

细菌遗传元件水平转移与抗生素抗性研究进展*

蒋培余¹ 潘劲草²

(湖州师范学院医学院 湖州 313000)¹ (杭州市疾病预防控制中心 杭州 310006)²

摘要: 细菌可移动遗传元件包括噬菌体、质粒、转座子、插入序列、整合子、基因组岛 (genomic island and genomic islet) 等, 其中接合性质粒、转座子、整合子及基因组岛等是与抗生素抗性有关的元件, 可以在同种甚至于不同种菌株间水平转移, 加速了临床上耐药及多重耐药菌株的产生。综述了细菌与抗生素抗性有关的可移动遗传元件的种类、特征及转移机制的研究进展。

关键词: 细菌, 可移动遗传元件, 抗生素抗性

中图分类号: R951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0167-05

Progress in the Studies of Horizontal Transfer of Bacteria Genetic Elements Related to Antibiotic Resistance*

JIANG Pei-Yu¹ PAN Jin-Cao²

(Faculty of Medicine, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000)¹

(Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310006)²

Abstract: Bacteria mobile genetic elements consist of phage, plasmid, transposon, inserted sequences, integron, and genetic island, etc. Among them, conjugative plasmid, transposon, integron and genetic island etc are related to antibiotic resistance, and can be transferred between homogeneous and even heterogeneous bacteria, which promotes the progress of clinic drug resistance and multi-drug resistance. This paper reviews the progress in the studies of bacteria mobile genetic elements related to antibiotic resistance, including the category, characteristic, and transfer mechanism.

Key words: Bacteria, Mobile genetic elements, Antibiotic resistance

自 20 世纪 40 年代抗生素被发现并进入临床应用以来, 一直被作为治疗感染性疾病的主要武器。但随着抗生素的广泛使用, 临床上对抗生素抗性的微生物也随之产生。目前, 每种使用的抗生素在临床上都有其抗性细菌, 多重耐药菌株的检出也相当普遍^[1]。

细菌对抗生素的抗性有内在抗性 (intrinsic resistance) 和获得性抗性 (acquired resistance)。内在抗性是指细菌天然对某些抗生素不敏感。获得性抗性涉及细菌遗传背景的改变。细菌可通过随机突变, 或表达潜在抗性基因获得抗性; 也可通过抗性基因水平转移获得抗性。细菌可移动遗传元件 (mobile genetic elements, MGE) 可以在同种甚至不同种菌株间水平转移, 加速了临床上耐药及多重耐药菌株产生。本文综述了细菌与抗性有关可移动遗传元件的种类、特征及转移机制的研究进展。

* 湖州市自然科学基金资助项目 (No. 2004SZX0713)

通讯作者 Tel: 0572-2321203, E-mail: jpy2063683@163.com

收稿日期: 2005-10-10, 修回日期: 2005-11-30

1 细菌间抗性基因的转移机制

目前了解的细菌间遗传物质转移机制主要有：转化、转导、接合。接合为 DNA 通过细胞间直接的物理连接从供体菌转移到受体菌，为抗性转移的主要机制。在革兰阴性菌中，供体菌和受体菌间通过性菌毛结合，供体菌的接合性质粒在转移起始区（origin of transfer, *oriT*）一个特异性位点（*nic*）上产生一个缺口后，将 DNA 以单链形式，经性菌毛传递给受体菌，随后通过滚环复制，单链 DNA 合成为双链。转移系统（transfer system, *Tra*）是由二个蛋白复合体构成，即松弛小体（relaxosome）和交配形成复合体（mating-pair formation complex），二者通过联结蛋白（coupling protein）连接。松弛小体位于细胞浆，为位于转移起始区上的多蛋白和 DNA 复合体，来自染色体和质粒的蛋白均参与此复合体的形成。其中 DNA 松弛酶（relaxase）是启动接合转移的关键酶，位点特异性地催化 *oriT* 中 *nic* 位点上的磷酸二酯键的切割；交配形成复合体位于细胞膜上，连接细胞浆和外膜，其组分为性菌毛接合性连接形成所必须。交配形成复合体为 IV 型分泌系统（type 4 secretion system）的一个亚类，负责从供体菌向受体菌转移 DNA-蛋白复合体^[2,3]。IV 型分泌系统的功能是在细胞间转移大分子物质，在细菌接合、致病菌的蛋白分泌系统及自然转化系统中均有其参与^[4]。革兰阳性菌接合机制与革兰阴性菌有所不同，有待更详尽地阐明。有些接合性质粒有着宽泛的宿主范围，为抗性基因的广泛传播提供了良好的载体。哺乳动物的肠道温暖潮湿、营养丰富、细菌种类多、密度高并易于暴露于抗生素，为细菌间通过接合交换抗性基因的理想环境。

转导即通过噬菌体感染将 DNA 从供体菌转移到受体菌，转化是指受体菌摄取供体菌裂解后游离 DNA 的过程。但因为噬菌体具有较严格的宿主特异性，仅发现少数几种细菌有自然的转化能力，如链球菌、芽孢杆菌、奈瑟菌、嗜血杆菌；且通过转导或转化方式转移的 DNA 均需通过特异性位点重组、同源重组或转座到受体菌的复制子内，才能稳定地遗传，因此转导和转化在传递抗性方面意义不大^[5]。

2 细菌编码抗性的可移动遗传元件

Hacker^[6]将原核生物的基因组大致分为核心基因库和易变基因库（core and flexible gene pools）。核心基因库的基因位于细菌染色体上，有着非常相近的 G + C 含量和密码子使用偏好，大部分为编码负责细胞基本功能的蛋白；而易变基因库的 DNA 元件通常具有移动元件的特征，如不同的 G + C 含量和密码子使用偏好，常含移动基因，编码对细菌生长非必须但可以增强其适应环境和宿主能力的一些功能蛋白。细菌可移动遗传元件包括噬菌体、质粒、转座子、插入序列、整合子、基因组岛（genomic island and genomic islet）等，与抗性有关的元件有接合性质粒、转座子、整合子及基因组岛等。

2.1 接合性质粒 质粒为细菌中能自我复制的染色体外 DNA 遗传元件。根据其是否具有在细菌间通过接合自我转移的能力，分为接合性质粒和非接合性质粒。接合性质粒一般较大（>40 kb），拷贝数低（1~数个/细胞）；非接合性质粒一般较小（<7.5 kb），拷贝数高（10~20/细胞）。一些质粒不能通过接合自我转移，但在接合性质粒存在时，可被转移，称为可移动质粒（mobilizable plasmid）^[7]，可移动质粒也可携带抗性基因并在菌株间传播。编码抗生素抗性的质粒，称为 R 质粒。接合性 R 质粒在环境和临床的细菌中分布广泛，是抗性基因的主要传播途径^[3]。接合性 R 质粒有 3 个功能区，

分别负责转移、复制和抗性。抗性基因可以有 1 个或多个, 常常作为转座子或整合子的组成部分位于 R 质粒上^[8,9]。近来对多个接合性质粒的基因组序列比较分析表明, 接合性质粒核苷酸序列结构上常呈“马赛克”样, 由来源于其他共生或致病细菌的基因或遗传元件以模块式组合^[10,11]。

2.2 转座子 转座子 (transposon, Tn) 即跳跃基因 (jumping genes), 是一类在细菌的染色体、质粒或噬菌体之间自行移动的一段特异的 DNA 序列, 不能独立复制。转座子中含编码转座酶 (transposase) 的基因 (*tnp*), 两端通常由反向重复序列组成, 在两侧的靶序列常为 5 ~ 13bp 的直接重复序列。转座酶特异地识别转座子两端的反向重复序列, 介导转座子与插入位点间的位点特异性重组 (site-specific recombination), 在重组位点间无需序列同源。转座子可随机插入或定点插入。转座机制分为复制性转座和非复制性转座^[12]。

细菌中的转座子分为 4 类: 插入序列 (insertion sequence) 和复合型转座子 (composite transposon)、Tn3 样转座子、转座性噬菌体、接合性转座子 (conjugative transposon)^[13]。除插入序列仅含编码转座所需的基因外, 转座子可携带编码额外功能的基因, 如抗生素抗性、重金属抗性、毒素产生及代谢等基因, 其中以携带抗生素抗性基因最为常见。如 Tn3 携带 TEM1 β 内酰胺酶基因, 编码对氨苄青霉素的抗性; Tn10 携带四环素主动外排泵 (efflux pumps) 基因, 编码对四环素的抗性。抗性基因的非接合性转座子可以在染色体和质粒间、或质粒间转座, 并通过接合性质粒促进抗性基因在细菌间传播。

接合性转座子主要发现于革兰阳性菌中, 可能是该类细菌抗性基因水平传播的主要载体。如 Tn916 编码四环素抗性基因, 与其他转座子不同, 接合性转座子较大, 由负责接合、抗性、整合、切除和调控等功能模块组成, 可以从染色体上切除下来形成环状分子, 并以类似于质粒的接合方式将自身单链 DNA 从供体菌向受体菌传递。受体菌中的单链分子环化并形成双链分子, 整合于受体菌的复制子中。其重组机制也与其他转座子不同, 因为在其两侧没有发现靶序列的直接重复序列^[13]。后来在许多细菌中发现有类似于噬菌体地整合和切除、类似于质粒接合转移的多种 DNA 元件, 如霍乱弧菌中的 SXT 元件等^[14], 它们各有一些不同的特征, 如细菌间接合通过菌毛或细胞集聚、DNA 是单链或双链转移、整合位点特异性的高低、丝氨酸或酪氨酸重组酶等, 因此将这些元件均称为整合和接合性元件 (integrative and conjugative elements, ICE)^[15]。

2.3 整合子 整合子为发现于革兰阴性菌中的一种基因捕获和表达的遗传单位, 由整合酶 (integrase) 基因 (*intI*)、整合酶特异性重组位点 *attI* 和数目不定的基因盒 (gene cassette) 组成。整合酶是酪氨酸家族成员, 是一种特异性位点重组酶。*attI* 是整合酶特异性的整合位点, 相当于整合时接受基因盒受体。基因盒通常由一个编码抗生素抗性的开放读码框 (ORF) 和一个整合位点 *attC* 组成。开放读码框的表达一般是由位于 *attI* 上游的启动子驱动的, 但也有少数基因盒本身携带有启动子; 目前已鉴定的位于整合子内的抗性基因已超过 70 多种^[16]。将多个抗性基因盒整合入整合子平台, 形成携带有多个串联排列基因盒的整合子称为多重抗性整合子 (multiresistant integron, MRI)。根据 *intI* 序列不同, 至今公认的整合子有 4 类。I 类和 II 类整合子主要位于转座子中, 发现与 I 类整合子最为相关的是 Tn21 家族, 其分布极为广泛, 常见的基因盒编码的有多种氨基糖苷腺苷转移酶、氨基糖苷乙酰基转移酶、二氢叶酸还原酶、 β 内酰胺酶 (包

括部分超广谱 β 内酰胺酶) 等。II 类整合子常与 Tn7 有关, 通常携带 3 个基因盒, 其抗性基因为 *dfrA1*、*sat1* 和 *aadA1*, 分别编码对甲氧苄氨嘧啶 (TMP)、链丝菌素 (streptothricin) 和链霉素的抗性^[17]。III 类整合子仅在少数肠杆菌科细菌中检出。IV 类整合子主要发现于弧菌科细菌中, 大部分基因盒功能未明^[18]。

2.4 基因组岛 在致病菌基因组中已发现了与细菌毒力有关的大片段 DNA, 其 G + C 含量、密码子使用等与基因组骨架序列 (backbone) 有明显的差异, 可能是细菌通过基因水平转移获得的, 称为毒力岛 (pathogenicity island, PAI)。比较基因组研究揭示了在致病性和非致病性细菌基因组中均存在着大量的类似序列, 统称为基因组岛 (genomic island, GEI), 其编码的功能并不局限于细菌的致病性, 还包括有生态适应、代谢、抗性等有利于细菌生存的多种功能。基因组岛通常长为约 10 ~ 100 kb 间, 常插入于基因组中的 tRNA 基因位点, 两侧有直接重复序列; 岛内常含有来自于噬菌体或质粒的一些基因, 如整合酶、转移基因或 IS 等。基因组岛具有不稳定性, 两侧的直接重复序列与噬菌体的附着位点序列同源, 基因组岛可以通过此位点整合于基因组中或从中切除^[6]。基因组岛可能是从可移动元件 (如质粒或噬菌体等) 进化而来。外源的可移动元件整合于细菌基因组后, 通过基因重排、获得、或缺失等过程, 从而形成基因组岛^[19]。

携带多重抗性的基因组岛已在一些肠道细菌和革兰阳性菌中发现。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 是感染性疾病临床治疗面临的难题之一。葡萄球菌染色体盒 *mec* (staphylococcal chromosome cassette *mec*, *SCCmec*) 元件是一种位点特异性整合元件, 其中的 *mecA* 基因编码与 β 内酰胺酶低亲和力的青霉素结合蛋白 (PBP) 2' 或 2a, 使得菌株产生对甲氧西林的抗性^[20]。医院获得性和社区获得性 MRSA 均是通过甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA) 获得 *SCCmec* 元件进化而来。在社区获得性 MSSA476 株上, 也发现了 *SCCmec* 样元件, 但携带的是褐霉素抗性基因而不是 *mecA* 基因^[21]。在共生的表皮葡萄球菌 ATCC12228 株中, 也发现有不含 *mecA* 的 SCC 元件复合岛, 携带有重金属抗性基因^[22]。这些 SCC 元件家族均含有同源的位点特异性重组酶基因 (*ccrAB*), 两端有特征性的直接反向重复序列。尽管至今并不了解 SCC 元件是怎样水平转移的, 但上述结果揭示了 SCC 元件家族可能在葡萄球菌属中扮演一个基因载体的作用, 携带的不同基因有助于不同葡萄球菌对各自生境的适应。另外在志贺菌和沙门菌中也发现携带抗性基因的基因组岛^[23,24]。

3 小结

对细菌遗传元件水平传播的研究揭示了其遗传物质的流动性 (genetic fluidity)。遗传元件水平移动机制是细菌长期进化的结果, 早于抗生素时代就已存在, 是细菌对抗生素时代适应的主要机制之一。近来细菌比较基因组学研究及基因芯片技术的应用将使人们对其有更进一步的认识, 从而可能为控制临床耐药菌的产生提供新思路。

参考文献

- [1] Avorn J L B J, Davey P G. WHO, 2001.
- [2] Cao T B, Saier M H Jr. Microbiology, 2001, 147: 3201 ~ 3214.
- [3] Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67: 277 ~ 301.
- [4] Christie P J. Mol Microbiol, 2001, 40: 294 ~ 305.

- [5] Roy P. *Microbiology Today*, 26: 168 ~ 170.
- [6] Hacker J, Carniel E. *EMBO Rep*, 2001, 2: 376 ~ 381.
- [7] Francia M V, Varsaki A, Garcillan - Barcia M P, *et al.* *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28: 79 ~ 100.
- [8] Levy J, Verhaegen G, De Mol P, *et al.* *J Infect Dis*, 1993, 168: 177 ~ 187.
- [9] Preston K E, Radomski C C, Venezia R A. *Plasmid*, 1999, 42: 104 ~ 114.
- [10] Batchelor R A, Pearson B M, Friis L M, *et al.* *Microbiology*, 2004, 150: 3507 ~ 3517.
- [11] Sherburne C K, Lawley T D, Gilmour M W, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 2177 ~ 2186.
- [12] Lewin B. *Gene* Oxford University Press, 1999.
- [13] Scott J R, Churchward G G. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49: 367 ~ 397.
- [14] Boltner D, Osborn A M. *Plasmid*, 2004, 51: 12 ~ 23.
- [15] Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, *et al.* *Mol Microbiol*, 2002, 46: 601 ~ 610.
- [16] Rowe - Magnus D A, Mazel D. *Int J Med Microbiol*, 2002, 292: 115 ~ 125.
- [17] Hansson K, Sundstrom L, Pelletier A, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, 184: 1712 ~ 1721.
- [18] Heidelberg J F, Eisen J A, Nelson W C, *et al.* *Nature*, 2000, 406: 477 ~ 483.
- [19] Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, *et al.* *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 414 ~ 424.
- [20] Ito T, Katayama Y, Asada K, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 1323 ~ 1336.
- [21] Holden M T, Feil E J, Lindsay J A, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 9786 ~ 9791.
- [22] Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy T V, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 1823 ~ 1836.
- [23] Boyd D, Peters G A, Cloeckert A, *et al.* *J Bacteriol*, 2001, 183: 5725 ~ 5732.
- [24] Luck S N, Turner S A, Rajakumar K, *et al.* *Infect Immun*, 2001, 69: 6012 ~ 6021.