

专题研究

# 油酸碳源条件下 *Rv1372c* 缺失介导结核分枝杆菌对德拉马尼的非经典耐药机制

文毅龙<sup>1,2,3</sup>, 刘叶龙<sup>1,2,3</sup>, 王声全<sup>1,2,3</sup>, 刘梅<sup>1,2,3</sup>, 兰远波<sup>1,2,3</sup>

(1. 遵义医科大学附属医院 呼吸与危重症医学科, 贵州 遵义 563000; 2. 贵州省常见慢性疾病发病机制及防治全省重点实验室, 贵州 遵义 563000; 3. 贵州省结核病综合防治 2011 协同创新中心, 贵州 遵义 563000)

**[摘要]** **目的** 针对部分德拉马尼(DLM)耐药结核分枝杆菌临床分离株未检测到经典耐药相关基因突变的现象,基于全基因组测序(WGS)筛选潜在非经典耐药相关基因 *Rv1372c*,并探讨其对结核分枝杆菌(MTB)德拉马尼敏感性的调控作用及可能机制。**方法** 收集 2022—2024 年肺结核患者 MTB 临床分离菌,通过药物敏感性检测(PDST)结合 WGS 分析,筛选潜在耐药相关候选基因 *Rv1372c*。采用 pJV53 介导的同源重组系统构建 *Rv1372c* 基因敲除株及回补株,在常规碳源及以油酸为唯一碳源条件下比较不同菌株的体外生长特性。通过微量稀释刃天青法测定 DLM 对 *Rv1372c* 突变菌株的最低抑菌浓度,并结合扫描电镜观察菌体形态变化。进一步联合转录组学、脂质组学及蛋白组学分析,系统评估 *Rv1372c* 缺失对代谢通路、细胞包膜结构及药物敏感性的影响。**结果** 本研究纳入 341 株 MTB 临床分离菌,其中 37 株表现为 DLM 耐药。WGS 分析显示,在 3 株 DLM 耐药菌株中检测到 *Rv1372c* 突变,且均未发现 *ddn*、*fgd1* 及 *fbiA-C* 等已知 DLM 耐药相关基因突变。通过 pJV53 介导的同源重组法成功构建 H37Rv  $\Delta Rv1372c$  敲除株及回补株。扫描电镜显示敲除株菌体表面更为光滑,分泌物减少。生长动力学分析表明,敲除株在液体培养条件下代时缩短,而在固体培养基上无明显差异。药物敏感性试验显示,在油酸作为唯一碳源条件下,敲除株对 DLM 的最小抑菌浓度明显升高,而在 OADC 培养条件下未观察到统计学差异。转录组学、脂质组学及蛋白组学联合分析表明,*Rv1372c* 缺失未导致经典 DLM 耐药相关基因表达水平改变,但可诱导以 ABC 转运体家族为主的外排泵相关基因上调,并影响脂质代谢、细胞包膜相关通路及氧化还原过程。**结论** *Rv1372c* 缺失可在油酸依赖条件下导致结核分枝杆菌对 DLM 的耐药表型,其作用机制可能与外排泵激活、脂质代谢重塑及细胞包膜结构改变有关。本研究为阐明缺乏经典耐药突变的 DLM 耐药临床分离株的耐药机制提供了新线索。

**[关键词]** 结核分枝杆菌; *Rv1372c*; 德拉马尼; 非经典耐药; 外排泵; 脂质代谢

**[中图分类号]** R378.91<sup>+</sup>1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-8159(2026)07-0741-11

## Noncanonical mechanism of delamanid resistance mediated by *Rv1372c* deletion in *Mycobacterium tuberculosis* under oleate conditions

Wen Yilong<sup>1,2,3</sup>, Liu Yelong<sup>1,2,3</sup>, Wang Shengquan<sup>1,2,3</sup>, Liu Mei<sup>1,2,3</sup>, Lan Yuanbo<sup>1,2,3</sup>

(1. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563000, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pathogenesis and Prevention for Common Chronic Diseases, Zunyi Guizhou 563000, China; 3. Guizhou Provincial 2011 Collaborative Innovation Center for Comprehensive Tuberculosis Prevention and Treatment, Zunyi Guizhou 563000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulatory role of the non-canonical candidate gene *Rv1372c* in delamanid (DLM) susceptibility and its underlying mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), based on whole-genome sequencing (WGS) analysis of clinical DLM-resistant isolates lacking known resistance-associated mutations. **Methods** Clinical MTB isolates were collected from pulmonary tuberculosis patients between 2022 and 2024. Phenotypic drug susceptibility testing (PDST) and WGS were performed to identify mutations associated with *Rv1372c*. A *Rv1372c* knockout strain and its complemented strain were constructed using the pJV53-mediated homologous re-

**[基金项目]** 贵州省科技创新平台项目[NO:黔科合平台 CXPTXM(2025)017]; 贵州省科技计划项目[NO:黔科合基础-ZK(2023)重点 060]; 贵州省卫生健康委临床重点专科—攀峰计划建设项目(NO:GZJWPF2025010)。

**[通信作者]** 兰远波,男,博士,主任医师,博士生导师,研究方向:结核病的基础与临床研究,E-mail:Lybivy@163.com。

combination system. Growth characteristics were compared under both standard culture conditions and media containing oleic acid as the sole carbon source. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of DLM were determined using the microplate alamar Blue assay. Morphological alterations were examined by scanning electron microscopy (SEM). Furthermore, transcriptomic, lipidomic, and proteomic analyses were integrated to systematically evaluate the effects of *Rv1372c* deletion on metabolic pathways, cell envelope structure, and drug susceptibility.

**Results** A total of 341 clinical MTB isolates were included, among which 37 exhibited phenotypic resistance to DLM. WGS analysis identified *Rv1372c* mutations in three DLM-resistant isolates, none of which carried mutations in the known DLM resistance-associated genes *ddn*, *fgd1*, *fbiA*, *fbiB*, or *fbiC*. The H37Rv  $\Delta Rv1372c$  knockout strain and complemented strain were successfully generated using the pJV53 recombineering system. SEM revealed a smoother cell surface and reduced extracellular secretions in the knockout strain. Growth kinetic analysis demonstrated a shortened generation time of the knockout strain in liquid culture, whereas no significant difference was observed on solid medium. Drug susceptibility testing showed that deletion of *Rv1372c* significantly increased the MIC of DLM under oleic acid-dependent growth conditions, while no obvious change was observed in OADC-supplemented medium. Integrated transcriptomic, lipidomic, and proteomic analyses indicated that *Rv1372c* deletion did not alter the expression of classical DLM resistance-associated genes. However, it induced the upregulation of efflux pump-related genes, particularly those belonging to the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, and affected pathways associated with lipid metabolism, cell envelope remodeling, and redox processes. **Conclusion** Deletion of *Rv1372c* confers a non-canonical DLM tolerance phenotype in *Mycobacterium tuberculosis* under oleic acid-dependent conditions. This phenotype may be associated with efflux pump activation, lipid metabolic remodeling, and alterations in cell envelope structure. These findings provide a potential mechanistic explanation for DLM-resistant clinical isolates lacking known resistance-associated mutations and expand the current understanding of non-canonical mechanisms contributing to reduced DLM susceptibility.

[**Key words**] *Mycobacterium tuberculosis*; *Rv1372c*; delamanid; non-canonical resistance; efflux pumps; lipid metabolism

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 是结核病 (tuberculosis, TB) 的主要致病原, 其细胞包膜富含特有的脂质成分, 这些高度特化的脂质层赋予了该病原体强大的生存、感染与免疫调节能力, 使其成为一类高度成功的人类病原体<sup>[1-2]</sup>。世界卫生组织 (world health organization, WHO) 发布的《2025 年全球结核病报告》数据显示 2024 年全球估计新发 TB 病例 1 070 万例, 导致约 123 万人死亡, 其中约有 39 万例耐多药结核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) 新发病例, 并造成约 15 万例病患死亡, 占比全球结核死因 12%<sup>[3]</sup>。尽管全球在结核病诊断和治疗策略上取得了一定成效, MDR-TB 仍由于其治疗难度大、药物选择有限和较差的临床结局而成为全球结核病控制的核心难题, 并持续构成严重的公共卫生威胁<sup>[4]</sup>。

德拉马尼 (delamanid, DLM) 是近年来成功研发并获批用于 MDR-TB 治疗的新型抗结核药物, 属于二环-4-硝基咪唑类衍生物<sup>[5]</sup>。作为一种前体药物, DLM 在分枝杆菌内需由 F420-依赖性脱氮酶 (deazaflavin-dependent nitroreductase, Ddn) 介导的

生物活化, 生成包括活性氮自由基和其他活性中间体, 这些活性产物能够抑制脂肪酸和细胞壁分枝菌酸的生物合成, 破坏细胞壁结构并发挥杀菌作用<sup>[6]</sup>。目前研究表明, MTB 对 DLM 的耐药主要与其活化前体药物所需酶的功能缺失有关。目前研究表明 *ddn* *fgd1* 以及参与 F420 生物合成途径的 *fbiA* *fbiB* 和 *fbiC* 基因出现非同义突变或功能缺失时, 会导致 DLM 耐药表型的产生<sup>[7-9]</sup>。然而, 近年来临床研究发现, 仍有部分 DLM 耐药分离株未检测到上述经典耐药相关基因突变, 提示除已知机制外可能还存在尚未被识别的耐药决定因素<sup>[10]</sup>。这类无法通过现有分子检测手段解释的耐药现象被称为“隐匿性耐药”, 不仅限制了 DLM 耐药的分子诊断准确性, 也提示未来挖掘新耐药相关基因及其作用机制对 MDR-TB 的诊治具有重要意义<sup>[11]</sup>。

全基因组测序 (whole-genome sequencing, WGS) 已成为系统解析结核分枝杆菌耐药遗传机制的重要工具。该技术能获取 MTB 全基因组水平的序列信息, 使研究者能够在全基因组范围内鉴定与耐药表型相关的遗传变异, 包括单核苷酸多态性 (sin-

gle nucleotide polymorphism, SNP)、插入或缺失和其他变异模式,从而挖掘潜在的耐药相关基因及调控通路<sup>[5, 12-13]</sup>。然而,WGS 通常只能提供候选基因或统计关联,需要结合实验验证对候选基因进行深入功能评估<sup>[14]</sup>。目前,大多数耐药相关研究主要基于体外诱导耐药突变筛选或有限数量的临床分离株,能够通过功能实验直接建立基因变异与临床耐药表型因果关系的证据仍相对不足<sup>[7, 10]</sup>。因此,对新发现候选基因开展系统的功能验证及机制研究,对于完善 DLM 耐药分子机制网络具有重要意义。

*Rv1372c* 全长 1 182 bp,其注释为可能编码  $\alpha$ -吡喃酮合成聚酮合酶样蛋白<sup>[15]</sup>。然而,全基因组转座子突变筛选及其他遗传学研究尚未对 *Rv1372c* 的具体生物学功能提供充分证据。目前,其编码产物主要依据序列同源性被预测为  $\alpha$ -吡喃酮合成聚酮合酶样蛋白,其具体生物学功能及作用机制仍有待进一步研究<sup>[16]</sup>。

基于上述研究背景,本研究提出假说:*Rv1372c* 可能通过调控 MTB 细胞包膜脂质稳态及应激适应过程,参与特定代谢环境下 MTB 对 DLM 的反应调控。围绕该假说,本研究结合临床分离株药物敏感性检测(phenotypic drug susceptibility testing, PDST)、WGS、基因敲除与回补以及多组学联合分析等策略,系统研究 *Rv1372c* 在结核分枝杆菌 DLM 反应中的作用及其潜在分子机制。研究结果不仅有助于深化对 DLM 非经典耐受机制的认识,也可为基于 *Rv1372c* 相关通路的耐药风险分子标志物筛选以及新型联合干预策略的开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料 结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 由贵州省疾病预防控制中心结核病防治所惠赠,实验在 BSL-2 实验室中进行;卡那霉素、油酸、刃天青、德拉马尼(阿拉丁公司);Middlebrook 7H9、Agar Middlebrook 7H10、OADC(BD 公司);大肠杆菌 D5Ha 感受态菌株(擎科生物);SacI、EcoRI 和 HindIII 内切酶(NEB 公司);pJV53-che9 质粒、pUC19-cs-zeo-hyg 质粒及 pMV306-Int-pleft-hyg-mscarlet 质粒由四川大学华西医院结核病研究室惠赠。

1.2 临床菌株来源 本研究所纳入的结核分枝杆菌临床分离株来源于 2022 年 1 月至 2024 年 12 月遵义医科大学附属医院收治的肺结核患者。菌株由患者痰标本经分离培养获得,并经菌种鉴定确认为 MTB。所有菌株均保存于研究室菌种库。

1.3 伦理审批 本研究获得遵义医科大学附属医院伦理委员会审批(NO:KLL-2022-759)。本研究

使用剩余临床标本进行回顾性分析,免于签署知情同意书。

### 1.4 方法

1.4.1 构建 H37Rv  $\Delta Rv1372c$  以结核分枝杆菌标准株 H37Rv 基因组 DNA 为模板,扩增 *Rv1372c* 上下游同源臂(F1 和 F2)。采用 EcoRI 和 HindIII 双酶切 pUC19 质粒,回收载体大片段后,将 pUC19 载体片段、*Rv1372c* 同源臂 F1、*Rv1372c* 同源臂 F2 及 KanRCS 抗性片段进行同源重组连接,构建重组质粒 pUC19-*Rv1372c*,并经测序验证正确后将重组质粒经限制性内切酶 EcoRI-HindIII 双酶切线性化,柱纯化回收,取 200 ng 质粒经 2.5 kv 电压条件下电转入诱导表达 pJV53-Zeo 的 H37Rv 感受态细胞中。电转后于 37 °C 条件下复苏过夜,随后涂布于含 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 7H11 固体培养基上培养。待单克隆形成后,挑取单克隆菌株,分别通过菌落 PCR、qRT-PCR 及一代测序对 *Rv1372c* 基因敲除情况进行验证,并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

1.4.2 构建 *Rv1372c* 回补株 以结核分枝杆菌标准株 H37Rv 基因组 DNA 为模板,扩增 *Rv1372c* 全长基因片段。选用 pMV306-Int-pleft-hyg-mscarlet 质粒作为载体,经 SacI 和 HpaI 双酶切后回收线性化载体片段,并将其与 *Rv1372c* 基因片段进行同源重组连接,构建重组质粒。经转化扩增并提取质粒后,将重组质粒经 2.5 kv 电压条件下电转入结核分枝杆菌 H37Rv 感受态细胞中。通过潮霉素抗性筛选获得阳性克隆,并采用菌落 PCR 及 qRT-PCR 对回补株进行验证。

1.4.3 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定 将 DLM 连续 2 倍稀释,最终药物浓度为 0.016 ~ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将结核分枝杆菌标准株 H37Rv、敲除株 H37Rv  $\Delta Rv1372c$  及回补株 H37Rv  $\Delta Rv1372c$ :*Rv1372c* 培养于 7H9 + OADC 至对数生长期后,用未加甘油 7H9 洗菌 3 次,吸取 200  $\mu\text{L}$  菌液加入 20 mL 7H9 + OADC 或 7H9 + 油酸培养基中稀释 100 倍,使最终接种浓度约为  $1 \times 10^5$  CFU/mL。取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液接种于预先加入不同浓度 DLM 的 96 孔板中,每组设置 3 个生物学重复,于 37 °C 避光静止培养 2 周后,当观察到生长对照孔出现明显菌体生长时,向各孔加入 10  $\mu\text{L}$  0.04% 刃天青溶液,避光孵育 24 h。根据颜色变化判断细菌生长情况:由蓝色变为粉红色表示细菌生长,而保持蓝色则表明细菌生长受到抑制。MIC 定义为能够完全抑制颜色由蓝色向粉红色转变的最低药物浓度。本研究 DLM 药物敏感性分析依据《世界卫生组织(WHO)抗结核药物药敏试验标准(2023 版)》及《CLSI M24-A2 指南》中的判定标

准<sup>[17-18]</sup>,将 DLM 的临界折点设定为 0.06 μg/mL。即当 MTB 的 MIC >0.06 μg/mL 时判定为耐药株,MIC ≤ 0.06 μg/mL 时判定为敏感株。采用 Baso 96 孔药敏板对 341 株临床分离 MTB 进行 PDST。

1.4.4 生长曲线测定及代时分析 将上述 3 种菌株在 7H9 + OADC 液体培养基中(37 ℃,100 r/min 振荡培养)培养至对数生长期后,按 1:100 的比例分别接种至 7H9 + OADC 及以油酸为唯一碳源的 7H9 液体培养基中,调整初始 OD<sub>600</sub>为 0.01。每组设置 3 个生物学重复,每 2 天测定 1 次 OD<sub>600</sub>值,测定前将培养物充分涡旋混匀,并使用 27 G 针头反复吹打 10~20 次以分散菌团。并记录 OD<sub>600</sub>绘制生长曲线。代时(generation time, G)按照如下公式进行计算。

G = (t2 - t1) / log2[log(OD600 - 2) - log(OD600 - 1)]

1.4.5 固体平板生长能力分析 将上述菌株培养至对数生长期后,以无菌水制备 10<sup>-1</sup>至 10<sup>-5</sup>的系列梯度稀释液。每个梯度取 2.5 μL 滴加接种于 7H10 + OADC 固体培养基及 7H10 + 油酸固体培养基表面。于 37 ℃培养 14~21 d 后,观察并记录菌

落生长状况及菌落形态特征。

1.5 多组学分析 本研究转录组、蛋白组、脂质组测序及后续生物信息学分析均在委托服务机构上海中科新生命生物科技有限公司完成,测序服务由擎科生物科技有限公司提供。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 29.0 进行统计学分析。所有实验均至少进行 3 次独立重复,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并采用 Tukey 多重比较检验进行组间两两比较,以校正多重比较产生的 I 类错误。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床分离菌对德拉马尼敏感性统计 341 株 MTB 的 DLM MIC 分布范围为 0.015~1 μg/mL。其中,304 株(89.15%)MTB 的 MIC ≤ 0.06 μg/mL,被判定为 DLM 敏感株;37 株(10.85%)MTB 的 MIC > 0.06 μg/mL,被判定为 DLM 耐药株。详细 MIC 分布见表 1。

表 1 MTB 临床分离菌德拉马尼 MIC 分布(μg/mL)

| 药物  | MIC 浓度梯度 | >1 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.12 | 0.06 | 0.03 | 0.015 | <0.015 |
|-----|----------|----|---|-----|------|------|------|------|-------|--------|
| DLM | 0.015~1  | 1  | 9 | 6   | 6    | 15   | 57   | 63   | 43    | 141    |

2.2 临床分离株 WGS 结果分析 全基因组测序分析结果显示,在 37 株临床分离的 DLM 耐药菌株(MIC >0.06 μg/mL)中,有 3 株在未检测到已知耐 DLM 相关突变的情况下,经 TB Profiler(v6.4.0)算法分析,定位到 *Rv1372c* 基因的 2 个非同义突变位点:c.1056T(p. Leu352)和 c.584T(p. Met195)(见表 2)。结果提示,*Rv1372c* 的突变可能代表 1 种此前未被报道的 MTB 对德拉马尼耐药的潜在新位点。

表 2 临床德拉马尼耐药结核分枝杆菌分离株中 *Rv1372c* 突变特征及其与 MIC 变化关系

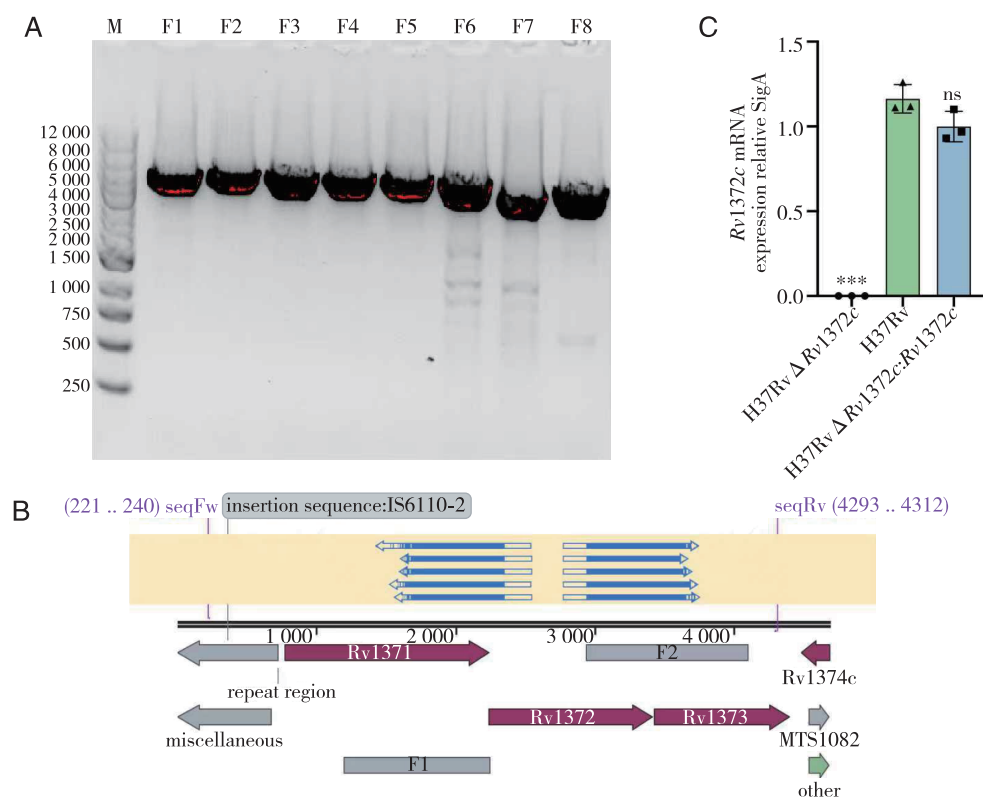
| 样本 | 菌株遗传亚系       | c.1056T;<br>p. Leu352 | c.584T;<br>p. Met195 | MIC 变化<br>倍数 |
|----|--------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| 1  | lineage4.2.2 | 0                     | 1                    | 2            |
| 2  | lineage2.2.1 | 1                     | 0                    | 1            |
| 3  | lineage2.2.1 | 1                     | 0                    | 2            |

0:未发生突变;1:发生突变;MIC 变化倍数:相对于野生型参考株的最低抑菌浓度倍数变化。

2.3 通过 pJV53 介导的同源重组法成功构建 H37Rv Δ*Rv1372c* 野生型菌株 H37Rv 扩增得到约 4 100 bp 的特异性条带,而敲除株由于引入卡那霉素抗性基因,其扩增片段大小约为 4 400 bp,与理论预期一致(图 1A)。对 PCR 扩增产物测序分析,结果表明目的基因 *Rv1372c* 已被卡那霉素抗性基因正确替换,证实敲除构建成功(图 1B)。敲

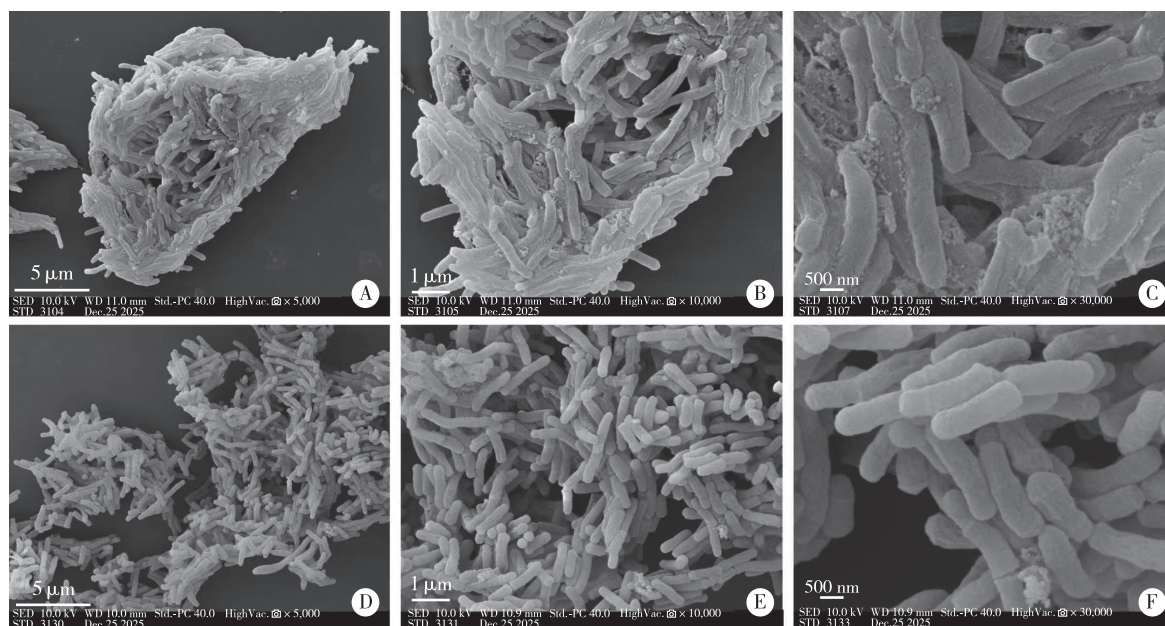
除株中 *Rv1372c* mRNA 表达水平降至不可检测,而回补株中 *Rv1372c* 的表达水平与野生型菌株相比差异无统计学意义(图 1C),进一步验证了敲除株与回补株构建的准确性与稳定性。

2.4 *Rv1372c* 缺失改变结核分枝杆菌形态并影响其体外生长特性 扫描电镜结果显示,与野生型菌株 H37Rv 相比,*Rv1372c* 缺失株(H37Rv Δ*Rv1372c*)菌体表面分泌物明显减少,细胞表面更为光滑(图 2)。本研究进一步比较了敲除株 H37Rv Δ*Rv1372c*、回补株 H37Rv Δ*Rv1372c*;*Rv1372c* 及野生型菌株 H37Rv 在 2 种液体培养基和 2 种固体培养基中的生长特性。在含 OADC 的标准培养条件下,H37Rv Δ*Rv1372c* 的代时短于野生型菌株 H37Rv,而回补株 H37Rv Δ*Rv1372c*;*Rv1372c* 的代时与野生型菌株相比差异无统计学意义(图 3A、C)。在以油酸为唯一碳源的培养条件下(图 3B、D),H37Rv Δ*Rv1372c* 的代时同样短于野生型菌株 H37Rv,而回补株与野生型菌株之间差异亦无统计学意义。与 OADC 培养条件相比,尽管 3 组菌株在油酸条件下的代时整体延长,但各菌株之间的相对变化趋势相同。在 2 种 7H10 固体平板培养 2 周后的结果(图 4 A、B)显示,各浓度梯度下 3 种菌株均可形成肉眼可见菌落。



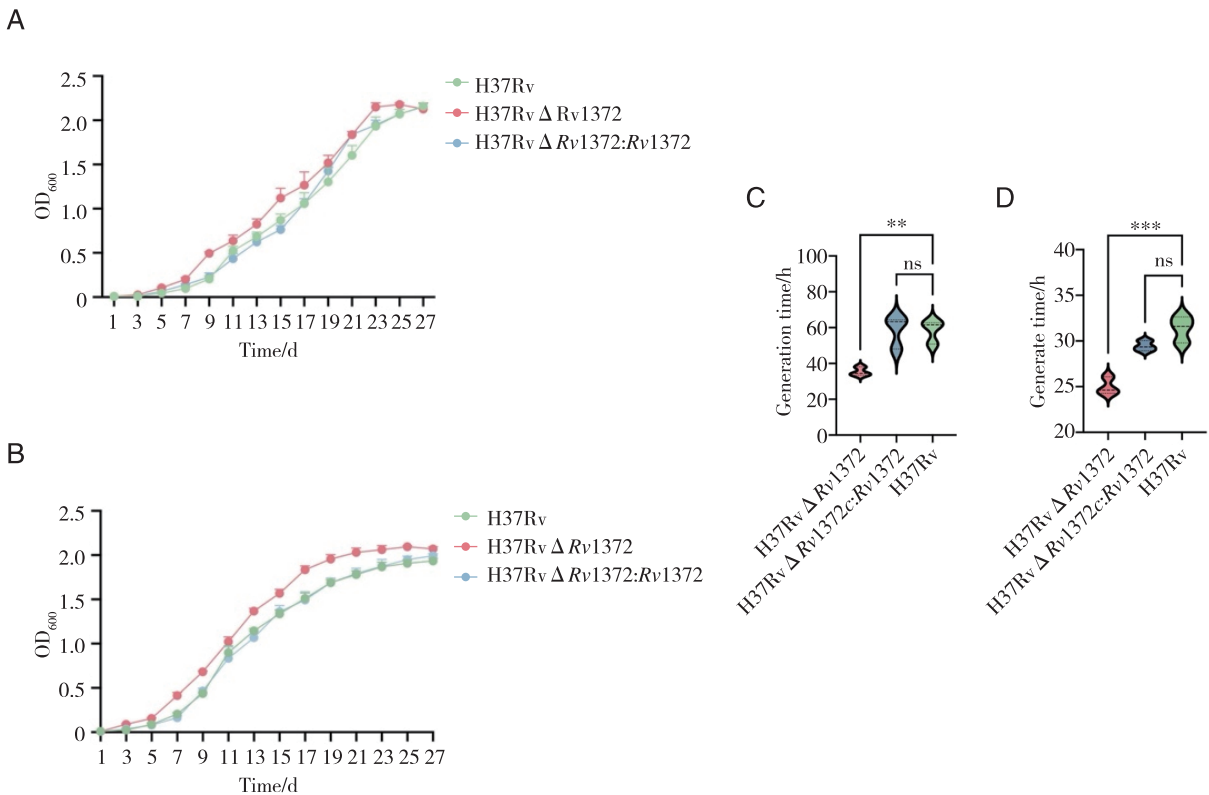
A: PCR 扩增鉴定 *Rv1372c* 敲除株及回补株, M: DNA Marker; 泳道 F1~F7 为不同重组菌株的鉴定条带, 泳道 F8 为野生型条带; B: *Rv1372c* 基因在结核分枝杆菌 H37Rv 基因组中的位置及同源重组构建测序对比结果; C: qRT-PCR 检测不同菌株中 *Rv1372c* 的相对表达水平; \*\*\*: 与野生型 H37Rv、H37Rv  $\Delta Rv1372c$  比较,  $P < 0.001$ ; ns: 与野生型 H37Rv 比较,  $P > 0.05$ ;  $n = 3$ 。

图1 *Rv1372c* 基因敲除株及回补株的构建与验证



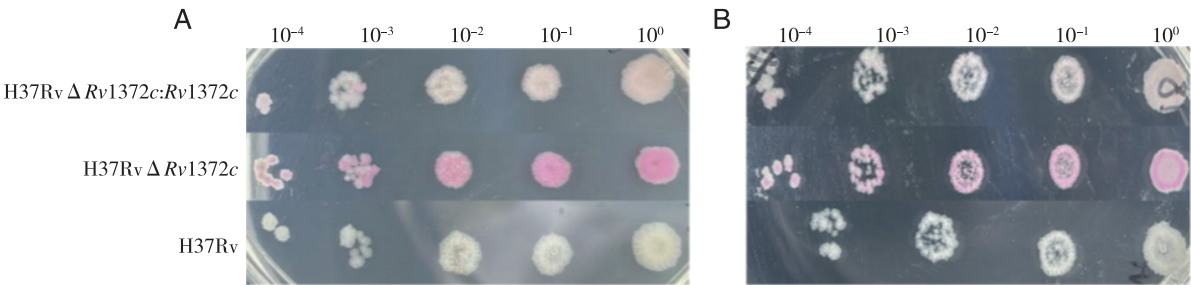
A~C: 野生型 H37Rv 在  $\times 5\,000$ 、 $\times 10\,000$  和  $\times 30\,000$  放大倍数下的扫描电镜图像; D~F: *Rv1372c* 缺失株 H37Rv  $\Delta Rv1372c$  在  $\times 5\,000$ 、 $\times 10\,000$  和  $\times 30\,000$  放大倍数下的扫描电镜图像; 与野生型比较, 敲除株菌体表面更为光滑, 胞外分泌物明显减少, 提示 *Rv1372c* 缺失可能影响细胞包膜相关脂质或分泌蛋白的形成。

图2 *Rv1372c* 缺失对结核分枝杆菌形态结构的影响



A:不同菌株在 7H9 + OADC 液体培养基中的 OD<sub>600</sub>生长曲线;B:不同菌株在油酸为唯一碳源的液体培养基中的 OD<sub>600</sub>生长曲线;C:常规培养条件下各菌株代时比较;D:油酸碳源条件下各菌株代时比较;\*: $P < 0.01$ ;\*\*\*: $P < 0.001$ ;ns: $P > 0.05$ ;  $n = 3$ 。

图3 H37Rv $\Delta$ Rv1372c 在 7H9 + OADC 与 7H9 + 油酸培养基中的生长曲线及代时分析

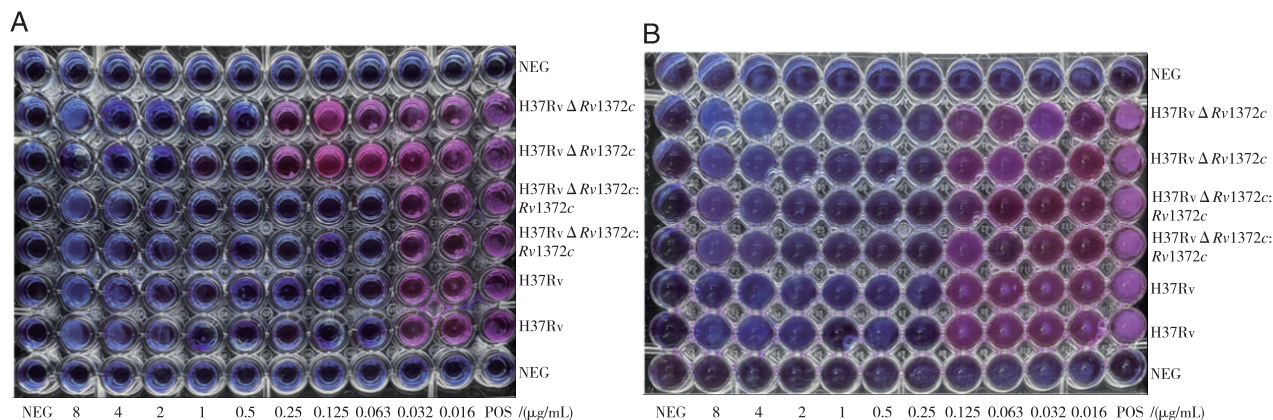


A:在 7H11 固体平板培养条件下,不同菌株的梯度稀释平板生长情况,自上而下分别为回补株 H37Rv  $\Delta$ Rv1372c:Rv1372c、敲除株 H37Rv  $\Delta$ Rv1372c 及野生型 H37Rv;B:在以油酸为唯一碳源平板条件下,不同菌株的梯度稀释平板生长情况。

图4 Rv1372c 突变株在固体培养基上的菌落生长表现

2.5 Rv1372c 缺失影响结核分枝杆菌在油酸条件下对德拉马尼的敏感性 在以油酸为唯一碳源的培养条件下, H37Rv  $\Delta$ Rv1372c 对 DLM 的 MIC 为 0.5  $\mu$ g/mL,高于野生型菌株 H37Rv 的 0.06  $\mu$ g/mL,而回补株 H37Rv  $\Delta$ Rv1372c:Rv1372c MIC 与野生型无明显差异(图 5A)。相比之下,在含 OADC

的标准培养条件下,敲除株与野生型菌株对德拉马尼的 MIC 均为 0.25  $\mu$ g/mL,两者之间未观察到明显差异(图 5B)。结果显示,在常规培养条件下各菌株 MIC 无统计学差异,而在油酸碳源条件下,敲除株对德拉马尼的 MIC 明显升高,回补株可恢复该表型。



A:在以油酸为唯一碳源条件下,采用微量稀释刃天青法检测不同菌株对德拉马尼的 MIC;B:在常规液体培养条件下,采用微量稀释刃天青法检测不同菌株对德拉马尼的 MIC;行自上而下依次为阴性对照(NEG)、敲除株 H37Rv  $\Delta Rv1372c$ 、回补株 H37Rv  $\Delta Rv1372c$ ; *Rv1372c* 及野生型 H37Rv;列为德拉马尼浓度梯度(8 ~ 0.016  $\mu\text{g/mL}$ )、NEG;孔内呈蓝色表示细菌生长受抑制,呈粉红色表示细菌生长。

图5 不同碳源条件下 *Rv1372c* 缺失对结核分枝杆菌德拉马尼敏感性的影响

2.6 三组学联合分析揭示 *Rv1372c* 介导的非经典 DLM 耐受机制 采用 qRT-PCR 检测不同外排泵相关基因在 *Rv1372c* 缺失株中的相对表达水平变化。结果以相对于野生型 H37Rv 的 LogFC 表示。所检测基因包括 *Rv0167*、*Rv0168*、*Rv0565*、*Rv0849*、*Rv1145*、*Rv1272c*、*Rv1273c*、*Rv1202c*、*Rv1626L*、*Rv1747*、*Rv2400c*、*Rv2459*、*Rv2681* 及 *Rv2936*。结果显示,*Rv1372c* 缺失后多种外排泵相关基因表达上调,其中以 ABC 转运体家族相关基因为主(图 6)。在油酸作为唯一碳源的培养条件下,本研究对 *Rv1372c* 缺失株与野生型菌株 H37Rv 进行了转录组学、脂质组学及蛋白组学的联合分析。首先,转录组样本相关性分析显示,各组生物学重复具有良好的一致性(图 7A)。在 MIC 浓度 DLM 处理条件下,转录组学共鉴定出 759 个差异表达基因(图 7B),其中 15 个外排泵相关基因在药物压力下呈上调趋势。在这些外排泵基因中,12/15(80%)属于 ABC 转运体家族,2/15(13.33%)属于 RND 家族,1/15(6.67%)属于 MFS 超家族。同时,转录组未检测到已知与 DLM 耐药直接相关的 *ddn*、*fgd1* 及 *F420* 生物合成通路相关基因 *fbiA*、*fbiB* 和 *fbiC* 表达发生变化。差异表达基因 KEGG 富集分析显示,其主要富集于脂质代谢及细胞应激相关通路

(图 7C)。脂质组 PCA 分析显示,两组样本能够明显分离(图 7D)。蛋白组 PCA 分析同样显示两组样本具有良好的区分度(图 7E)。进一步对差异分子进行分析发现,脂质组学火山图(图 7F)和蛋白组学火山图(图 7G)分别展示了两组间差异脂质和差异蛋白的表达分布。统计结果显示,共鉴定出 870 个差异脂质分子,其中上调 377 个、下调 493 个(图 7H);共鉴定出 528 个差异表达蛋白,其中上调 383 个、下调 145 个(图 7I)。差异脂质 KEGG 富集分析显示,其主要富集于甘油磷脂代谢及 GPI 锚定生物合成等通路(图 7J);蛋白组 KEGG 富集分析显示,ABC 转运体、分枝菌酸生物合成及阿拉伯半乳糖生物合成等通路富集(图 7K)。

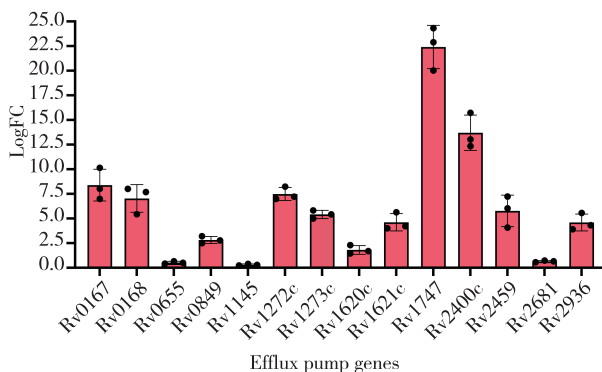
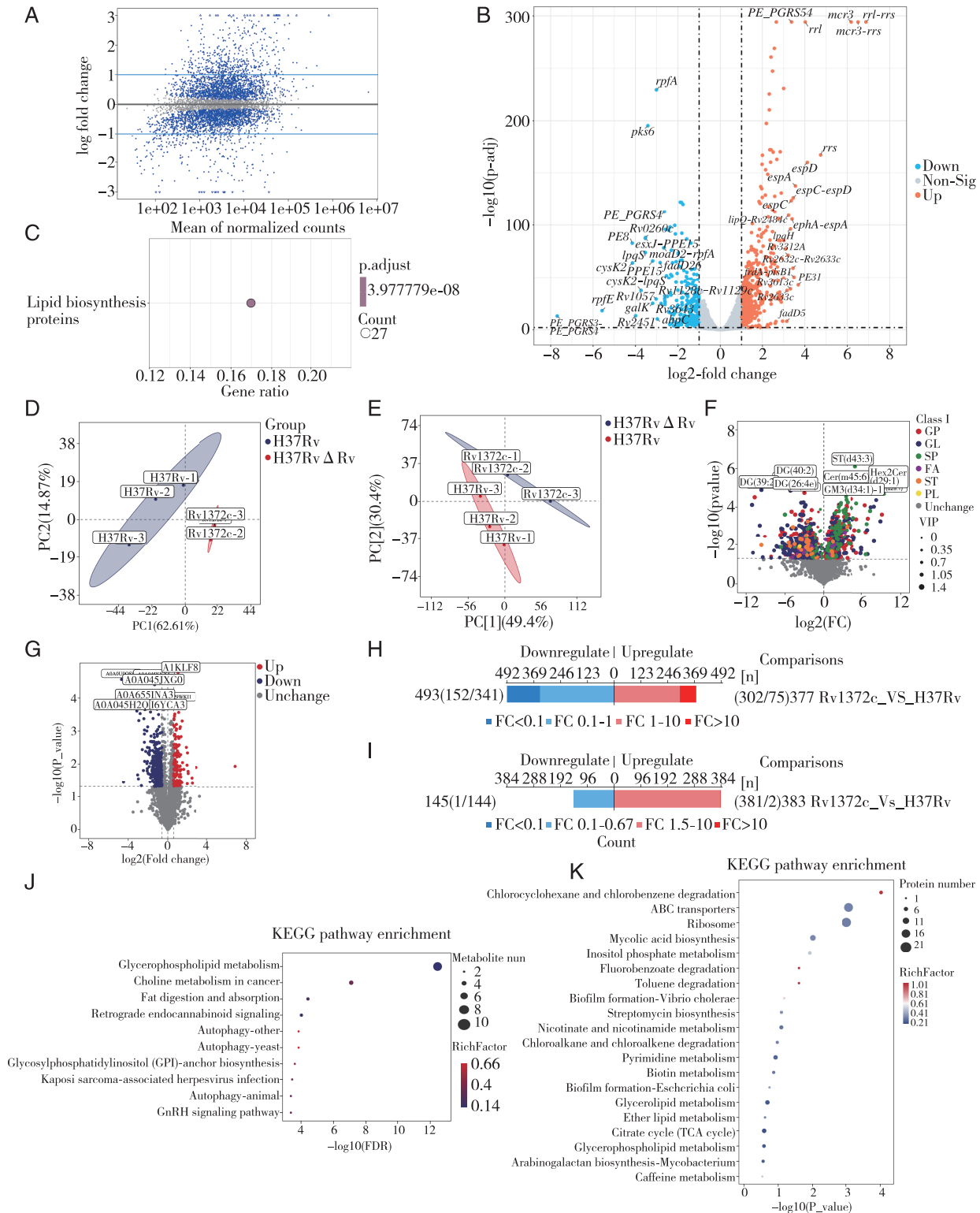


图6 *Rv1372c* 缺失对外排泵相关基因表达的影响

图7 *Rv1372c* 缺失引起的多组学差异分析及通路富集结果

### 3 讨论

本研究基于临床分离 MTB 全基因组测序结果,结合基因敲除与多组学分析,表明 *Rv1372c* 缺失可在特定营养限制环境条件下介导 MTB 对 DLM 的非经典耐受表型。不同于既往研究主要聚焦于 *ddn* *fgd1* 及 *F420* 生物合成通路相关基因,本研究通过 WGS 分析,在 3 株无经典 DLM 耐药突变的临床耐药菌株中定位到 *Rv1372c* 的非同义突变,并通过功能验证表明其缺失可在油酸为唯一碳源条件下提高 DLM 的 MIC,提示 *Rv1372c* 可能是未被报道的 DLM 潜在耐药相关位点。

既往研究表明,*Rv1372c* 被注释为聚酮合酶样 (polyketide synthase-like, PKS-like) 相关基因,属于 MTB PKS 基因家族成员<sup>[19]</sup>。该家族广泛参与 MTB 高度疏水性细胞包膜的重要脂质<sup>[16]</sup>。这些细胞壁脂质层不仅决定了细菌对外界有害物质的物理屏障功能,还在调控细胞通透性、抗氧化应激以及宿主-病原相互作用中发挥关键作用<sup>[2]</sup>。同时,MTB 细胞包膜脂质组成的改变可显著影响抗结核药物的跨膜摄入效率,从而间接调节药物敏感性<sup>[20]</sup>。PKS 相关基因 *Rv1372c*,其功能缺失后可能通过干扰脂质丰度网络和细胞包膜结构,进而影响抗结核药物 DLM 摄入及其杀菌效应。

本研究扫描电镜结果显示,*Rv1372c* 缺失后菌体表面更为光滑、分泌物减少,提示其可能参与 MTB 细胞包膜相关脂质或分泌蛋白的形成。结合蛋白组学及脂质组学数据表明:在 *Rv1372c* 基因缺失背景下,差异脂质和蛋白以下调为主,提示 *Rv1372c* 缺失可能导致 MTB 包膜脂质丰度下降或结构发生重塑,进而影响菌体表面结构发生改变并减少蛋白分泌。

同时,本研究发现 *Rv1372c* 缺失所介导的 DLM 耐受表型仅在油酸作为唯一碳源条件下出现,MTB 在宿主体内主要依赖脂肪酸作为碳源,其代谢状态与体外富营养条件存在显著差异<sup>[21]</sup>。已有研究表明,MTB 能够根据不同环境和代谢状态动态重塑其脂质代谢途径,其中包括使用脂肪酸、胆固醇等不同碳源时的调整<sup>[22]</sup>。既往研究发现在营养受限条件下,MTB 可降低生长速率,进而影响药物通透性和杀菌效应从而出现药物耐受表型<sup>[23-24]</sup>。同时,基于油酸单一碳源的背景下,*Rv1372c* 缺失对 MTB 细胞包膜结构及药物敏感性的影响被诱导放大,进一步揭示营养限制环境在 MTB 耐药形成中的重要调节作用机制。

本研究转录组学分析显示,在油酸唯一碳源背景下同时处于 1/2 DLM 药物压力条件下,*Rv1372c* 缺失株中多种外排泵相关基因显著上调,其中以 ABC 转运体家族为主。ABC 转运体家族是已知的最大的外排泵家族之一,具备跨膜结构和 ATP 结合水解活性,其通过降低胞内有效药物浓度,从而削弱药物的杀菌效应,在 MTB 对多种抗结核药物的耐受与耐药中发挥重要作用<sup>[25-26]</sup>。同时,*Rv1372c* 缺失并未引起 *ddn* *fgd1* 及 *fbiA* *fbiB* *fbiC* 等经典 DLM 耐药相关基因表达水平的显著变化,表明本研究中耐受表型并非通过前体药物活化受阻这一经典机制实现,而更可能通过非经典耐药途径。脂质组学结果表明,*Rv1372c* 缺失影响了甘油磷脂、甘油酯、鞘脂及脂肪酸等多类细胞壁和膜相关脂质的丰度,并富集于甘油磷脂代谢及 GPI 锚定生物合成通路。GPI 锚定通路与膜蛋白锚定及膜微区结构的稳定性密切相关,其改变可能影响 MTB 膜蛋白定位和功能<sup>[27]</sup>,进而影响膜蛋白的空间组织和功能发挥。蛋白组学分析进一步显示,差异蛋白显著富集于分枝菌酸与阿拉伯半乳糖生物合成通路,这两类通路是 MTB 胞壁复杂脂质层构建的核心环节。分枝菌酸是长链特有脂酸,是细菌外膜疏水性层的主要脂质成分,而阿拉伯半乳糖作为支架糖多糖连接肽聚糖与分枝菌酸层,共同构成了被称为分枝菌酰-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合物的特有细胞壁结构,该结构不仅决定了细菌高疏水性,还作为极强的通透性屏障影响抗结核药物的摄入<sup>[28-29]</sup>。上述脂质和蛋白通路的重塑,与扫描电镜观察到的菌体表面更为光滑、分泌物减少的表型一致,提示 *Rv1372c* 缺失可能通过扰动关键脂质和蛋白合成通路,导致膜结构和表面组成的改变,一方面可能降低 DLM 及其活性中间体的跨膜进入效率,减弱其有效杀菌作用;另一方面,膜相关应激通路的激活伴随 ABC 外排泵表达上调,可能进一步促进药物排出,降低胞内有效药物浓度。上述两者的协同效应在经典药物活化通路未发生改变的情况下削弱了 DLM 的杀菌效应,为解释 *Rv1372c* 缺失菌株在油酸碳源条件下表现出依赖代谢环境的非经典耐受表型提供了分子机制线索,并强调了代谢状态对耐药形成的调节作用。

本研究在基于真实世界临床耐 DLM 分离株中发现 *Rv1372c* 突变,且不伴随经典耐药基因改变,提示其可能参与解释部分基因型与表型不一致的耐药现象。目前研究表明 *Rv1372c* 可作为新型 MTB 分枝菌酸抑制剂靶点<sup>[30]</sup>。尽管需更多功能

性和药理验证, *Rv1372c* 作为 PKS 相关基因, 仍有望作为潜在的新型分子耐药标志物, 为 DLM 耐药的分子监测及机制研究提供新的切入点, 并为未来耐药防治策略和新靶点药物发现提供线索。

本研究仍存在一定局限性。首先, 纳入的临床 DLM 耐药菌株均来自单中心数量有限, 需在多中心样本验证 *Rv1372c* 突变与耐药表型之间的相关性及稳定性。其次, 本研究主要基于体外培养模型探讨 *Rv1372c* 缺失对药物敏感性的影响, 尚未在动物感染模型中验证其对 DLM 体内治疗效果的影响, 因此其对临床疗效的外推仍需谨慎。最后, 尽管多组学结果提示 *Rv1372c* 可能参与脂质代谢及氧化还原通路调控, 但其具体酶学活性及底物特异性尚未通过纯化蛋白或体外反应体系直接验证。未来, 本课题组将结合 MBC、杀菌曲线、动物感染模型及机制研究, 进一步解析 *Rv1372c* 介导 DLM 非经典耐药表型的分子机制, 并在更大规模临床分离株中开展验证, 以进一步评估其作为潜在耐药标志物的临床应用价值。

综上所述, 本研究观察 *Rv1372c* 缺失可在油酸碳源条件下介导 MTB 对 DLM 的非经典耐受, 其机制可能与脂质代谢重塑、细胞包膜结构改变及外排泵激活相关。本研究不仅拓展了对 DLM 非经典耐受机制的认识, 同时强调了代谢环境在药物敏感性调控中的重要作用。未来可进一步评估 *Rv1372c* 作为分子分型及耐药风险预警标志物的潜在价值, 并探索针对相关代谢通路或外排系统的干预策略, 为提高 DLM 治疗效果及开发新型联合治疗方案提供理论依据。

## [参考文献]

- [1] Radhakrishnan S K, Sundaramurthy V. The lipid language of tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis* surface molecules in host interaction and drug resistance [J]. *mBio*, 2026, 17(3): e0395925.
- [2] Ghazaei C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids; insights into molecular mechanisms from persistence to virulence [J]. *J Res Med Sci*, 2018, 23: 63.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2025[R]. Geneva: World Health Organization, 2025.
- [4] Tan E L, Qin Y, Yang J, et al. Global burden of MDR-TB and XDR-TB: trends, inequities, and future implications for public health planning [J]. *BMC Infect Dis*, 2025, 25(1): 1225.
- [5] Hasan Z, Razzak S A, Kanji A, et al. Whole-genome sequencing reveals genotypic resistance in phenotypically susceptible *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates [J]. *Int J Mycobacteriol*, 2023, 12(2): 179-183.
- [6] 曲书慧, 徐幼桥, 夏卓璐, 等. 新型抗结核药德拉马尼的合成 [J]. *化工时刊*, 2025, 39(1): 11-17.
- [7] Liu Y, Shi J, Li L, et al. Spontaneous mutational patterns and novel mutations for delamanid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66(12): e0053122.
- [8] Nguyen T V A, Anthony R M, Cao T T H, et al. Delamanid resistance: update and clinical management [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(12): 3252-3259.
- [9] Ahmad Khosravi N, Sirous M, Khosravi A D, et al. A narrative review of bedaquiline and delamanid: new arsenals against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Lab Anal*, 2024, 38(15-16): e25091.
- [10] Mok S, Roycroft E, Flanagan P R, et al. Investigation of genomic mutations and their association with phenotypic resistance to new and repurposed drugs in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2023, 78(11): 2637-2644.
- [11] Gómez-González P J, Perdigao J, Gomes P, et al. Genetic diversity of candidate loci linked to *Mycobacterium tuberculosis* resistance to bedaquiline, delamanid and pretomanid [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 19431.
- [12] Wang L, Yang J, Chen L, et al. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for prediction of drug resistance [J]. *Epidemiol Infect*, 2022, 150: e22.
- [13] 梅金周, 王云霞, 张梅娟, 等. 全基因组测序技术在耐药肺结核诊断中的应用性评价 [J]. *新发传染病电子杂志*, 2024, 9(3): 16-20.
- [14] Hazra D, Lam C, Chawla K, et al. Impact of whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* on treatment outcomes for MDR-TB/XDR-TB: a systematic review [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(12): 2782.
- [15] Sassetti C M, Boyd D H, Rubin E J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 48(1): 77-84.
- [16] Quadri L E. Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49(3): 179-211.
- [17] World Health Organization. WHO technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis [S]. Geneva: World Health Organization, 2023.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes [S]. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [19] Sankaranarayanan R, Saxena P, Marathe U B, et al. A

- novel tunnel in mycobacterial type III polyketide synthase reveals the structural basis for generating diverse metabolites[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(9): 894-900.
- [20] 陈晓博, 李俊. 抗结核药物靶点的结构研究进展[J]. 自然杂志, 2021, 43(5): 335-342.
- [21] Maurya R K, Bharti S, Krishnan M Y. Triacylglycerols: fuelling the hibernating *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 450.
- [22] Kim H, Shin S J. Revolutionizing control strategies against *Mycobacterium tuberculosis* infection through selected targeting of lipid metabolism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(10): 291.
- [23] Shi X J, Shi K X, Han F, et al. Genetic determinants of *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and drug efficacy during stationary phase growth [J]. *Microbiol Spectr*, 2025, 13(9): e0109625.
- [24] Martini M C, Alonso M N, Cafiero J H, et al. Loss of glycerol catabolism confers carbon-source-dependent artemisinin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2024, 68(10): e0064524.
- [25] 张春菁, 谢宗会, 万成杰, 等. 结核分枝杆菌外排泵研究进展[J]. 微生物与感染, 2022, 17(3): 163-171.
- [26] Cassio Barreto de Oliveira M, Balan A. The ATP-binding cassette (ABC) transport systems in *Mycobacterium tuberculosis*: structure, function, and possible targets for therapeutics[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(12): 443-468.
- [27] Zhang Q, Fujita M. Why nature evolved GPI-anchored proteins: unique structure characteristics enable versatile cell surface functions[J]. *Glycobiology*, 2024, 34(12): cwae089.
- [28] Abrahams K A, Besra G S. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target[J]. *Parasitology*, 2018, 145(2): 116-133.
- [29] Alderwick L J, Harrison J, Lloyd G S, et al. The mycobacterial cell wall--peptidoglycan and arabinogalactan [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015, 5(8): a021113.
- [30] Sharma A, Islam M H, Fatima N, et al. Elucidation of marine fungi derived anthraquinones as mycobacterial mycolic acid synthesis inhibitors: an in silico approach[J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(2): 1715-1725.
- [收稿 2026-02-04;修回 2026-06-24]  
(编辑:王福军)
- (上接第 740 页)
- [31] Su J, Xie Q, Wilson I, et al. Differential regulation and role of interleukin-1 receptor associated kinase-M in innate immunity signaling[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(7): 1596-1601.
- [32] Pantazi I, Al-Qahtani A A, Alhamlan F S, et al. SARS-CoV-2/ACE2 interaction suppresses IRAK-M expression and promotes pro-inflammatory cytokine production in macrophages[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:683800.
- [33] Nguyen H A, Rajaram M V, Meyer D A, et al. Pulmonary surfactant protein A and surfactant lipids upregulate IRAK-M, a negative regulator of TLR-mediated inflammation in human macrophages[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(7): L608-L616.
- [34] Kobayashi H, Nolan A, Naveed B, et al. Neutrophils activate alveolar macrophages by producing caspase-6-mediated cleavage of IL-1 receptor-associated kinase-M[J]. *J Immunol*, 2011, 186(1): 403-410.
- [35] Li J, Zheng Z, Liu Y, et al. IRAK-M has effects in regulation of lung epithelial inflammation[J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 103.
- [36] Pal R, Maurya V, Borah S, et al. The SH3-binding domain of chorismate mutase protein of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to mycobacterial virulence [J]. *iScience*, 2024, 27(11): 111044.
- [收稿 2026-01-16;修回 2026-04-08]  
(编辑:王先恒)