

外排泵介导肺炎克雷伯菌耐药的研究进展

王于莉 姜昕汝 郑月娟*

(上海中医药大学基础医学院病原教研室 上海 201203)

摘要: 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是重要的条件致病菌,近年来肺炎克雷伯菌感染在医院内感染中所占的比率持续上升,耐药率也不断攀升,这给临床治疗带来极大的困难。肺炎克雷伯菌发生耐药的重要机制之一就是其细胞膜上存在的外排泵系统,它们将渗入细菌体内的药物不断泵出,导致菌体内的药物浓度过低,不足以发挥抗菌作用。本文主要针对外排泵介导肺炎克雷伯菌的耐药现状,外排泵的分子结构和基因调节,外排泵抑制剂以及传统中药在耐药菌治疗方面的应用等做系统性梳理,以期临床治疗耐药肺炎克雷伯菌提供一些新思路。

关键词: 肺炎克雷伯菌, 外排泵, 耐药机制, 外排泵抑制剂

The progress on drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* caused by efflux pump

WANG Yu-Li JIANG Xin-Ru ZHENG Yue-Juan*

(Department of Immunology & Microbiology, School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* is an important opportunistic pathogen and the rate of its nosocomial infection rises continuously. It has brought difficulties to therapy. Efflux pumps' overexpression has been recently recognized as one of the most important mechanisms of drug resistance displayed by *K. pneumoniae*. The most important developments were introduced in this review, including the latest progress on the drug resistant profile of *K. pneumoniae* caused by efflux pumps, and the molecular structure and genetic regulation of efflux pumps. The inhibitors of efflux pumps and the roles of traditional Chinese medicine on drug resistant *K. pneumoniae* were also addressed in this review to provide some guides to treat infectious diseases caused by drug resistant pathogens.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), Efflux pump, Drug resistance, Efflux pump inhibitors

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81471537, 31100619); Sponsored by Shanghai Rising-Star Program (No. 14QA1403400); Special Scientific Research Project of "Innovative Ability Training" of Graduate Students in Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (No. 2015YCX01)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-21-51322150; E-mail: 13641776412@163.com

Received: November 28, 2015; **Accepted:** March 01, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 10, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81471537, 31100619); 上海市青年科技启明星计划(No. 14QA1403400); 上海中医药大学研究生“创新能力培养”专项科研项目(No. 2015YCX01)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-21-51322150; E-mail: 13641776412@163.com

收稿日期: 2015-11-28; **接受日期:** 2016-03-01; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-10

肺炎克雷伯菌是导致医院内感染的重要致病菌^[1]。2012 中国 CHINET 耐药监测显示以肺炎克雷伯菌为主的克雷伯菌属耐药菌占革兰阴性耐药菌的 18.49%^[2]。该菌一般感染免疫系统受损的病人,继而导致严重的感染,如伤口感染、尿路感染、肺炎、败血症和脑膜炎等^[3-4]。近年来,随着激素、免疫抑制剂和广谱抗生素的广泛使用,肺炎克雷伯菌的耐药情况更加严峻^[5]。肺炎克雷伯菌的耐药机制包括:产生灭活抗菌药物的酶(如碳青霉烯酶)、改变抗菌药物作用的靶标、阻碍抗菌药物的渗透、促进外排泵系统的表达等^[6]。其中,外排泵系统的表达是该菌产生耐药性的重要机制^[7]。细菌的外排泵系统包括:耐药结节化细胞分化家族(Resistance-nodulation-division family, RND)、ATP 结合盒家族(ATP-binding cassette family, ABC)、主要易化子超家族(Major facilitator superfamily, MFS)、小多重耐药家族(Small multidrug resistance family, SMR)和多药及毒性化合物外排家族(Multidrug and toxic compound extrusion family, MATE)^[8]。本文将对外排泵介导肺炎克雷伯菌的耐药现状、外排泵的分子结构和基因水平的调节及主要外排泵抑制剂的研究进展做一简要综述。

1 外排泵介导肺炎克雷伯菌耐药的现状

同一株细菌可存在多种外排泵,外排不同种类的抗生素如内酰胺类、喹诺酮类和大环内酯类等,不同外排泵的外排强度不同导致细菌对多种抗生素产生耐药。王亮等^[9]发现在肺炎克雷伯菌中 AcrAB-TolC 外排泵对喹诺酮类抗生素环丙沙星的外排强度最大,由此导致的耐药率达 33.8%。Pakzad 等^[10]在烧伤病人身上分离出 52 株肺炎克雷伯菌,由于外排泵 AcrAB 的作用,导致 40 株肺炎克雷伯菌对环丙沙星耐药,耐药率达 76.9%。Yuan 等^[11]研究发现肺炎克雷伯菌对环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别为 66.9% 和 50.7%,且所有耐药肺炎克雷伯菌株均携带外排泵基因。刘军等^[12]的研究则表明肺炎克雷伯菌对阿奇霉素、四环素和氯霉素等产生耐药

性与携带 AcrAB-TolC 外排泵密切相关,其中对内酰胺类抗生素头孢他啶的耐药率最高,达 76.82%,对其他抗生素如阿奇霉素、四环素和氯霉素的耐药率均超过 50%。蒋燕群等^[13]也发现对头孢他啶耐药的肺炎克雷伯菌株中,外排泵基因转录水平增高的菌株占样本总量的 51.9%,说明因外排作用导致的耐药所占比重很大。

2 常见的外排泵系统及其结构

目前,在肺炎克雷伯菌中已经发现的外排泵有 RND 家族的 AcrAB-TolC 和 KexD, MFS 家族的 KmrA、KpnGH 和 KdeA,以及 SMR 家族的 KpnEF。

2.1 耐药结节化细胞分化家族(Resistance-nodulation-division family, RND)

RND 外排泵是以细胞膜两侧的质子差作为驱动力,将药物排出体外。它由 3 个蛋白结构域构成,分别是内膜蛋白、膜融合蛋白和外膜蛋白。外排泵 AcrAB-TolC 的检出率最高,其中, AcrA 是膜融合蛋白,横跨细胞膜,连接内膜蛋白 AcrB 和外膜蛋白 TolC,使之形成一个贯穿细胞膜的密封通道,将药物由胞内运输到胞外^[14]。内膜蛋白 AcrB 的主要作用是摄取并转运特异的底物,外排多种抗生素如喹诺酮类、大环内酯类和内酰胺类等,还能整个 AcrAB-TolC 泵提供能量^[15]。外膜蛋白 TolC 的序列相对保守,可与不同的膜融合蛋白结合,形成多种外排泵的外膜通道^[16]。当 TolC 基因缺失时,外排作用减弱,细菌对药物的敏感性也随之显著增加^[17]。有研究表明,移除肺炎克雷伯菌的 AcrAB-TolC 泵后,细菌的耐药性、适应性以及毒力都受到影响^[18]。肺炎克雷伯菌对喹诺酮类药物高度耐药和对碳青霉烯类药物的敏感性下降都与外排泵 AcrAB-TolC 有关^[19]。Ogawa 等^[20]发现外排泵 KexD 的氨基酸序列同 AcrAB-TolC 外排泵家族成员的内膜蛋白 AcrB 高度相似,也可以连接膜融合蛋白 AcrA,并利用外膜蛋白 TolC 将各种抗生素(如青霉素、罗他霉素等)泵出菌体。

2.2 主要易化子超家族 (Major facilitator superfamily, MFS)

MFS外排泵家族是由编码跨膜结构的基因重复表达而形成的多次跨膜转运蛋白复合物(通常为12或14次跨膜)。质子交换为MFS家族转运底物提供能量,外排底物包括多种抗生素,如四环素类、氯霉素类和氨基糖苷类。*kmrA*编码KmrA外排泵,Ogawa等将该基因在肺炎克雷伯菌株MKG78578中高水平表达,工程菌株可外排红霉素和四环素等多种抗生素,但该基因并不因特异性底物的存在而增加表达量^[21]。*kpnG*和*kpnH*编码KpnGH外排泵,Srinivasan等发现插入失活的*kpnGH*基因片段,可以增加肺炎克雷伯菌对抗生素(如阿奇霉素、头孢他啶、环丙沙星、厄他培南、多粘菌素B、链霉素等)的敏感性^[22]。耐药肺炎克雷伯菌株MGH78578的特定基因*kdeA*编码KdeA外排泵,该工程菌株可外排氯霉素和卡那霉素等多种抗生素,但KdeA外排泵在肺炎克雷伯菌株ATCC10031中的外排作用不明显^[23]。

2.3 小多重耐药家族 (Small multidrug resistance family, SMR)

SMR 家族成员通常由 110 个左右的氨基酸残基组成,一般由 4 个跨膜结构域和一个 α 螺旋组成,是分子量最小的一类外排泵。SMR 发挥外排功能需要质子交换和构象改变,即氨基酸序列较保守的跨膜结构域与底物结合区协同作用,共同运输药物等小分子。Srinivasan 等用特定外排基因 *kpnE* 和 *kpnF* 编码外排泵 KpnEF, 其在肺炎克雷伯菌株 NTUH-K2044 中能识别多种底物,如头孢曲松、粘菌素、红霉素、四环素和链霉素等。当 *kpnEF* 基因被敲除时, KpnEF 泵对上述抗生素的敏感性降低。在同样的抗生素环境中,当使用外排泵抑制剂氯氮苯胍(CCCP)后,细菌萎缩及死亡情况明显增加,该现象在临床分离株中也得到验证^[24]。

3 主要外排泵的基因水平调节及外排泵抑制剂

3.1 主要外排泵的基因水平调节

关于外排泵基因水平调节的研究开展得不多,

并且主要集中在AcrAB-TolC泵。AcrAB-TolC由基因*acrA*和*acrB*编码构成,它们上游具有共同的操纵子序列marRAB, marRAB由启动子*marO*、阻遏基因*marR*、和转录激活基因*marA*、*marB*组成。

正向调控AcrAB-TolC外排泵的基因有*soxS*、*marA*、*ramA*和*rob*等。*soxS*可以编码操纵子marRAB,促进AcrAB和TolC的表达,从而提高对抗生素的外排水平。*marA*则能特异性结合启动子*marO*,增强RNA聚合酶与启动子的亲合力,提高转录起始的速率,增加AcrA和AcrB的表达^[25]。*ramA*结合位点位于AcrAB基因的上游,促进AcrAB的表达从而提高肺炎克雷伯菌的外排抗生素的能力^[26-27],如喹诺酮类^[28]、 β 内酰胺类^[29]以及甘氨酸四环素类(替加环素)^[30]。*rob*的过表达会促进*marRAB*等8个目的基因表达,从而激活内膜蛋白AcrB,导致AcrAB-TolC的外排作用亢进^[31]。

负向调控AcrAB-TolC外排泵的基因有*acrR*和*marR*。其中, AcrR由阻遏基因*acrR*编码,与AcrAB启动子上的反向重复序列(24个碱基对组成)结合,抑制AcrAB的表达。*marR*是操纵子marRAB的转录阻遏基因,与上游启动子*marO*结合后,负向调节marRAB的转录,从而抑制AcrAB的表达。

另外, de Majumdar 等发现基因 *rara*, *rara* 也可以调节 *acrAB*, 进而提高 AcrAB 外排泵的表达^[32]。

3.2 外排泵抑制剂

外排泵过度表达是细菌产生耐药的重要原因和方式,因此,外排泵被认为是治疗耐药菌的潜在作用靶点。国内外研究已经证实有效并展开深入研究的外排泵抑制剂有邻氨基苯甲酸的衍生物(Tariquidar, XR9576), 三 酸 盐 (Zosuquidar, LY335979), 维拉帕米和氯氮苯胍(CCCP)等。虽然某些抑制剂已经进入临床试验阶段,但是大部分抑制剂仍停留在临床前基础研究阶段(药理学研究和毒理学研究)。除了具有抑制剂功能的临床药物如维拉帕米、利血平等,目前还没有成功应用于临床的外排泵抑制剂。究其原因,主要是因为这些抑制剂

的使用剂量较大,副作用大,对机体存在毒性伤害。目前,已发现多种植物(传统中药占有相当大的比重)来源的成分有抑制细菌产生耐药和消除耐药性等作用,现在对植物来源的外排泵抑制剂的相关研究已经逐步开展起来。下面根据不同的作用机制来介绍几种外排泵抑制剂。

3.2.1 干扰外排泵组装的抑制剂: 格罗泊霉素(Globomycin)是来自链霉菌的一种环肽抗生素,能够抑制膜融合蛋白AcrA的信号肽酶LspA,而LspA是AcrA的一个剪切位点,该位点被抑制后会影响到AcrA的成熟,干扰AcrAB-TolC外排泵的组装,减少药物的外排。格罗泊霉素仅仅在RND家族的外排泵成员中发挥抑制作用,这限制了它的使用范围^[33]。

3.2.2 阻断外排泵能量来源的抑制剂: 聚乙二醇1000维生素E琥珀酸酯(TPGSs1000)通过降低ATP的水解能力,减少外排泵的能量来源,发挥对P-gp泵(ATP结合盒家族,ATP-binding cassette family,ABC家族的重要成员)的抑制作用,进而减少药物的外排,目前仅停留在临床前基础研究阶段^[34];而邻氨基苯甲酸的衍生物(Tariquidar, XR9576)是特异性、非竞争性的结合在P-gp的ATP结合位点上,通过抑制ATP酶活性而减少ATP的水解^[35-37]。从Tariquidar的临床试验效果来看,它可持续发挥对外排泵的抑制作用,而且机体对其耐受性较强,已经通过一期临床安全性评价^[38-39]。外排泵抑制剂可以与抗生素发挥协同作用,增加耐药菌对抗生素的敏感性^[40]。三酸盐(Zosuquidar, LY335979)是喹啉类衍生物,兼具高效性和高选择性,在治疗老年急性髓性白血病临床试验中具有减少药物外排,延长生存期的作用^[41],且其与阿霉素联合治疗肿瘤的一期临床试验已经完成^[42]。另外,一些外排泵抑制剂也可以通过抑制ATP盒的活性^[43]或者直接消耗ATP^[44],来减少P-gp泵的能量来源。

3.2.3 阻碍底物通过外排通道的抑制剂: 维拉帕米是罂粟碱的衍生物,作为钙离子通道阻滞剂,临床作为冠脉扩张剂,用于治疗高血压、心绞痛等疾病。

研究显示其可用于肺炎克雷伯菌耐药的逆转,当红霉素中加入维拉帕米后,其最小抑菌浓度减小到原来的 $1/8$ ^[45],但在作为外排泵抑制剂使用时所需剂量较高,容易发生心血管系统的不良反应,从而限制了其临床应用。Cholkar等研究发现消退素E1衍生物(RX-10045)可以作为P-gp的底物,同抗菌药物竞争性结合底物结合位点而抑制药物的外排,目前处在临床前基础研究阶段^[46]。Fadli等从摩洛哥百里香(*Thymus maroccanus*)中提取了一种精油,能逆转包括肺炎克雷伯菌在内的部分革兰氏阴性菌的耐药性,并提示该精油能够阻塞菌体的外排泵通道,减少药物的外排^[47]。最近有研究发现其具有抗真菌作用^[48],该精油临床应用的价值较高,尚待进一步的研究。

4 传统中药开辟应对外排泵引起的细菌耐药的新途径

传统中药汉防己具有解热、镇痛和抗炎等多种功能,其有效成分粉防己碱可以竞争性结合或者遮掩外排泵的底物结合位点,从而抑制AcrAB-TolC的外排作用^[48]。连翘脂苷B也可以抑制肺炎克雷伯菌外排泵的活性^[49]。另外,由于肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌同属肠杆菌科细菌,且高度同源,治疗外排泵引发的耐药性大肠埃希菌的中药及有效成分也可用于治疗外排泵引发的肺炎克雷伯菌耐药提供参考,比如:青蒿琥酯(Artesunate, AS)在浓度为512 mg/L时可降低大肠埃希菌外排泵相关基因 $acrA$ 、 $acrB$ 的表达水平,且与氨苄西林联用时明显减少AcrAB-TolC上游正向调控基因 $soxS$ 和 $marA$ 的表达量进而抑制外排泵AcrAB-TolC的表达^[50]。中药黄连在亚抑菌浓度下可改变外排基因 $acrA$ 的部分碱基,从而影响 $acrA$ 基因mRNA的表达、减少大肠埃希菌对四环素类、氯霉素类和喹诺酮类抗生素的耐药^[51]。

传统中药的作用不仅仅在于杀菌、抑菌,还具有“调节整体、改善局部”的特色与优势,通过调节神经内分泌免疫三大调节系统中的激素、细胞因子

来发挥整体的免疫效应^[52-54]。在细菌感染过程中, 从调控机体免疫反应角度入手, 绕开一味地用抗生素给病原体施加筛选压力, 最终达到抑制过度炎症反应、提高机体免疫力、促进免疫细胞对病原体的吞噬、抗原提呈, 并发挥后续的适应性免疫反应, 以达到清除病原体的目的。比如, 麻黄附子细辛汤联合抗生素在抗肺炎克雷伯菌体外实验中效果明显^[55]; 扶正颗粒在正常小鼠及免疫抑制小鼠的肺炎克雷伯菌感染中均具有良好的防治作用, 这一现象与其提高机体免疫能力有关^[56]。该治疗策略既可以减缓临床用药对耐药菌的筛选压力, 又能为广谱耐药菌感染的患者提供新的治疗方案和思路。

5 展望

(1) 外排泵引起肺炎克雷伯菌的耐药现状日趋严重, 同时外排泵抑制剂并未真正在临床展开应用。针对性地开发结构稳定、无明显细胞毒性的外排泵抑制剂, 有利于恢复或增强抗生素的活性, 有望联合抗生素治疗外排泵引发的肺炎克雷伯菌感染^[57-58]。(2) 从纳米粒子、纳米胶束和脂质体等层面研发抗生素新剂型, 可以规避药物外排作用、提高药物的敏感性、减少给药量和降低不良反应等。(3) 加大对调节机体免疫反应的传统中药的研发, 发挥其增加机体免疫或抗炎等作用, 绕开病原体的耐药性问题, 为治疗外排泵引起的耐药菌提供可替代方案。

参考文献

- [1] Wen XM, Ren N, Xu XH, et al. Distribution and antibacterial resistance of nosocomial infection pathogens from national nosocomial infection surveillance system[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2002, 12(4): 241-244 (in Chinese)
文细毛, 任南, 徐秀华, 等. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(4): 241-244
- [2] Wang F, Zhu DM, Hu FP, et al. 2012 CHINET surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2013, 13(5): 321-330 (in Chinese)
汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-330
- [3] Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 30(5): 385-389
- [4] Décré D, Verdet C, Emirian A, et al. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(8): 3012-3014
- [5] Feng LH, Xu XL, Liu JY, et al. Distribution and drug resistance of pathogenic bacteria strains in nosocomial infection[J]. Contemporary Medicine, 2015, 21(3): 136-137 (in Chinese)
冯琳涵, 徐修礼, 刘家云, 等. 医院内感染病原菌的分布及耐药状况分析[J]. 当代医学, 2015, 21(3): 136-137
- [6] Lin HS, Zhang W, Li GM. Research progress on the resistant mechanism for *Klebsiella pneumoniae*[J]. Medical Innovation of China, 2014, 11(12): 151-154 (in Chinese)
林华胜, 张薇, 李国明. 肺炎克雷伯菌耐药机制的研究进展[J]. 中国医学创新, 2014, 11(12): 151-154
- [7] Zhong HQ, Zhang S, Pan H, et al. Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2013, 14(9): 837-843
- [8] Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, et al. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 1999, 1(1): 107-125
- [9] Wang L, Zhou Y, Li DD, et al. Study on the reversal effect of efflux pump inhibitors on drug resistance of fluoroquinolones-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Modern Preventive Medicine, 2014, 41(2): 290-292, 299 (in Chinese)
王亮, 周易, 李冬冬, 等. 泵抑制剂对耐氟喹诺酮类肺炎克雷伯菌耐药逆转作用的研究[J]. 现代预防医学, 2014, 41(2): 290-292, 299
- [10] Pakzad I, Zayyen Karin M, Taherikalani M, et al. Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients[J]. GMS Hygiene and Infection Control, 2013, 8(2): Doc 15
- [11] Yuan JY, Xu XG, Guo QL, et al. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(7): 1655-1659
- [12] Liu J, Zhao ZG, Zeng T, et al. Study of the AcrAB-TolC efflux pump system and resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2013, 8(1): 35-38 (in Chinese)
刘军, 赵祖国, 曾涛, 等. 主动外排系统 AcrAB-TolC 与肺炎克雷伯菌耐药性关系研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(1): 35-38
- [13] Jiang YQ, Li L, Qian YW. Relationship between the level of efflux pump in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and drug resistance[J]. Laboratory Medicine, 2011, 26(1): 51-55 (in Chinese)
蒋燕群, 李俐, 钱燕斐. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌外排泵转录水平与耐药的关系[J]. 检验医学, 2011, 26(1): 51-55
- [14] Zgurskaya HI, Nikaido H. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 285(1): 409-420
- [15] Murakami S, Nakshima R, Yamashita E, et al. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB[J]. Nature, 2002, 419(6907): 587-593
- [16] Koronakis V, Shaff A, Koronakis E, et al. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export[J]. Nature, 2000, 405(6789): 914-919
- [17] Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, et al. Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to β -lactams[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(9): 3030-3033
- [18] Pérez A, Poza M, Fernández A, et al. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(4): 2084-2090
- [19] Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, et al. *Klebsiella*

- pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(1): 177-183
- [20] Ogawa W, Onishi M, Ni RT, et al. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Gene, 2012, 498(2): 177-182
- [21] Ogawa W, Koterawasa M, Kuroda T, et al. KmrA multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(3): 550-553
- [22] Srinivasan VB, Singh BB, Priyadarshi N, et al. Role of novel multidrug efflux pump involved in drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96288
- [23] Ping Y, Ogawa W, Kuroda T, et al. Gene cloning and characterization of kdea, a multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(10): 1962-1964
- [24] Srinivasan VB, Rajamohan G, KpnEF, a New member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(9): 4449-4462
- [25] Wall ME, Markowitz DA, Rosner JL, et al. Model of transcriptional activation by MarA in *Escherichia coli*[J]. PLoS Computational Biology, 2009, 5(12): e1000614
- [26] Hong J, Xia ZY, Chen X, et al. Effect on ramA of AcrAB Efflux pump in quinolones-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(3): 253-256 (in Chinese)
洪捷, 夏祖耀, 陈茜, 等. AcrAB 外排泵 ramA 对肺炎克雷伯菌耐喹诺酮类药物的影响[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(3): 253-256
- [27] De Majumdar S, Yu J, Fookes M, et al. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation[J]. PLoS Pathogen, 2015, 11(1): e1004627
- [28] Schneiders T, Amyes SGB, Levy SB. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(9): 2831-2837
- [29] Pages JM, Lavigne JP, Leflon-Guibout V, et al. Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4817
- [30] He F, Fu Y, Chen Q, et al. Tigecycline susceptibility and the role of efflux pumps in tigecycline resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119064
- [31] Cheng YQ, Qi W. The progress on the regulation mechanism of the AcrAB-TolC efflux pump in the Enterobacteriaceae[J]. Shandong Medical Journal, 2015, 55(21): 95-97 (in Chinese)
程玉谦, 祁伟. 肠杆菌科细菌外排泵 AcrAB-TolC 调控机制的研究进展[J]. 山东医药, 2015, 55(21): 95-97
- [32] de Majumdar S, Veleba M, Finn S, et al. Elucidating the regulon of multidrug resistance regulator RarA in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(4): 1603-1609
- [33] Khandavilli S, Homer KA, Yuste J, et al. Maturation of *Streptococcus pneumoniae* lipoproteins by a type II signal peptidase is required for ABC transporter function and full virulence[J]. Molecular Microbiology, 2008, 67(3): 541-557
- [34] Sun JJ, Deng ZQ, Yan AX. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014 453(2): 254-267
- [35] Loo TW, Clarke DM. Tariquidar inhibits P-glycoprotein drug efflux but activates ATPase activity by blocking transition to an open conformation[J]. Biochemical Pharmacology, 2014, 92(4): 558-566
- [36] Li M, Si LQ, Pan HP, et al. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 403(1/2): 37-45
- [37] Kannan P, Telu S, Shukla S, et al. The "Specific" P-glycoprotein inhibitor tariquidar is also a substrate and an inhibitor for breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2011, 2(2): 82-89
- [38] Kelly RJ, Draper D, Chen CC, et al. A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2011, 17(3): 569-80
- [39] Bauer M, Zeitlinger M, Todorut D, et al. Pharmacokinetics of single ascending doses of the P-glycoprotein inhibitor tariquidar in healthy subjects[J]. Pharmacology, 2013, 91(1/2): 12-19
- [40] Venter H, Mowla R, Ohene-Agyei T, et al. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 28(6): 377
- [41] Cripe LD, Uno H, Paietta EM, et al. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999[J]. Blood, 2010, 116(20): 4077-4085
- [42] Rubin EH, de Alwis DP, Pouliquen I, et al. A phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, Zosuquidar.3HCL trihydrochloride (LY335979), administered orally in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancies[J]. Clinical Cancer Research, 2002, 8(12): 3710-3717
- [43] Föger F, Hoyer H, Kafedjiiski K, et al. *In vivo* comparison of various polymeric and low molecular mass inhibitors of intestinal P-glycoprotein[J]. Biomaterials, 2006, 27(34): 5855-5860
- [44] D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57(15): 2147-2162
- [45] Xu N, Su XZ, Tao XX, et al. Observation on the application of two efflux pump inhibitors in the investigation of resistance of *Klebsiella pneumoniae* to antibiotics[J]. China Tropical Medicine, 2006, 6(8): 1352-1353 (in Chinese)
许宁, 苏显中, 陶秀祥, 等. 外排泵抑制剂用于肺炎克雷伯菌耐药逆转的研究[J]. 中国热带医学, 2006, 6(8): 1352-1353
- [46] Cholkar K, Trinh HM, Vadlapudi AD, et al. Interaction studies of resolvin E1 analog (RX-10045) with efflux transporters[J]. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 2015, 31(4): 248-255
- [47] Fadli M, Chevalier J, Saad A, et al. Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011, 38(4): 325-330
- [48] Pagès JM, Masi M, Barbe J, et al. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria[J]. Trends in Molecular Medicine, 2005, 11(8): 382-389
- [49] Zhong HQ, Zhang S, Cai T. Influence of forsythoside B on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2013, 32(4): 303-306 (in Chinese)
钟海琴, 张顺, 蔡挺. 连翘酯苷 B 对肺炎克雷伯菌外排泵活性的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(4): 303-306
- [50] Li B, Yao Q, Pan XC, et al. Artesunate enhances the antibacterial effect of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(4): 769-777
- [51] Ren LL. Study on the influence of the Chinese traditional medicine LN on drug resistance gene AcrA of *Escherichia coli*[D]. Yanbian: Master's Thesis of Yanbian University, 2010 (in Chinese)
任玲玲. 中药“连黄”对大肠埃希菌耐药基因 AcrA 影响的初

- 步研究[D]. 延边: 延边大学硕士学位论文, 2010
- [52] Shen ZY. An outstanding feature of traditional Chinese medicine: improving local pathology by regulating holistic function[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2006, 26(12): 1122-1125 (in Chinese)
沈自尹. 中医药的一大特色——调节整体改善局部[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(12): 1122-1125
- [53] Zheng YJ, Guo ZY, He WG, et al. Ephedrine hydrochloride protects mice from LPS challenge by promoting IL-10 secretion and inhibiting proinflammatory[J]. International Immunopharmacology, 2012, 13(1): 46-53
- [54] Zheng YJ, Yang Y, Li YH, et al. Ephedrine hydrochloride inhibits PGN-induced inflammatory responses by promoting IL-10 production and decreasing proinflammatory cytokine secretion via the PI3K/Akt/GSK3 β pathway[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2013, 10(4): 330-337
- [55] Yang L, Xie XF, Hu R. The research on the mechanism of Mahuangfuzixixin decoction combined with antibiotics *in vitro* against *Klebsiella pneumoniae*[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2015, 11(9): 18-20 (in Chinese)
杨露, 谢晓芳, 胡荣. 麻黄附子细辛汤联合抗生素体外抗肺炎克雷伯菌作用研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(9): 18-20
- [56] Cheng JY, Chai JY, Chai RH. Experiment study on the antibacterial action of Fuzheng granules[J]. Traditional Chinese Medicinal Research, 2008, 21(1): 22-25 (in Chinese)
程嘉艺, 柴纪严, 柴瑞华. 扶正颗粒抗菌作用的实验研究[J]. 中医研究, 2008, 21(1): 22-25
- [57] Ruggerone P, Murakami S, Pos KM, et al. RND efflux pumps: structural information translated into function and inhibition mechanisms[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2013, 13(24): 3079-3100
- [58] Opperman TJ, Nguyen ST. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition[J]. Front Microbiology, 2015, 6: 421

科技信息摘录

我国科学家解析出 NPC1 蛋白结构

近日, 清华大学颜宁课题组与中国疾控中心、中科院微生物组高福院士课题组合作的一项最新成果, 在世界上首次解析出 NPC1 蛋白的清晰结构, 并初步揭示了它的工作过程, 从而为干预、治疗罕见遗传疾病“尼曼-皮克病”和埃博拉病毒打开了新大门。

颜宁教授过去 9 年一直针对胆固醇代谢调控通路进行系统的结构生物学与生物化学研究, 高福院士一直从事包括埃博拉病毒在内的重大传染病相关病毒入侵机制的结构生物学研究。他们合作的研究论文《NPC1 蛋白介导胆固醇转运和埃博拉病毒入侵的分子机制》, 发表在 5 月 26 日的《细胞》杂志上。该论文在国际学术界首次报道了人源胆固醇转运蛋白 NPC1 的 4.4 埃分辨率冷冻电镜结构, 并分析探讨了 NPC1 和 NPC2 两个蛋白协作介导细胞内胆固醇转运的分子机制, 同时为理解 NPC1 介导埃博拉病毒入侵的分子机制提供了分子基础。

据悉, “尼曼-皮克病”是一类因为胆固醇、鞘磷脂等脂类代谢失常而导致的罕见遗传疾病, 目前还没有有效的治疗手段。NPC1 异常是 C 型“尼曼-皮克病”的主要致病因素。过去近 20 年的遗传和生化实验发现, NPC1 蛋白是胆固醇在人体细胞内不可或缺的搬运工。如果 NPC1 发生突变, 会导致胆固醇在溶酶体中的异常堆积, 从而可能导致病人肝脏、肾脏、脾脏甚至脑部的脂类过量积累, 造成这些器官发生病变, 并可能致死。而要解开 NPC1 突变会使胆固醇不能正常代谢的谜团, 获取 NPC1 的清晰结构是关键一步。

据介绍, NPC1 是一个由 1 278 个氨基酸组成并含有 13 次跨膜螺旋的膜蛋白。由于它的分子量过小, 而且十分不稳定, 利用电镜对它进行结构生物学研究是一个挑战。在研究过程中, 颜宁研究组开发了一种新型的“随机相位 3D 分类”电镜数据处理方法, 从而将这一并不十分稳定的单体膜蛋白结构解析到 4.4 埃, 并且在结构的基础上通过生化分析初步揭示 NPC1 和 NPC2 相互识别转运胆固醇的分子机制。此外, NPC1 还是人体细胞内的埃博拉病毒受体, 在埃博拉病毒的入侵过程中发挥着不可替代的功能。颜宁课题组与高福课题组合作, 解析出 NPC1 与 Gp1 结合体分辨率为 6.6 埃的冷冻电镜结构, 从而为进一步研究 NPC1 介导的埃博拉病毒入侵机制和如何通过破坏这一识别界面进行干预提供了分子基础。

——摘自《科学网》2016-05-30

<http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/20165301012963839667.shtm>