率、缩短病程以及治疗MDR-TB方面均发挥重要作用。由于贝达喹啉与传统抗结核药物作用机制的不同,两者之间并无交叉耐药性,且前者对MTB有较高的抗菌性。

2 贝达喹啉耐药相关基因及机制

由于贝达喹啉等二线药物在临床使用过程中存在不规范,近年来报道的获得性贝达喹啉耐药性结核病患者越来越多^[6]。研究发现,抗结核药物作用位点的基因突变与MTB产生耐药性紧密相关,主要的耐药相关靶位基因包括rv0678、atpE、pepQ及rv1979c^[7]。

2.1 rv0678

rv0678(基因编号:888235)全长498 bp,其基因突变可以增强MTB膜外排MmpS5/MmpL5膜蛋白的表达,降低胞内药物浓度,从而使药物疗效减弱^[8]。rv0678的突变导致贝达喹啉的外排增加使MTB对贝达喹啉产生耐药,对347株贝达喹啉耐药结核病患者基线分离物进行rv0678相关变体基因组测序,结果发现有23/347(6.6%)的菌株存在rv0678基因突变,在这些菌株中,约1/3对贝达喹啉产生耐药^[9]。Yang等^[10]从518例陕西地区结核病患者中分离到MTB菌株,采用微孔板阿尔玛蓝显色法检测其最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC),并对贝达喹啉MIC值为0.12 μg/mL的分离株进行基因组测序。结果发现,518株MTB菌株中分离出贝达喹啉耐药株10株(1.93%),其耐药率与性别、年龄、治疗史、地区及基因型无关。5株贝达喹啉耐药株和

1株贝达喹啉敏感株携带rv0678突变体(共鉴定出G5T、A263G、C185T、g19缺失及C265T、T323C突变类型),atpE和pepQ基因未见突变。贝达喹啉对MTB具有较强的体外抑菌活性,rv0678基因突变是导致该地区结核病患者贝达喹啉耐药的主要原因,rv0678基因的3种新突变类型(g19缺失型、C265T突变型和T323C突变型)与贝达喹啉耐药相关。

Richard等^[11]为了解贝达喹啉和氯法齐明抗MTB的作用机制及确定MTB产生耐药性的途径,对MTB进行了全基因组测序,鉴定出MAB_2299c突变,编码推定的TetR转录调节因子。MAB_2299c的点突变或缺失与MmpS和MmpL转录物的伴随上调相关。rv0678突变体对药物的耐药性水平与MAB_2299c突变体的耐药水平相似,且MAB_2299c突变可能与rv0678突变有关。总体而言,MAB_2299c可能代表在临床中使用贝达喹啉治疗结核病时需要考虑的重要耐药标志物。Saeed等^[12]对耐药性结核病患者的48株MTB临床分离株进行了全基因组测序。这些分离株包括38株耐多药/耐多药前期/广泛耐药(multidrug-resistance/pre-multidrug resistance/extensively drug-resistance,MDR/pre-XDR/XDR)菌株和10株广泛药物敏感型MTB分离株。结果显示,在贝达喹啉耐药菌株和中间体中44%(8/18)的MTB分离菌株中存在rv0678的突变体(S63R/G突变体,2个为已报告,6个为既往未报告的变异;L40F、R50Q及R107C突变体;3个移码突变:G25fs、D64fs和D109fs),这些分离菌株均具有贝达喹啉耐药性(MIC≥0.5 μg/mL)。李东硕等^[13]的研究构建MTB外排泵表达载体蛋白MmpL5及MmpS5/MmpL5,在MTB中诱导表达2个蛋白,表达菌株的生长不受影响,结果发现MmpS5/MmpL5蛋白的菌株外排能力增加,贝达喹啉对MmpS5/MmpL5重组MTB的MIC增加了8倍。说明MTB的膜蛋白MmpL5和MmpS5需要共表达才能发挥作用,降低贝达喹啉的药物敏感性。

2.2 atpE

atpE(基因编号:886937)全长246 bp,编码F1/F0-ATP合成酶的亚基c,是贝达喹啉独特的作用靶点。atpE基因突变(氨基酸改变为Ala63Pro)导致MTB对贝达喹啉耐药首先由Nguyen等^[14]发现。已有文献表明,c亚基是贝达喹啉主要的作用位点,在30%

的贝达喹啉耐药菌株中发现该基因的突变体^[15]。atpE突变阻止贝达喹啉与c亚基的结合,ATP合成酶的活性降低约10倍,从而抑制H⁺转移和ATP的产生,导致MTB对贝达喹啉产生耐药性。Zimenkov等^[16]从27例利奈唑胺获得性耐药且对贝达喹啉耐药(MIC≥0.06 mg/L)的患者中分离85株菌株,对其进行相关基因测序。结果显示,在2例患者的6株分离株中发现atpE突变体,为D28N和A63V。另一项研究对68例广泛耐药性结核患者的分离菌株进行基因分析^[17]。结果发现,1株分离株与位于145(CTG-145-CCA)的atpE基因突变有关,氨基酸从亮氨酸变为脯氨酸(L-49-P),这是未曾报道过的新型突变。根据研究报告,大多数MTB临床分离株在贝达喹啉靶点基因atpE中携带位于28和63位突变:28位被甘氨酸(D28G)取代,63位被脯氨酸(A63P)取代^[18]。事实上,atpE中D28和A63并不直接参与贝达喹啉的结合,其形成的非共价键破坏会导致MTB对贝达喹啉产生耐药。

Peretokina等^[19]采用Sanger法分析了服用贝达喹啉患者的182株临床分离株和未服用贝达喹啉患者的163株临床分离株atpE基因测序。与对照分离株(89%菌株MIC≤0.03 mg/L)相比,服用贝达喹啉患者分离菌株中73%菌株的MIC均有升高(MIC≥0.12 mg/L,两组均在7H11培养基中培养)。在这些分离菌株中观察到突变体(E61D和A63P)和新型atpE突变体(G25S和D28G)。atpE基因中63个密码子的取代可能与药物MIC升高有关。atpE基因突变致MTB对贝达喹啉耐药,使该药物的MIC增加8~133倍。

2.3 pepQ

pepQ(基因编号:888409)又称rv2535c,全长1119 bp,编码的372位氨基酸蛋白有2个结构域,为100-aa N-末端α/β结构域和250-aa C-末端肽酶结构域,编码产物可能为氨基肽酶,但目前对该基因相关研究较少,其具体作用机制尚不清楚。可能是通过降低MmpS5/MmpL5蛋白的负性调控作用,增加膜外排而使贝达喹啉产生耐药^[20]。

Ismail等^[21]通过检索Europe PubMed Central和Scopus等数据库,获得41项符合纳入条件的研究报告,并从中挖掘出1708株MTB分离株的数据(1569株临床分离株和139株非临床分离株),其中有20项

(49%)研究报告了1061株MTB分离株具有pepQ变异,包括28种基因突变体。Almeida等^[20]研究发现,3株贝达喹啉耐药MTB菌株存在pepQ突变,且pepQ突变导致贝达喹啉的MIC升高4~8倍。

2.4 rv1979c

rv1979c基因可能编码参与氨基酸转运的通透酶。王璐等^[22]从189例肺结核患者中分离MTB菌株,其中筛选出4株对贝达喹啉耐药的MTB菌株,并检测其rv0678、atpE、pepQ及rv1979c 4个基因序列。结果发现,在1例贝达喹啉获得性耐药患者MTB分离株中检测出rv1979c(G730A GAA/AAA)突变,3例对贝达喹啉敏感性降低患者的MTB分离株中有1株检测出rv1979c突变。

3 总结与展望

WHO终止结核病战略的愿景是到2035年建立一个没有结核病的世界,但缺乏对耐药性结核病的有效治疗将会成为潜在的威胁。贝达喹啉是一种ATP合成酶抑制剂,是近几十年来首个批准用于治疗耐药性结核病的药物,包括大多数MDR和XDR菌株,在十几种新的抗结核药物中是研究最多的药物,可以与其他药物联合使用,具有杀灭MTB活性且出现耐药情况少、缩短治疗时间等优势^[23]。

目前,MTB对贝达喹啉产生耐药的机制尚未完全阐明,但在既往研究中,认为耐药性与贝达喹啉耐药相关基因突变有关,包括rv0678、atpE、pepQ及rv1979c的基因突变。其中,rv0678基因突变率较高,其编码MTB膜外排泵MmpS5/MmpL5系统的表达,降低胞内MIC和药物疗效,使MTB对药物产生耐药,且该药物与氯法齐明之间的交叉耐药性,以rv0678基因的突变为主;atpE基因编码ATP合成酶亚基c,阻止药物与亚基c结合,降低合成酶活性而产生耐药;pepQ基因涉及研究较少,具体机制尚不明确,可能与其编码产物氨基肽酶增加膜外排相关,且该基因的突变赋予MTB对贝达喹啉的低水平耐药性和对氯法齐明的交叉耐药性。rv0678和atpE基因的突变与贝达喹啉的敏感性降低有关,并已在体外选择的菌株和临床分离株中鉴定。虽然关于该药物相关耐药分子机制的研究从未间断过,但对于rv0678、atpE、pepQ及rv1979c中

并没有任何一个相关耐药基因的分子机制被明确阐述。对于 $pepQ$ 和 $rv1979c$ 基因突变是否与MTB贝达喹啉耐药相关仍存在一些争议,由于其突变的研究较少,还需要再深入研究以明确该基因耐药的具体机制。

目前在我国治疗耐多药结核病广泛使用含贝达喹啉的方案,可显著减轻疾病负担,降低复发率和死亡率。对贝达喹啉等药物耐药机制的深入研究可为开发新的二芳基喹啉类抗结核药物提供参考,使治疗方案向短程化、安全有效的趋势发展,提高耐药患者的治疗效果并改善预后。通过分析结核分枝杆菌对贝达喹啉发生耐药性的机制,其一,了解耐药相关基因突变,有助于开发快速精准的临床初期分子检测诊断方法;其二,有助于发现新型药物耐药靶点,促进新型抗结核药物研发,在制订治疗方案前使用药物敏感性检测以合理联合使用药物,减少耐药的发生,提高治疗成功率;其三,促进临床试验中新药的评价与标准化药敏试验的开发同步进行,这对终止结核病的流行至关重要。该药物在今后临床使用过程中如何与其他药物联合使用、耐药性监测和预防、长期用药过程中的有效性及安全性等的研究也可作为下一步探讨的方向。

【参考文献】

- [1] 王晴岚. 结核分枝杆菌耐药机制研究进展和PE/PPE蛋白在介导细菌耐药中的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(9): 1043-1051.
- [2] Bagcchi S. WHO's global tuberculosis report 2022[J]. Lancet Microbe, 2023, 4(1): e20.
- [3] Mallick JS, Nair P, Abbew ET, et al. Acquired bedaquiline resistance during the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review[J]. JAC Antimicrob Resist, 2022, 4(2): c29.
- [4] Vanavi PJ, Rajput SJ. Separation and characterization of novel degradation and process related impurities of bedaquiline bulk drug[J]. J Chromatogr Sci, 2022, 60(7): 678-691.
- [5] Lakshmanan M, Xavier AS. Bedaquiline—the first ATP synthase inhibitor against multi drug resistant tuberculosis[J]. J Young Pharm, 2013, 5(4): 112-115.
- [6] Saeed DK, Ashraf J, Hasan Z, et al. Bedaquiline resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates with and without $rv0678$ mutations have similar growth patterns under varying BDQ drug pressure[J]. Tuberculosis (Edinb), 2022, 137: 102266.
- [7] Karmakar M, Rodrigues C, Holt KE, et al. Empirical ways to identify novel bedaquiline resistance mutations in $AtpE$ [J]. PLoS One, 2019, 14(5): e217169.
- [8] 王晓英, 罗明, 张汇征, 等. 结核分枝杆菌贝达喹啉和氯法齐明耐药及其交叉耐药机制研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(2): 165-169.
- [9] Villellas C, Coeck N, Meehan CJ, et al. Unexpected high prevalence of resistance-associated $rv0678$ variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(3): 684-690.
- [10] Yang J, Pang Y, Zhang T, et al. Molecular characteristics and in vitro susceptibility to bedaquiline of Mycobacterium tuberculosis isolates circulating in Shaanxi, China[J]. Int J Infect Dis, 2020, 99: 163-170.
- [11] Richard M, Gutierrez AV, Viljoen A, et al. Mutations in the MAB_2299c TetR regulator confer cross-resistance to clofazimine and bedaquiline in Mycobacterium abscessus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(1): e01316-e01318.
- [12] Saeed DK, Shakoor S, Razzak SA, et al. Variants associated with bedaquiline (BDQ) resistance identified in $rv0678$ and efflux pump genes in Mycobacterium tuberculosis isolates from BDQ naive TB patients in Pakistan[J]. BMC Microbiol, 2022, 22(1): 62.
- [13] 李东硕, 王彬, 陆宇, 等. 结核分枝杆菌膜蛋白MmpS5-MmpL5的表达及功能研究[J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(3): 227-233.
- [14] Nguyen T, Anthony RM, Banuls AL, et al. Bedaquiline resistance: its emergence, mechanism, and prevention[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(10): 1625-1630.
- [15] Iqbal IK, Bajeli S, Akela AK, et al. Bioenergetics of Mycobacterium: an emerging landscape for drug discovery[J]. Pathogens, 2018, 7(1): 24.
- [16] Zimenkov DV, Nosova EY, Kulagina EV, et al. Examination of bedaquiline- and linezolid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from the Moscow region[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(7): 1901-1906.
- [17] Singh BK, Soneja M, Sharma R, et al. Mutation in $atpE$ and $rv0678$ genes associated with bedaquiline resistance among drug-resistant tuberculosis patients: a pilot study from a high-burden setting in Northern India[J]. Int J Mycobacteriol, 2020, 9(2): 212-215.
- [18] Degiacomi G, Sammartino JC, Sinigiani V, et al. In vitro study of bedaquiline resistance in Mycobacterium tuberculosis multi-drug resistant clinical isolates[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 559469.
- [19] Peretokina IV, Krylova LY, Antonova OV, et al. Reduced susceptibility and resistance to bedaquiline in clinical M. tuberculosis isolates[J]. J Infect, 2020, 80(5): 527-535.
- [20] Almeida D, Ioerger T, Tyagi S, et al. Mutations in $pepQ$ confer low-level resistance to bedaquiline and clofazimine in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(8): 4590-4599.
- [21] Ismail N, Riviere E, Limberis J, et al. Genetic variants and their association with phenotypic resistance to bedaquiline in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and individual isolate data analysis[J]. Lancet Microbe, 2021, 2(11): e604-e616.
- [22] 王璐, 薛仲探, 王玉峰, 等. 结核分枝杆菌对贝达喹啉药物敏感性动态监测及耐药机制研究[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(5): 482-486.
- [23] Ding Y, Zhu H, Fu L, et al. Superior efficacy of a TBI-166, bedaquiline, and pyrazinamide combination regimen in a murine model of tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2022, 66(9): e65822.

收稿日期: 2023-01-19 本文编辑: 任洁