

DOI:10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20246296

· 论 著 ·

结核分枝杆菌蛋白 Rv0037c 的结构和功能特征

荆雪娇¹, 宋 莉², 吴长新¹

(1. 山西大学生物医学研究院, 山西 太原 030006; 2. 山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030031)

[摘 要] 目的 揭示结核分枝杆菌易化子超家族(MFS)蛋白 Rv0037c 的结构和功能特征。方法 应用 TM-HMM Server v. 2. 0、Swiss-model、DNAMAN 等对 Rv0037c 蛋白进行生物信息学分析, 在耻垢分枝杆菌中构建 PMV261-Rv0037c 过表达菌株, 获取 pMV261/Msm 对照菌株, 分析其生物学功能。结果 Rv0037c 蛋白具有 11 个跨膜结构域(TMDs), C/N 域由“3 + 2”螺旋束组成, 在分枝杆菌属中非常保守。过表达菌株和对照菌株的生长动力学曲线几乎完全重合, 过表达菌株与对照菌株的生长量比较, 差异无统计学意义($P > 0. 05$)。对照菌株的 OD_{600} 为 $2. 567 \pm 0. 162$, 过表达菌株的 OD_{600} 为 $2. 419 \pm 0. 456$, 二者的生物膜生长量比较, 差异无统计学意义($P > 0. 05$)。过表达菌株的溴化乙锭(EB)累积量较对照菌株低, 差异有统计学意义($P < 0. 001$)。两种菌株对各种药物的最低抑菌浓度(MIC)比较, 差异无统计学意义(均 $P > 0. 05$)。结论 Rv0037c 蛋白为分枝杆菌 MFS 家族蛋白的特殊成员且结构非常保守, Rv0037c 过表达对耻垢分枝杆菌生长、菌落形态、滑动能力、生物膜形成和 MIC 均无影响, 但可使 EB 的累积量显著减少。

[关 键 词] Rv0037c 蛋白; 生物信息学; 生物学功能; 结核分枝杆菌; 耻垢分枝杆菌; 耐药性

[中图分类号] R378. 91⁺1

Characteristics of structure and functions of Rv0037c protein of *Mycobacterium tuberculosis*

JING Xue-jiao¹, SONG Li², WU Chang-xin¹ (1. Institute of Biomedical Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030031, China)

[Abstract] Objective To explore the structure and functions of Rv0037c protein, a member of major facilitator superfamily (MFS) proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods Bioinformatics analysis on Rv0037c protein was performed with TMHMM Server v. 2. 0, Swiss-model and DNAMAN software. The PMV261-Rv0037c overexpressed strain was constructed in *Mycobacterium smegmatis*, pMV261/Msm control strain was obtained, its biological function was analyzed. Results Rv0037c protein contained 11 transmembrane domains, the C/N domain consisted of “3 + 2” helical bundles, which was highly conservative in genus *Mycobacterium*. The growth kinetics curves of the overexpressed strain and the control strain almost completely overlapped, and there was no statistical difference in growth between the overexpressed strain and the control strain ($P > 0. 05$). The OD_{600} of the control strain was $2. 567 \pm 0. 162$, while that of the overexpressed strain was $2. 419 \pm 0. 456$, there was no statistical difference in biofilm growth between the two strains ($P > 0. 05$). The accumulation of ethidium bromide (EB) in overexpressed strain was lower than that in control strain, difference was statistically significant ($P < 0. 001$). There was no statistically significant difference in the minimum inhibitory concentration (MIC) of two bacterial strains against various drugs (both $P > 0. 05$). Conclusion The Rv0037c protein is a special member of the *Mycobacterium* MFS family proteins and has a very conserved structure. Overexpression of Rv0037c has no effect on the growth, colony

[收稿日期] 2024 - 03 - 29
[基金项目] 中央引导地方科技发展资金项目(2023 年度)(YDZJSX20231A005)
[作者简介] 荆雪娇(1990 -), 女(汉族), 山西省天镇县人, 博士研究生在读, 主要从事结核病的检测与防治研究。
[通信作者] 吴长新 E-mail: cxw20@sxu. edu. cn

morphology, sliding ability, biofilm formation, and MIC of *Mycobacterium smegmatis*, but can significantly reduce the accumulation of EB.

[Key words] Rv0037c protein; bioinformatics; biological function; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium smegmatis*; drug resistance

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是导致结核病的元凶。目前, 人类之所以仍未终结结核病, 是因为 MTB 产生了药物耐受。大多数细菌可通过噬菌体、质粒或转座子元件介导的水平基因转移获得药物抗性^[1], 但目前尚无 MTB 耐药基因水平转移的报道。MTB 药物抗性的获得是在抗菌药物压力下染色体发生突变, 并随着耐药性突变的累积, 从单一药物耐药性向多药耐药性 (multidrug resistance, MDR)、广耐药性 (extensive drug resistance, XDR) 进化, 最终变为完全耐药 (total drug resistance, TDR)^[2]。由于现有的抗 MTB 药物仍无法有效控制 XDR 和 TDR, 急需新的治疗方法来应对耐药结核病的流行。

然而, 对 MTB 耐药性的产生机制尚不完全清楚, 目前研究主要关注以下各种机制: (1) MTB 与耐药有关的关键酶或转录因子的突变; (2) MTB 通过修饰或模拟药物的靶标抵抗药物; (3) MTB 过度表达外排泵系统; (4) MTB 细胞壁通透性的改变; (5) MTB 高表达调节细胞内、外环境的适应性双分組系统^[3]。药物外排机制被认为是导致 MTB 耐药的一个主要因素, 研究外排泵系统对结核病的防治具有重要意义。

MTB 细胞膜上存在丰富的外排泵系统, 分为 ATP 结合盒超家族 (ATP-binding cassette transporter superfamily, ABC)、易化子超家族 (major facilitator superfamily, MFS)、小耐多药性家族 (small multidrug resistance, SMR)、小耐药结节化细胞分化家族 (resistance nodulation division, RND)、多耐药和毒性化合物家族 (multidrug and toxic compound extrusion, MATE)^[4]。MFS 是一类利用胞内、外离子梯度作为能源运输底物的超级家族蛋白, 与耐药菌株的形成密切相关。通过氨基酸序列比对, 发现 MTB 中共有 31 个 MFS 超家族蛋白。然而, 目前只有少数几种得到了一定程度的研究, 比如 Tap^[5]、Tet (V)^[6]、EfpA^[7]、P55^[8]、LfrA^[9] 和 Rv1634^[10], 对其他 MFS 蛋白的研究尚属空白。

Rv0037c 蛋白是 MFS 超家族蛋白成员之一, 在 MTB 基因组中注释为多药外排泵, 但外排底物和具

体生物学功能均未有试验研究。因此, 本文以 Rv0037c 为目的基因, 对其结构和功能特征进行探讨。试图在对其进行生物信息学分析的基础上, 在耻垢分枝杆菌中构建 PMV261-Rv0037c 过表达菌株, 进而研究和揭示 Rv0037c 蛋白的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒及培养基 耻垢分枝杆菌标准株 (*M. smegmatis* mc² 155, Msm) 购自中国微生物菌种保藏中心。大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞和质粒 pMV261 由本实验室 (山西大学生物医学研究院 302 室) 提供。耻垢分枝杆菌培养所用的培养基为 7H9 液体培养基 (添加 ADC, 含 1% 甘油和 0.05% Tween 80) 和 7H10 固体培养基 (添加 OADC, 含 0.05% Tween 80)。

1.1.2 主要仪器和试剂 聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (ABI), 凝胶成像分析仪 (Gene), BIO-RAD 电泳仪 (Bio-Rad), 752 紫外可见分光光度计 (上海菁华科技有限公司), 荧光定量 PCR 仪 (Roche), ECM 399 电转仪 (BTX)。限制性内切酶 Hind III、Bam HI、T4 DNA 连接酶 (Takara), PrimerSTAR Max DNA Polymerase、Trizol 试剂、PrimeScript RT Master Mix 反转录试剂盒 (全式金生物技术有限公司), 2 $\times$ Realtime PCR super SYBR green mix、M5 HiClear DL5000 DNA marker (北京聚合美生物科技有限公司), 卡那霉素 (kanamycin)、潮霉素 B (hygromycin B, 上海生工生物工程股份有限公司)、链霉素 (streptomycin)、氯霉素 (chloramphenicol)、吡嗪酰胺 (pyrazinamide)、对氨基水杨酸钠 (sodium amimosalicylate, 中国药品生物制品检定所)、异烟肼 (isoniazid, Sigma)、利福平 (rifampin, Sigma)、冰醋酸、异丙醇、无水乙醇、吐温 80、甘油 (北京化工厂)。

1.2 方法

1.2.1 Rv0037c 蛋白的生物信息学分析 首先利用 Mycobrowser (<http://mycobrowser.epfl.cn/>) 获得 Rv0037c 的蛋白序列, 并对其进行初步鉴定。在此基础上, 通过 KEGG 数据库, 获取分枝杆菌属

和非分枝杆菌属中 Rv0037c 的同源基因,并使用 DNAMAN 软件进行多序列比对。然后利用 TM-HMM 服务器 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和 Swiss-model (<https://swiss-model.expasy.org/>)对 Rv0037c 的跨膜区和空间结构进行预测和分析。

1.2.2 过表达菌株的构建及鉴定 首先以 MTB 弱毒株(*M. tuberculosis* H37Ra, H37Ra)全基因组 DNA 为模板,利用 Rv0037c-F 和 Rv0037c-R 对目的基因 Rv0037c 进行扩增。然后用限制性内切酶 Bam HI 和 Hind III 酶切扩增产物和 pMV261 质粒,并将其与 pMV261 线性质粒相连,构建 pMV261-Rv0037c 重组质粒。在此基础上,利用电转化法,在 2.5 kv、700 Ω、50 μF 条件下,经 7H10 平板(卡那霉素 50 μg/mL)筛选,获得 pMV261/Msm 对照菌株及 pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株。

将得到的菌株在 37℃ 恒温培养箱中培养至 OD_{600} 为 0.8。在 4℃ 和 6 500 r/min 条件下,离心 10 min 收集细菌。将收集的菌体于液氮中冷冻 2 min,室温 3 min,反复冻融 3 次,加入 1 mL Trizol,旋涡混匀后,提取总 RNA,并用琼脂糖凝胶电泳法测定其纯度和含量。然后将 RNA 反转录获得 cDNA,并以此为模板,以 Rv0037c-qPCR-F 和 Rv0037c-qPCR-R 为引物,见表 1,以 SigA 基因为内参,进行逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR),以检测 Rv0037c 基因 mRNA 表达量的变化。

表 1 试验用寡核苷酸引物

Table 1 Oligonucleotide primers in the testing

引物	核苷酸序列(5'-3')
Rv0037c-F	GATTACAAGGATGA VGACGATAAG CACGGGGTGGACCGAACCTTGCCT
Rv0037c-R	AAGCTTCAGTTCGTCGGGAAAG- GCATGTTTGTACC
Rv0037c-qPCR-F	GTGCGGGTTGCGAGTCA GTTC
Rv0037c-qPCR-R	AGCAGCGAATAGGGCAGAAACAG
SigA-qPCR-F	TGCCGATCTGCTTGAGGTAGG
SigA-qPCR-R	TTCGTGTGGGACGAGGAAGAG

1.2.3 生长曲线测定 分别挑取平板上活化后的 pMV261/Msm 对照株和 pMV261-Rv0037c/Msm 过表达株,于液体培养基中培养至对数生长期,再传代一次,得到性能稳定的供试菌株。调整两种菌株的浓度至一致(根据 OD_{600} 值判断),制成种子液。

以 1% 的接种比率,接种于 100 mL 7H9 液体培养基中,37℃,180 r/min 振荡 10 h,以 2 h 为间隔测定 OD_{600} 。每个样本测试 3 次,对试验结果进行统计整理,并绘制生长曲线。

1.2.4 菌落形态和滑移能力观测 将浓度一致的对照菌株 pMV261/Msm 和过表达菌株 pMV261-Rv0037c/Msm 种子液,接种至 10 mL 7H9 培养基中,37℃,180 r/min,培养至 OD_{600} 等于 0.8。倍比稀释至 10^5 ,取 100 μL 涂布于 7H10 固体平板上,37℃ 恒温培养 5 d,观察菌落形态并拍照。

同时挑取上述单克隆菌落,置于含有 3% 琼脂糖的 7H9(不含 1% 甘油和 0.05% Tween 80)固体平板上,37℃ 恒温培养 6 d,观测菌落的滑移能力。

1.2.5 生物膜的形成及结晶紫(CV)染色 将浓度一致的对照菌株 pMV261/Msm 及过表达菌株 pMV261-Rv0037c/Msm 种子液,按 1% 接种比率,接种至含有 2 mL/孔 7H9 培养液的细胞培养基中,37℃ 恒温静置培养 3 d,观测生物膜的形成情况并记录。随之将成熟的生物膜上清液仔细地吸除,然后添加 0.1% 晶体紫染液(含有 10% 甲醛),室温染色 5 min,弃染色液,用蒸馏水反复轻轻冲洗至不再有紫色液流出,干燥后拍照记录,并用酶标仪测定其荧光值。测试重复 3 次。

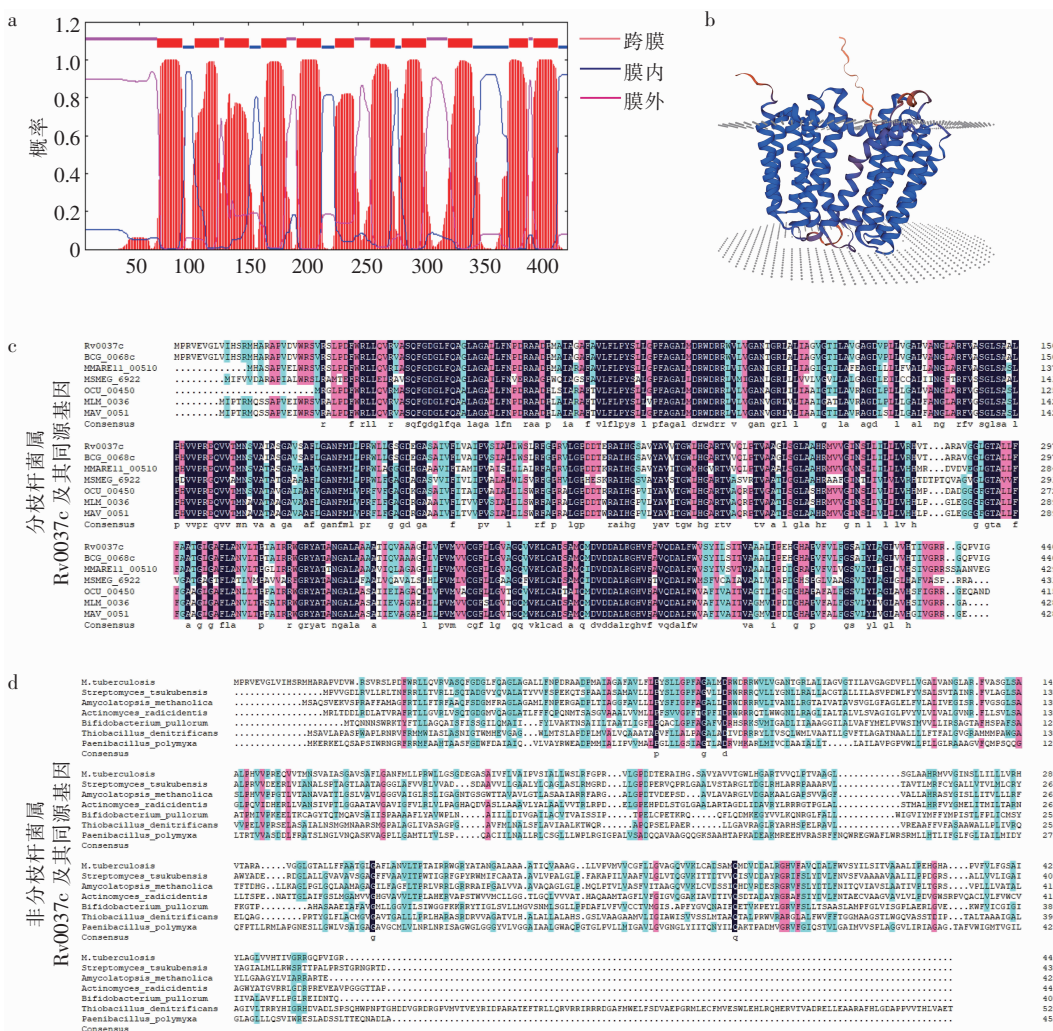
1.2.6 溴化乙锭(EB)累积能力测试 参考已报道方法^[11]进行 EB 累积试验。首先将两种菌种培养至对数生长期,并通过分光光度计检测,将菌液浓度调节到一致,即 OD_{600} 等于 0.8。在 4℃ 条件下,以 6 500 r/min 离心 10 min 收集菌体,并使用 1× PBS(含有 0.05% Tween 80)洗涤菌体 3 遍。按 200 μL/孔将菌液分装至 96 孔黑色酶标板中,并迅速加入 EB(终浓度为 1 μg/mL),用酶标仪测定其荧光强度(激发发射波长分别为 545、590 nm)。每 5 min 测定一次,共测 12 次(即 60 min)。测试重复 3 次。

1.2.7 最低抑菌浓度(MIC)测定 将对照菌株或过表达菌株的种子液 100 μL 移至 10 mL 7H9 中混匀。随后在 48 孔细胞培养板的第一行各孔中分别加入 1 mL 菌液,其余各行每孔加入 0.5 mL 菌液。在第一行各孔中分别加入抗结核药物:异烟肼(64 μg/mL)、利福平(16 μg/mL)、链霉素(128 μg/mL)、吡嗪酰胺(512 μg/mL)、对氨基水杨酸钠(512 μg/mL)、氯霉素(256 μg/mL),混匀后依次吸 0.5 mL 混合液置入下一行(第二行)各孔,再从第二行各孔吸 0.5 mL 混合液依次置入第三行各孔,依次类推,直至第八行为止,使各列药物浓度等倍稀释。用塑料薄膜封好,

1.3 统计学方法 应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差描述,采用 t 检验进行比较, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.1 Rv0037c 蛋白的特殊性和保守性 在通过对 Mycobrowser 数据库检索得到 MTB Rv0037c 蛋白的氨基酸序列之后,分别采用 TMHMM Server v. 2.0 和 Swiss-model 在线工具对 Rv0037c 蛋白的跨

膜结构域进行分析和三维结构预测。结果显示, Rv0037c 蛋白有 11 个跨膜结构域(TMDs, 见图 1a), 并具有 MFS 超家族蛋白共有的核心褶皱(MFS 褶皱, 见图 1b), 且 C/N 域由“3+2”TMDs 组成, 表明该蛋白是 MFS 家族的特殊成员, 可能具有某种特殊的功能。与此同时, 利用 KEGG 数据库检索分枝杆菌属和非分枝杆菌属 Rv0037c 的同源蛋白, 并用 DNAMAN 软件进行多个序列比对。结果显示, Rv0037c 在分枝杆菌属中高度保守(见图 1c), 但在非分枝杆菌属中仅有几个保守的氨基酸位点(见图 1d)。Rv0037c 蛋白为分枝杆菌 MFS 家族蛋白的特殊成员且结构非常保守。

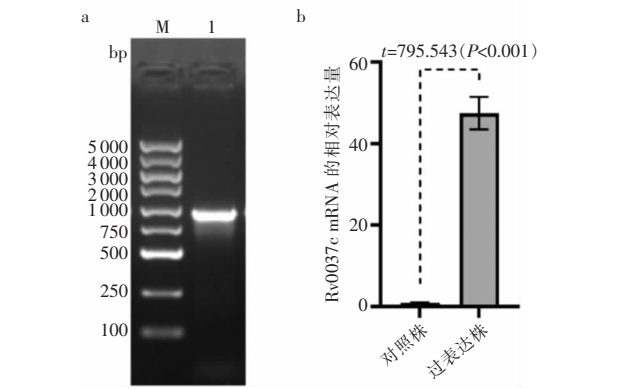


注:a 为 TMHMM Server v. 2.0 软件预测的 Rv0037c 蛋白的 11 个跨膜区;b 为 Swiss-model 软件预测的 Rv0037c 蛋白“MFS 褶皱”;c 为分枝杆菌属 Rv0037c 蛋白及其同源蛋白结构比较;d 为非分枝杆菌属 Rv0037c 同源蛋白结构比较。

图 1 MTB Rv0037c 蛋白的生物信息学分析

Figure 1 Bioinformatic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Rv0037c protein

2.2 耻垢分枝杆菌过表达菌株的成功构建 以 H37Ra 基因组 DNA 为模板,利用高保真 Primer-STAR DNA 聚合酶扩增 Rv0037c 基因,所得 PCR 产物与预期片段(1 034 bp)大小一致(见图 2a)。通过将 Rv0037c 基因测序结果与 H37Ra 基因组数据库进行 BLAST 比对分析,结果表明,克隆得到的 Rv0037c 基因与 H37Ra 基因组数据库中的基因序列一致,说明成功获得 Rv0037c 基因。进一步构建 pMV261-Rv0037c 质粒,并用 qRT-PCR 确定 Rv0037c 基因 mRNA 的表达量。结果显示, pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株中 Rv0037c 基因 mRNA 表达量是 pMV261/Msm 对照菌株的 48 倍,过表达菌株的表达量高于对照菌株,差异有统计学意义($P<0.001$),见图 2b)。pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株构建成功。



注:a 为从 MTB H37Ra 基因组中扩增的 Rv0037c 基因(1 034 bp);
b 为 qRT-PCR 验证 Rv0037c 蛋白在耻垢分枝杆菌中的过表达。

图 2 构建的 Rv0037c 过表达耻垢分枝杆菌株
Figure 2 Construction of overexpressed strain of Rv0037c in *Mycobacterium smegmatis*

2.3 Rv0037c 基因过表达对耻垢分枝杆菌生长的影响 测定 pMV261/Msm 对照株和 pMV261-Rv0037c/Msm 过表达株的生长曲线,结果显示,在 12 h 后,Msm 度过潜伏期进入对数生长期,在 22 h 达到最高值 OD_{600} 等于 1.8,之后进入平台期;过表达菌株 pMV261-Rv0037c/Msm 和对照菌株 pMV261/Msm 的生长动力学曲线几乎完全重合,过表达菌株与对照菌株的生长量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。过表达 Rv0037c 基因对细菌生长没有影响。

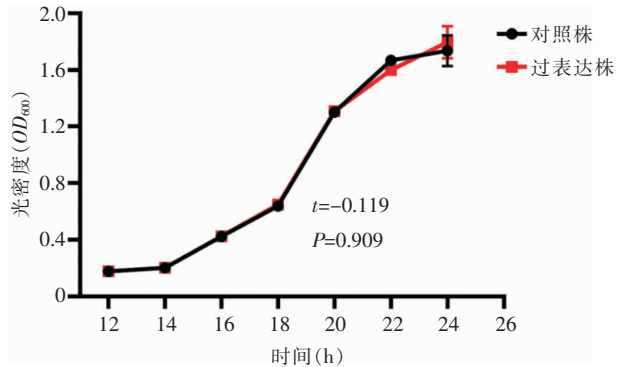
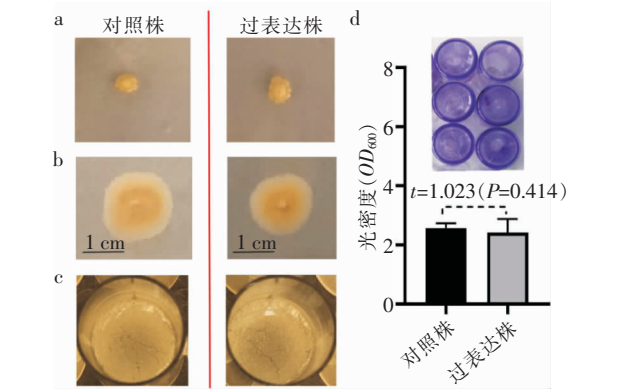


图 3 耻垢分枝杆菌对照株和 Rv0037c 过表达菌株的生长曲线
Figure 3 Growth curves of control strain of *Mycobacterium smegmatis* and Rv0037c overexpressed strain

2.4 Rv0037c 基因过表达对耻垢分枝杆菌表面特性的影响 检测 pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株和 pMV261/Msm 对照菌株的菌落形态和滑动能力,结果显示,在 7H10 培养基上培养 5 d 后,两株菌的菌落生长丰茂,呈乳脂白色,菌落上有褶皱,中央呈圆顶形、颗粒状(见图 4a),两种菌株的菌落形态基本一致;且两种菌株在固体培养基上培养 6 d 后,菌落的滑动长度均为 (1.6 ± 0.2) cm,表明过表达 Rv0037c 基因不会影响细菌的滑动能力(见图 4b)。

检测基因 Rv0037c 过表达对耻垢分枝杆菌生物膜的影响,结果显示,两株菌在 37℃ 恒温培养箱中静置培养 1 d 后,培养基表面逐渐出现絮状的生物膜;培养 3 d 后,生物膜全面形成,覆盖了培养基的整个表面,并伴随形成开裂似的纹路;继续培养 2 d,生物膜沉落到培养基底部。与对照菌株 pMV261/Msm 相比,过表达菌株 pMV261-Rv0037c/Msm 生物膜的形成时间、开裂纹路形状和厚度均没有差别(见图 4c)。将沉落的生物膜,通过 CV 染色进行定量分析,对照菌株 pMV261/Msm 的 OD_{600} 为 2.567 ± 0.162 ,过表达菌株 pMV261-Rv0037c/Msm 的 OD_{600} 为 2.419 ± 0.456 ,二者的生物膜生长量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)(见图 4d)。Rv0037c 基因过表达对耻垢分枝杆菌的生物膜没有影响。

2.5 Rv0037c 基因过表达对 EB 累积的影响 两种菌株均能迅速的转入 EB,仅在 5 min 内便有明显的吸收,在 15 min 时基本达到饱和。pMV261/Msm 对照菌株在达到饱和时的荧光值为 (107.25 ± 10.30) a. u.,



注:a 为 Msm 单菌落形态;b 为 Msm 在 7H9 琼脂糖凝胶培养基上的滑移;c 为 Msm 生物膜的形成;d 为 Msm 生物膜的 CV 染色定量检测结果。

图 4 耻垢分枝杆菌细胞膜相关表型的特性及其生物膜定量检测结果

Figure 4 Characteristics of cell membrane-related phenotypes and biofilm quantitative detection results of *Mycobacterium smegmatis*

pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株达到饱和时的荧光值为(89.75±9.46)a. u., 后者的荧光值较前者低。15~60 min, pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株的 EB 累积量均低于 pMV261/Msm 对照菌株。过表达菌株的 EB 累积量较对照菌株低, 差异有统计学意义($P<0.001$), 见图 5。

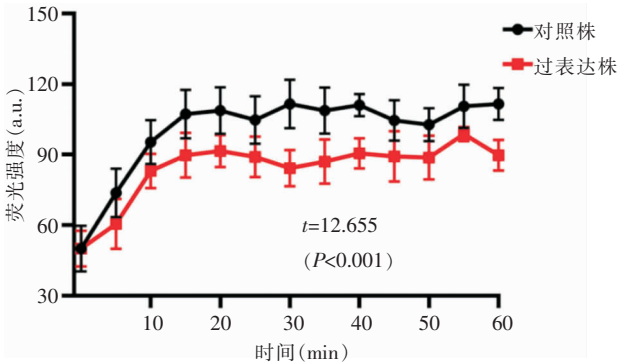


图 5 Rv0037c 基因过表达抑制耻垢分枝杆菌 EB 的累积结果

Figure 5 Results of overexpression of Rv0037c gene inhibits the accumulation of EB in *Mycobacterium smegmatis*

2.6 Rv0037c 基因过表达对耻垢分枝杆菌耐药性的影响 检测 Rv0037c 基因过表达菌株和对照株对 6 种药物的 MIC。两种菌株对异烟肼、链霉素、吡嗪酰胺、对氨基水杨酸钠、氯霉素的敏感性均较

低, 而对利福平的敏感性很高; 但是两种菌株对各种药物的 MIC 比较, 差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 2 2 种耻垢分枝杆菌对不同抗菌药物的 MIC 值($\mu\text{g/mL}$)
Table 2 MIC of different antimicrobial agents against two kinds of *Mycobacterium smegmatis* ($\mu\text{g/mL}$)

抗菌药物	对照菌株	过表达菌株
异烟肼	8	8
利福平	<0.06	<0.06
链霉素	8	8
吡嗪酰胺	256	256
对氨基水杨酸钠	256	256
氯霉素	32	32

3 讨论

本研究表明, Rv0037c 蛋白具有 MFS 超家族蛋白共有的核心褶皱, 说明其是 MFS 超家族蛋白的成员之一。但是其具有 11 个跨膜结构域(TMDs), 与 MFS 超家族转运蛋白典型的 12 或 14 个 TMDs 有所不同^[12], 这可能使 Rv0037c 蛋白得以转运某种特殊的底物。并且其 C/N 域是由“3+2”TMDs 组成, 而不是 MFS 超家族蛋白典型的“3+3”TMDs, 同时可能使 TMDs 螺旋束形成特别的空腔, 构成特别的转运底物通道。

在 MTB 中, 药物的靶标基因发生突变是其耐药的主要原因。然而, 亦有研究^[13]发现, 很多临床菌株并不具有已知靶标基因突变, 表明 MTB 的耐药性升高可能与传统的基因突变无关, 很可能存在一个新的耐药性机制, 即外排泵的高表达。且在多种临床菌株中观察到了多种外排泵在不同程度上被上调^[13-14]。

荧光光度法是用来评估 MTB 外排泵活性的经典方法。EB 作为一种易于检测的荧光染料, 常常被作为测试药物外排泵活性的通用型底物替代物。因此, 本研究检测了 pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株和 pMV261/Msm 对照菌株中 EB 累积的影响。从以上对照试验结果可以看出, 15~60 min, pMV261-Rv0037c/Msm 过表达菌株的 EB 累积量低于 pMV261/Msm 对照菌株。值得注意的是, EB 的累积是转入与排出这两个过程博弈的结果。与对照菌株相比, 过表达菌株的 EB 累积量较低即可归因于转入量过低, 又可归因于排出量过多。换言之,

Rv0037c 基因过表达引起 EB 累积量的减少,可能是由于其对 EB 的“转入受到抑制”或“外排泵高表达”而引起。这意味着,尽管在 MTB 基因组中 Rv0037c 蛋白被解释为多药耐药蛋白或多药外排泵,但其对药物的耐受机制很可能并不仅仅限于“外排泵高表达”,还涉及“药物转入受抑”等功能。

外排泵能够将多种底物(包括药物)从细胞质主动运输到细胞外环境,是 MTB 耐药性产生的重要原因之一。因此,本研究检测 Rv0037c 基因过表达菌株和对照株对 6 种药物的 MIC。外排泵蛋白在 MTB 接触抗菌药物后表达增加并不一定意味着这种抗菌药物就是外排泵蛋白的底物。因为外排泵基因的变异可能是 MTB 对抗抗菌药物下游作用的一种反应^[15]。外排泵蛋白表达水平的增加也可能是为了提高 MTB 在致命抗菌药物浓度下存活,从而增加耐药基因突变的机会,这种现象被称为“药物靶标耐药掩蔽”^[16]。事实上,已经有研究^[17]显示,低水平的外排泵介导了异烟肼的耐药,最后造成了 *katG* 基因的变异,导致更高的异烟肼抗药性。结合本研究发现的 Rv0037c 基因过表达可能导致“药物转入受抑”现象,表明外排泵蛋白的产生或高表达与耐药性的关系非常复杂。

借助基因敲除等手段研究外排泵的功能是比较常用的方法。然而,由于 MTB 基因组中存在冗余外排泵^[18],仅敲除目的基因不足以揭示其在菌株中的作用。由于在没有药物压力的情况下,外排泵大多在转录上沉默^[19]。因此,只有当外排泵在细菌中过度表达时,才能准确评估其对耐药性的贡献^[18]。这也从另一个侧面解释了为什么本研究要在耻垢分枝杆菌中构建 pMV261-Rv0037c 过表达菌株,进而对 Rv0037c 的生物功能进行研究。

同时值得注意的是,外排泵往往涉及多种细胞基本生理功能,如参与胆固醇、硝酸盐代谢,影响菌株的毒力和在宿主细胞中的存活,决定宿主细胞的凋亡等^[20]。Marger 等^[21]认为 MFS 家族外排蛋白具有以下 5 种生物学功能:(1)对药物的抗性;(2)糖的摄取;(3)三羧酸循环中间体的摄取;(4)磷酸配体的同向转运;(5)单糖摄取。因此,药物排出只是外排泵的功能之一,且不是所有的外排泵都有药物外排的功能。仅就目前已发现的 14 个具有多药外排功能的 MFS 型外排蛋白,即 Rv0037c、Rv1619、Rv2508c、Rv1902c、Rv0842、Rv1634、Rv2209、Rv2265、Rv1640c、Rv2456c、Rv0849、Rv1258c、Rv1410c 和 Rv0191 而言,笔者查阅文献发现,预测

多药外排功能与实际试验结果有时并不相符。加之,目前对 MTB 的 MFS 外排泵研究大多停留在软件预测层面,对其具体调控机制及生物学功能的研究仍然甚少。因此,很有必要对 MTB 外排泵蛋白(包括 Rv0037c 蛋白)的生物学功能进行更深入、具体的试验研究。

致谢:诚挚感谢熊秋宏教授在试验中提供的帮助。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Perdigão J, Portugal I. Genetics and roadblocks of drug resistant tuberculosis[J]. Infect Genet Evol, 2019, 72: 113–130.
- [2] Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, et al. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis[J]. Respirology, 2018, 23(12): 1098–1113.
- [3] 杨寿慧,刘惟优. 外排泵抑制剂作用于结核分枝杆菌 MFS 转运系统的研究现状[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(5): 520–522.
Yang SH, Liu WY. Research status of efflux pump inhibitors on the MFS transport system in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Gannan Medical University, 2018, 38(5): 520–522.
- [4] Laws M, Jin PQ, Rahman KM. Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance[J]. Trends Microbiol, 2022, 30(1): 57–68.
- [5] Cloete R, Kapp E, Joubert J, et al. Molecular modelling and simulation studies of the *Mycobacterium tuberculosis* multidrug efflux pump protein Rv1258c[J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0207605.
- [6] Balakrishnan K, Mohareer K, Banerjee S. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1474c is a TetR-like transcriptional repressor that regulates aconitase, an essential enzyme and RNA-binding protein, in an iron-responsive manner[J]. Tuberculosis (Edinb), 2017, 103: 71–82.
- [7] Doran JL, Pang Y, Mdluli KE, et al. *Mycobacterium tuberculosis* efpA encodes an efflux protein of the QacA transporter family[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(1): 23–32.
- [8] Viale MN, Colombatti Olivieri MA, Alonso N, et al. Effect of the deletion of *lprG* and *p55* genes in the K10 strain of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis[J]. Res Vet Sci, 2021, 138: 1–10.
- [9] Sander P, De Rossi E, Böddinghaus B, et al. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 193(1): 19–23.
- [10] Singh G, Akhter Y. Molecular insights into the differential ef-

flux mechanism of Rv1634 protein, a multidrug transporter of major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Proteins, 2022, 90(2): 566 – 578.

[11] Demitto FDO, do Amaral RCR, Maltempe FG, et al. *In vitro* activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. PLoS One, 2015, 10 (2): e0116545.

[12] 孙林峰, 王佳伟, 颜宁. MFS 超家族转运蛋白结构与分子机制的研究[J]. 生命科学, 2011, 23(11): 1052 – 1056.
Sun LF, Wang JW, Yan N. Molecular mechanisms of the major facilitator superfamily transporters[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(11): 1052 – 1056.

[13] Kardan Yamchi J, Haeili M, Gizaw Feyisa S, et al. Evaluation of efflux pump gene expression among drug susceptible and drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Iran [J]. Infect Genet Evol, 2015, 36: 23 – 26.

[14] Oh TS, Kim YJ, Kang HY, et al. RNA expression analysis of efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Korea[J]. Infect Genet Evol, 2017, 49: 111 – 115.

[15] Goossens SN, Sampson SL, Van Rie A. Mechanisms of drug-induced tolerance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 34(1): e00141 – 20.

[16] Dos Santos SC, Teixeira MC, Dias PJ, et al. MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: understanding their physiological function through post-genomic approaches[J]. Front Physiol, 2014, 5: 180.

[17] Machado D, Couto I, Perdigão J, et al. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34538.

[18] Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2415 – 2423.

[19] Balganesch M, Dinesh N, Sharma S, et al. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(5): 2643 – 2651.

[20] Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update[J]. Arch Toxicol, 2016, 90(7): 1585 – 1604.

[21] Marger MD, Saier MH Jr. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport [J]. Trends Biochem Sci, 1993, 18(1): 13 – 20.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:荆雪娇,宋莉,吴长新. 结核分枝杆菌蛋白 Rv0037c 的结构和功能特征[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(12): 1463 – 1470. DOI:10. 12138/j. issn. 1671 – 9638. 20246296.

Cite this article as: JING Xue-jiao, SONG Li, WU Chang-xin. Characteristics of structure and functions of Rv0037c protein of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chin J Infect Control, 2024, 23 (12): 1463 – 1470. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 – 9638. 20246296.