

甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药基因与耐药性关系

李晓芳 范昕建*

(四川大学华西医院感染性疾病中心 生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

摘要: 金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药的主要机制之一,是细菌染色体上的一段外源 DNA(*mecA* 基因)编码产生对青霉素亲和力极低的青霉素结合蛋白(α PBP2a),*mecA* 基因在葡萄球菌属中分布广泛,它和细菌染色体上的一些辅助基因和调控基因的共同作用下影响细菌胞壁合成,使细胞表现出异质性耐药。而且 MRSA 是医院内和社区感染的重要致病菌,由于感染后治疗困难,因此成为国内外学者关注与研究的热点。本文主要从 *mecA* 基因的来源、传播、结构功能、调控基因和辅助基因(*fem* 或 *aux* 基因)等方面进行综述。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA); *mecA* 基因; *fem* 基因; 耐药性

中图分类号: R378.1+1 文献标识码: A

The relationship between resistant gene and resistance in MRSA

Li Xiao-fang and Fan Xin-jian

(Department of Infectious Disease, West China Hospital, Sichuan University,
National Important Laboratory of Biological Therapy, Chengdu 610041)

ABSTRACT One of the resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus* was the expression of *mecA*, an exogenous gene which encoded low affinity penicillin-binding protein 2a (PBP2a). *mecA* gene, commonly occurred in MRSA, interfered the bacterial cell wall composition with some regulator and auxiliary genes, which led to bacterial heteroresistance heterogeneity. It is a major pathogen of hospitals and community infections. The article reviewed *mecA* gene in origin, transfer, structure, regulator and auxiliary gene, and so on.

KEY WORDS Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *mecA* gene; *fem* gene; Resistance

自 1961 年发现了第一株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)后,20 世纪 80 年代至今 MRSA 已成为全球医院感染的重要病原菌之一。MRSA 对除糖肽类之外的其他抗菌药物都有不同程度的耐药。对青霉素、头孢菌素和头霉素类等 β -内酰胺类抗生素有明显的可诱导耐药性^[1]。1997 年以来,世界各国又陆续报道了对糖肽类抗生素中介耐药的金黄色葡萄球菌(glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*, GISA)^[2]。因此,MRSA 的耐药性及耐药机制等相关研究备受重视,成为热点之一。

β -内酰胺类抗生素作用机制是它和青霉素结合蛋白(PBPs)共价结合,干扰其催化细胞壁肽聚糖生物合成的功能。MRSA 对 β -内酰胺类抗生素耐药机制之一 *mecA* 基因被诱导产生了一种亲和力低的青霉素

结合蛋白 PBP2a,在抑菌浓度的抗生素存在时能替代其他几种 PBPs 发挥催化细菌细胞壁粘肽交联的生理功能^[3]。目前作为对 MRSA 有效的万古霉素虽然和 β -内酰胺类抗生素一样也是作用于细胞壁的繁殖期杀菌剂,但由于其作用机制不同而对 MRSA 有良好的活性。万古霉素的作用靶位是细胞壁肽聚糖前体 D-Ala-D-Ala,万古霉素和 PBP2a 竞争性作用于该靶位使 PBP2a 失去作用从而发挥杀菌作用^[3]。由此可以设想如果能找到与 PBPs 无关的新作用靶位开发出新的抗生素,就既可以解决 MRSA 耐药问题也可以防止广泛使用万古霉素之后 GISA 菌株的出现。近年来在 MRSA 中陆续发现的一些新的基因如 *mecA* 基因的调控基因(*orf1*, *orf2*, *orf3*)和 *femABX* 家族的成员,可能正是这样的作用靶位,为新抗菌药物设计开发带来了新的希望。

收稿日期 2005-04-08 修回日期 2005-09-15

作者简介: 李晓芳,女,生于 1975 年,在读硕士研究生。主要从事感染性疾病发病机制的研究。* 通讯作者, E-mail: fanxj531008@yahoo.com.cn

1 *mecA* 基因的分布

传统的体外药物敏感方法检出的 MRSA 与 *mecA* 检测结果有很好的相关性, *mecA* 已成为 MRSA 的标志。用 DNA 杂交和多聚酶链反应(PCR)检测大量的 MRSA 分离株, *mecA* 的阳性率达到 96% ~ 100%^[4]。由于 *mecA* 基因表达的不均一性, 有些菌株有 *mecA* 基因, 但药物敏感试验结果对甲氧西林敏感。若改善培养条件(培养温度、pH 和 NaCl 浓度等), *mecA* 基因表达水平提高, 原来敏感的菌株则重新被鉴定为耐药株。

除金黄色葡萄球菌外, 日本学者从临床分离的 9 种凝固酶阴性葡萄球菌中检出了 *mecA* 基因(如表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、腐生葡萄球菌等^[5]), 提示 *mecA* 在葡萄球菌属中分布广泛。目前葡萄球菌属以外的细菌中尚未检出 *mecA* 基因。

2 *mecA* 基因的来源和传播

mecA 的来源目前尚不清楚。通过对 *mecA* 基因的序列分析表明, 此基因可能是由 β -内酰胺酶基因的调控基因和一种不明来源的编码 PBP 的结构基因融合而成^[6]。有学者认为是从一个始祖细胞垂直传播而来, 也有认为是从凝固酶阴性的葡萄球菌通过水平传播获得的, 但多数实验结果支持 *mecA* 的水平传播^[6]。各种葡萄球菌的标准株(对甲氧西林敏感)的 PBP 电泳谱不同, 而所有的甲氧西林耐药株产生的 PBP2a 都相同, 说明 PBP2a 并非从原始的葡萄球菌分化而来^[7]。此外, 从表皮葡萄球菌克隆的 *mecA* 基因序列和 MRSA 的 *mecA* 基因序列 99.5% 同源, *mecA* 相关的一些序列如 *pls* 存在于葡萄球菌的一些大质粒中^[8,9]。有些插入序列的转座子成分与 *mecA* 基因序列有关^[10]。这些发现都支持 *mecA* 基因在葡萄球菌间的水平传播。

3 *mec DNA* 及 *mecA* 基因的结构与调控

决定金葡菌对甲氧西林耐药性的遗传决定子是 *mec DNA*, 它位于金葡菌染色体上。*mec DNA* 通过点特异性整合进入 MSSA 染色体。*mec DNA* 已从不同来源的临床分离株中克隆并测序, 不同菌株中的 *mec DNA* 无论是结构, 还是核苷酸序列均有所不同, 主要表现在 *mec* 调节子 *mecR1*、*mecI* 的有无, 以及某些转位 DNA 片段的有无^[11]。尽管 *mec DNA* 呈多样性, 但编码 PBP2a 的 *mecA* 基因序列却高度保守。*mecA* 以及 *mecA* 的调控基因 *mecR1*、*mecI* 位于 *mec DNA* 的右侧, 转录方向与 *mecA* 的转录方向相反。*mec DNA* 中存在转座子 *Tn551* 插入序列 *IS431*, *IS431* 可能与其他带有相同 IS 的耐药决定子 DNA 片段或质粒进行同源重组, 从而获得对其他抗生素的耐药性。后来又发现在

mec DNA 的中部有两个编码重组酶的开放阅读框架(ORF)与 *mec DNA* 的转位有关^[12,13]。目前发现了两个新的基因 *murE*、*murF* 也涉及到转座子 *Tn551* 插入失活导致耐药水平的下降, *murF* 的插入失活也能导致异质性耐药的出现, 90% 的细菌株对苯唑西林 MIC 从 400mg/ml 降到 0.75mg/ml, 其余保持和父系菌株相当的耐药水平。这种对抗生素耐药水平的影响具有 β -内酰胺类抗生素选择性, 对磷霉素、杆菌肽、万古霉素等都没有影响。耐药水平下降菌株的肽聚糖分析显示异常的双糖三肽单体积聚, 聚合物的比例相应减少。保持耐药水平的亚群肽聚糖分析显示正常比例的聚合物和大大减少的双糖三肽的存在。Northern 分析显示在耐药水平降低的菌株中 *mecA* 的转录水平是降低的, 而保持高耐水平的亚群 *mecA* 的转录水平是增加的^[14]。*Tn551* 插入 MRSA 高耐株 COL *murE* 基因导致对甲氧西林耐药水平的大大降低同时伴随双糖二肽肽聚糖结构的积聚, 将 *murE* 插入置于 IPTG 诱导启动子 P 的调控之下, Northern 分析发现随着培养基中 IPTG(异丙基- β -D 半乳糖苷)的增多, *murE*、*pbpB* 和 *mecA* 基因的转录都增多。后两者编码在葡萄球菌甲氧西林耐药机制中起重要作用的两种蛋白质 PBP2 和 PBP2a。这提示 *murE* 突变株对甲氧西林 MIC 的显著减少可能是由细胞中这两种 PBP 不足引起的^[15]。

mecA 的转录受两套调控系统控制, 即 *mecA* 调控系统和 β -内酰胺酶调控系统。有些 MRSA 在 *mecA* 上游存在 *mecA* 的调控基因 *mecR1-mecI*, *mecR1* 编码转膜信号蛋白, 参与 *mecA* 的诱导; *mecI* 则编码 *mecA* 的抑制蛋白。 β -内酰胺酶调控基因 *blaR1* 和 *blaI* 分别编码诱导 *blaZ* 基因表达的信号转导蛋白和抑制蛋白, 调控 β -内酰胺酶的产生。目前认为 *blaR1* 和 *blaI* 也参与 *mecA* 基因转录的调控。染色体上另一个对 β -内酰胺酶诱导起作用的基因 *blaR2*, 对 *mecA* 的产生也起调节作用。*mecA* 转录有 3 种形式: ①缺少 *mecR1-mecI* 及 β -内酰胺酶质粒的 MRSA, PBP2a 的表达为组成型, 在整个对数生长期转录水平均很高, 甲氧西林对此类菌 *mecA* 基因转录无影响; ②即刻诱导, 向缺少 *mecR1-mecI* 的 MRSA 菌株 BB270 中导入 β -内酰胺酶质粒 PI524 后, *mecA* 的转录由组成型变为诱导型, 诱导开始后即刻测到 *mecA* 的转录物, PI524 并未充分抑制 *mecA* 的转录; ③延迟诱导, 完整 *mecR1-mecI* 的菌株对 PBP2a 的产生具有很强的抑制作用, 只有诱导后 48h 后才能充分表达。因此, 临床上应用常规方法进行

药敏分析时,常误将这些菌株判断为敏感株。

4 *fem*(*aux*)基因在金葡菌对甲氧西林耐药性表达中的作用

MRSA 携带 *mecA* 被认为是产生对甲氧西林耐药性的先决条件,但不同的 MRSA,其耐药水平却有相当大的变化, MIC 的范围为 1.5 ~ 1500 μg/ml。这种变化与 *mecA* 表达的关系并不大,因为尽管 MIC 值相差极大,但 PBP2a 的量却相差无几。因此,认定除 *mecA* 外,还有其他因子(X 因子)与甲氧西林耐药性的表达有关。通过 *Tn551* 介导的甲氧西林耐药性的插入失活,发现了一系列与甲氧西林耐药性表达相关的基因,称为 *fem*(factors essential for methicillin resistance)或 *aux*(auxillary),分布在染色体的不同位置,其生理功能是直接或间接地参与细菌细胞壁的生物合成^[16]。*fem* 基因灭活后,细菌对甲氧西林的耐药性降低,表现为两种情况:一种是耐药性完全丢失,如 *femA*、*femB* 的灭活;另一种仅为基础耐药性的降低,如 *femC*、*femD* 等的灭活,但无论哪种情况,均不影响 PBP2a 的产生。与 *mecA* 不同,这些基因既存在于耐药菌中,也存在于敏感菌中。敏感菌中的这些基因被灭活后,可使菌株对 β-内酰胺类抗生素敏感性提高^[17]。从目前研究所了解的结果判断 *fem* 基因有 20 个之多。简单地分为肽聚糖合成因子如 *femA*、*femB*、*femX*、*femC*、*femD*、*femE*、*femF*、*fib*, 溶葡萄球菌素抵抗因子类如 *epr*(glycylglycine endopeptidase resistance gene), *lif*(lysostaphin immunity factor), *eprK*(homologous to epr), 自我保护因子类如 *zif*(zoocin A immunity factor), *milF* 其他 *fnt*、*llm*、*agr*、*sar*、*hmrC*、*chr* 等等。FemABX 家族是核糖体外的转肽酶系统,严格说来 *agr*、*sar*、*fnt*、*llm*、*zif*、*chr*、*hmrC* 并不该纳入此家族。革兰阳性细菌细胞壁肽聚糖甘氨酸交联桥的延长是由几种转肽酶催化一个甘氨酸接一个甘氨酸逐渐加入的过程,在金黄色葡萄球菌中 *femA*、*femB*、*femX* 编码的蛋白质涉及到该过程。在链球菌中 *fibA*、*fibB* 编码的蛋白质涉及到该过程。*epr*、*lif* 可能都编码丝氨酸转肽酶,分别能将丝氨酸加入到五肽侧链的第 3 位和第 5 位。*milF* 可能编码亮氨酸转肽酶,能将亮氨酸加入到五肽侧链。

4.1 *femAB*

femAB 操纵子定位在染色体 SmaI-A 片段上的 *trpA* 位点下游,编码两个分子量为 48×10^3 和 47×10^3 的胞质蛋白 *femA* 和 *femB*,参与粘肽中甘氨酸五肽交联桥的合成。*femA* 基因突变阻断第 2、3 个甘氨酸加入到侧链;*femB* 灭活后,阻断第 4、5 个甘氨酸加入到侧链。对 *femA*、*femB* 插入灭活突变体的粘肽成分分析显

示,与母株相比,甘氨酸五肽交联桥消失或明显减少,代之以三肽或四肽甘氨酸,导致粘肽不能正常交联。*femA*、*femB* 灭活突变体的甲氧西林耐药性完全消失,且 *femAB* 基因序列在所有金葡菌中高度保守,因此,*femA*、*femB* 有可能成为抗生素作用的新靶位。

4.2 *femC*

位于染色体 SmaI-A 片段上,*femC* 灭活可使 MRSA 的基础耐药性水平降低,但可形成高度耐药的亚克隆。*femC* 的灭活所造成的甲氧西林耐药性的降低是由于细胞谷氨酰胺合成代谢被阻断。*Tn551* 插入至编码谷氨酰胺合成酶抑制子基因(*glnR*)中,影响谷氨酰胺操纵子(*glnRA*)上的谷氨酰胺合成酶基因(*glnR*)的转录,使谷氨酰胺合成酶基因活性降低,并减少对谷氨酰胺的利用,而后者在细胞的氮代谢中起关键作用。在培养基中加入谷氨酰胺可使 *femC* 突变体恢复对甲氧西林耐药性。*femC* 突变后对甲氧西林的耐药性降低的另一原因是粘肽五肽中 γ-D-谷氨酸盐的酰胺化减少,减少了粘肽的交联,从而导致甲氧西林耐药性的降低。

4.3 *femD*、*femE*、*femF*

femD 位于 SmaI-I 片段,确切作用不很清楚。*femD* 的灭活造成甲氧西林耐药性降低可能与其灭活后影响了粘肽合成的前导物形成有关。与 *femC* 类似,*femD* 灭活后使甲氧西林的基础耐药水平降低,但可形成高度耐药的亚克隆。*femD* 又称 *glmM*(1355bp),编码葡萄糖胺磷酸变位酶 GlmM,它能够催化己糖和磷酸氨基己糖的异构,从而导致 6-磷酸葡萄糖胺异构为 1-磷酸葡萄糖胺,它是 UDP-N 乙酰葡萄糖胺的前体物质。*glmM* 的插入失活可能使 UDP-N 乙酰葡萄糖胺的功能或数量异常而导致耐药水平的降低^[18]。*femE* 位于 SmaI-A 片段,突变后细菌的粘肽成分无明显变化,似乎不对甲氧西林基础耐药性产生主要影响。*femE* 的插入失活株检测其肽聚糖成分并没有发现有改变。*femF* 位于 SmaI-B 片段,与粘肽前导物的合成有关,参与 L-赖氨酸加至与尿苷二磷酸相连接胞壁酸二肽链的生物合成。*femF* 插入失活后的菌株处理后经过 HPLC 和质谱分析发现其肽聚糖由仅有 L-Ala-iGln/Glu 侧链的双糖双肽结构组成。提示其编码的蛋白质 FemF 可能涉及到肽聚糖前体合成中赖氨酸加入到侧链第 3 位上这一步,*femF* 插入失活也能导致异质性耐药表达^[19]。

可见,上述基因都涉及到葡萄球菌细胞壁肽聚糖生物合成过程,这些基因很可能成为将来设计新的抗生素的作用靶位,因为肽聚糖是细菌(尤其是革兰阳性菌)细胞壁的重要生理成分,五甘氨酸交联桥更是革兰

阳性菌非常重要的结构,在极少的致病性革兰阴性菌中发现而在人体正常的肠道菌群中不存在。在没有抗生素存在时,金黄色葡萄球菌的膜蛋白 PBP_s 是和细胞壁肽聚糖共价结合,这需要保守的 LPXTG 基序中苏氨酸(T)和甘氨酸(G)间键的断裂释放出苏氨酸的羧基发挥空间排列活性才能和肽聚糖五甘氨酸交联桥形成酰胺键。MRSA 菌株有正常的细胞壁肽聚糖才能和甲氧西林竞争性的结合 PBP_{2a},使 PBP_{2a} 在抑菌浓度的抗生素存在时能够替代其他正常的 PBP_s 发挥催化肽聚糖合成的作用,耐药水平相对较高。相反,如果细菌失去了正常的肽聚糖结构不能和甲氧西林竞争结合 PBP_{2a},从而导致耐药水平的下降。

总之,对 *mecA* 基因及调控基因和辅助基因(*fem* 或 *aux* 基因)等方面的研究,可以揭示耐甲氧西林金黄色葡萄球菌广泛传播的机制,指导合成作用靶位不同的新型抗生素,对于防治耐甲氧西林葡萄球菌的医院内感染有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] 吴本权,唐英春,张扣兴,等. 头孢拉定、头孢噻肟对 MRSA PBP_{2a} 的诱导作用以及形态、耐药性的影响[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(6): 440
- [2] Ivo G, Naxing X, Douglas A. Structural characterization of an abnormally cross-linked muropeptide dimer that is accumulated in the peptidoglycan of methicillin-and cefotaxime-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(46): 29053
- [3] Corti A, Soffientini A, Cassani G. Binding of the glycopeptide antibiotic teicoplanin to D-alanyl-D-alanine- agarose: the effect of micellar aggregates[J]. *J Appl Biochem*, 1985, 7(2): 133
- [4] Kazuhisa M, Kazuhide N, Masayoshi D, et al. Production of low-affinity penicillin-binding protein by low-and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1987, 31(9): 1307
- [5] Kazuhisa M, Alexander T. Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 874
- [6] Krishnan P, Miles K, Shetty N. Detection of methicillin and multiple resistance in *Staphylococcus aureus* isolates using conventional and molecular methods[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(10): 745
- [7] Hackbarth C, Chambers H. *blaI* and *blaR1* regulate β -lactamase and PBP_{2a} production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1993, 37(12): 1144
- [8] Savolainen K, Paulin L, Westerlund B, et al. Expression of *pls*, a gene closely associated with the *mecA* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, prevent bacterial adhesion *in vitro*[J]. *J Infect Immun* 2001, 69(5): 3013
- [9] Wu S, Lencastre H, Sali A, et al. A phosphoglucosyltransferase-like gene essential for the optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and DNA sequencing[J]. *J Microb Drug Resist*, 1996, 2(2): 277
- [10] Kuroda M, Ohta T. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Lancet*, 2001, 357(9264): 1225
- [11] Rohrer K, Ehlert M, Tschierske H, et al. The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmbB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycan interpeptide formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(16): 9351
- [12] Krzysztof S, Alexander T. Gradual alterations in cell wall structure and metabolism in vancomycin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(24): 7566
- [13] Ornelas-Soares A, de Lencastre H, de Jonge B, et al. Reduced methicillin resistance in a new *Staphylococcus aureus* transposon mutant that incorporates muramyl dipeptides into the cell wall peptidoglycan[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(44): 27246
- [14] Sobral R, Ludovice A, Gardete S, et al. Normally functioning *murF* is essential for the optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *J Microb Drug Resist*, 2003, 9(3): 231
- [15] Gardete S, Ludovice A, Sobral R, et al. Role of *murE* in the expression of beta-lactam antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(6): 1705
- [16] Hegde S S, Shradler T E. FemABX family members are novel nonribosomal peptidyl transferases and important pathogen-specific drugs targets[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(10): 6998
- [17] Ton That H, Labischinski H, Berger-Bächi B, et al. Anchor structure of staphylococcal surface proteins III. Role of the FemA, FemB and FemX factors in anchoring surface proteins to the bacterial cell wall[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(44): 29143
- [18] Lencastre H, Jonge B, Matthews P, et al. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1994, 33(1): 7
- [19] Strauss A, Thumm G, Götz F. Influence of Lif, the lysostaphin immunity factor, on acceptors of surface proteins and cell wall sorting efficiency in *Staphylococcus canosus*[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(18): 4960