

细菌的非特异性多重药物抗性

唐欣昀

(安徽农业大学生物工程系 合肥 230036)

抗生素的使用已有 50 多年历史。随着抗生素的大量使用,微生物已普遍对其产生抗性。已知的细菌特异性抗性机理为:酶解药物、酶修饰药物使之失活,突变改变药物靶的构象。这些机理的遗传基础分别是抗性质粒上的基因或染色体上突变的基因。近几十年来,人们使用合成或半合成的药物来防止细菌酶类对药物的降解和修饰作用。但随这种策略的成功,细菌中另一类固有的非特异性抗性就日益明显,成为临床上又一重要问题。这类抗性中最为重要的是作用底物广泛的多重抗性泵 (multidrug resistance pumps, MDRs),又称外向型主动运输蛋白 (efflux transporters)。MDR 现象最早在动物肿瘤抗性细胞中发现,这些细胞表面有一种 P-糖蛋白 (P-170),可以主动地把很多结构上不相同的药物泵出细胞,产生对这些药物的多重抗性,使化疗失败^[1]。自 1989 年首次报道了葡萄球菌中的 MDR 现象后^[2],在不同细菌中都发现了 MDR,其分子遗传学机理也得到初步阐明。本文介绍细菌中的 MDR 及其机理。

1 MDR 的类别

1.1 主要促进运输蛋白族 (major facilitator family MF)

大多数细菌 MDR 泵属于这一类。这一族实际上是一些细胞膜上的移位酶,包括 *Escherichia coli* 中的阿拉伯糖 / H^+ 同向运输蛋白 (symporter),真核细胞中的葡萄糖促进运输蛋白 (facilitator),细菌中的四环素 / H^+ 反向运输蛋白 (antiporter)^[3]。

第一个发现的 MDR 是 QacA,存在抗季铵化合物 (QAC) 的 *Staphylococcus* 中,是一种细胞膜上的移位酶,向胞外泵出溴化乙锭 (EB) 及其他药物^[2],由质子浓度提供动力,实际上是一种药物 / H^+ 反向运输蛋白。QacA 的底物可能是一些自然存在的抗生素。QacA 有 14 个跨膜 α 螺旋折叠,其编码基因在质粒上。*E. coli* DNAemr AB 位点上编码 2 个蛋白质,导致对氧化磷酸

化解偶联剂 *m*-chloromethoxycarbonyl cyanide phenyl hydrazone (CCCP)、thiactomycin (TLM)、蔡啉酮酸和其他药物的抗性^[3]。EmrB 与 QacA 同源,是一种跨膜蛋白,在 EmrA 的协助下把药物泵出胞外 (图 1)。EmrA 与细菌中很多向外分泌多肽类毒物和蛋白酶的运输蛋白同源,如与 *Bordetella pertussis* (百日咳博德氏菌) 的 CyaD (分泌 cyclolysin), *E. coli* 的 HlyD (向外运输溶血素 HLY) 和 CvaA (分泌大肠菌素 V) 不同程度相似。这一类蛋白都有相似结构:位于细胞质中的一小段 N-末端区域,一个跨膜的疏水 α -螺旋折叠,和一个大的胞周空间亲水区域,其功能显然是在内、外膜之间形成一个连续通道 (“连接”蛋白),以便把药物泵出胞外。因为 G^- 细菌外膜对疏水性化合物是不可渗透的,这样的结构将可有效地阻止泵出的药物再渗进细胞。MF 族的蛋白质都带有一个特征性的药物泵出区域 (drug extrusion, DE): GXXGPXXGG (G: 甘氨酸, P: 脯氨酸, X: 任意氨基酸)^[4]。*E. coli* 中的 MF 族 MDR 还有 EmrD 和 Bcr 蛋白^[3]。

Neyfakh 等^[5]用逐步增加诺丹明 6G 浓度的方法,在 *Bacillus subtilis* 中发现了 bmr 基因。诺丹明导致染色体上 bmr 扩增,bmr 过量表达使细胞产生抗性。这种机理以前只在动物肿瘤抗性细胞中发现。Bmr 蛋白与 *S. aureus* 的 NorA 高度相似,后者把氟喹酮等药物排出细胞^[6]。本文作者在 *B. subtilis* 中克隆了与 bmr 不同源的可产生多重抗性的另一 DNA 片断 (待发表)。可见在 *B. subtilis* 中 MDR 可能也是多个。

1.2 Smr 族 (*Staphylococcus* multidrug resistance family)

S. aureus 中产生对季铵化合物抗性的 MDR 除了 QacA,还有 QacC。两者功能相同,但结构不同。QacC 只有 107 个氨基酸,具有 4 个跨膜区域,在质子浓度驱

1997-01-20 收稿

动下泵出很多碱性染料,因而不属于MF族。QacC被重新命名为 $\text{Smr}^{[7]}$ 。一个寄主广泛型质粒R751携带了易位子Tn402,其上编码抗三甲氧苄二氢嘧啶的二氢叶酸还原酶和功能、结构上与 Smr 相同的 $\text{QacE}^{[3]}$ 。由于R751寄主广泛,很容易在种间转移, QacE 可能也随其广泛分布于不同菌中。*E. coli*中 EmrE (曾命名为 MurC 和 EB^+)与 Smr 同源^[8],向胞外泵出一些亲脂阳离子和四苯磷(TPP^+)(图1)。而 TPP^+ 常用于测定细菌膜电位,

EmrE 的发现使得需要重新评价这种方法的可靠性。

1.3 RND族(resistance, nodulation and deviation family)

早在60年代就发现*E. coli*对可啉类(ACR)的抗性,其编码基因在染色体 arc 位点。 acr 突变使细胞对很多化合物敏感。 acr 编码两个蛋白质,与*Alcaligenes eutrophus*(真养产碱杆菌)泵出有毒金属的 CzcA 和 CnrA 蛋白质同源^[9,10]。 AcrB 具有泵出活性, AcrA 与

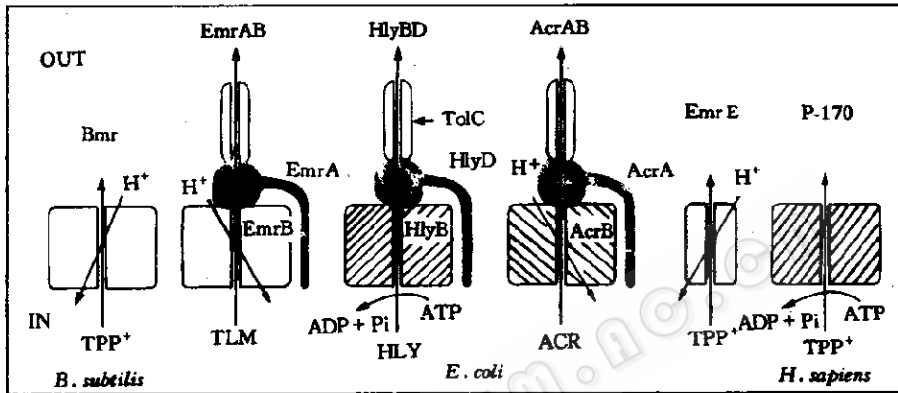


图1^[3] 典型MDR的构象

Bmr 泵出 TPP^+ 和其他两性阳离子。 EmrAB 泵出较疏水的药物。 EmrB 和 Bmr 同源。 EmrAB 和 AcrAB 构象是据 HLY 运输蛋白 HlyBD 的结构推测。 HlyB 是膜上移位酶, HlyD 是“连接”蛋白, TolC 是外膜孔隙蛋白,三者形成一个穿越内、外膜的通道。 EmrAB 和 AcrAB 可能和 TolC 或另外的孔隙蛋白连接。 EmrE 是较小的MDR,但可能以多聚体形式存在。 P-170 是人类MDRI泵,与 HlyB 同源

EmrA 同源,是“连接”蛋白,在内、外膜之间形成通道,把药物泵出外膜。*E. coli*中另一位点编码 AcrEF ,与 AcrAB 高度同源。*Pseudomonas aeruginosa*(绿脓杆菌)中 MexAB (ORFAB)与 AcrAB 、 AcrEF 高度同源^[10],可以泵出多种药物。 MexB 位于细胞膜上, MexA 把 MexB 和另一外膜蛋白 OprK 连接起来,以把药物泵出胞外。以前认为 AcrEF (EnvCD)与细胞分裂时横隔的形成有关,其与 MexAB 同源的事实使人推测 AcrEF 并不直接与横隔形成有关。与 MexB 同源的膜上蛋白质还有:*A. eutrophus*中阳离子泵出蛋白 CzcB 、*Actinobacillus actinomycetem comitans*(伴放线放线杆菌)中杀白细胞毒素分泌蛋白 LktD 、*Rhizobium meliloti*(苜蓿根瘤菌)与分泌结瘤因子有关的蛋白质 NodH 和 NodL 。而 OprK 与*B. pertussis*中分泌 cyclolysin 的 CayE 、*Erwinia* sp. 中分泌蛋白酶的 PrtF 、*R. leguminosarum*(豌豆根瘤菌)分泌结瘤因子的 NodT 等外膜蛋白相似。 MexAB 在

分泌 pyoverdine (载铁素(?) 萤黄色)及其代谢物的同时,可能由于结构上的相似,也把多种药物泵出胞外。

1.4 ABC族(ATP-binding cassette family)

该族第一个MDR是在肿瘤抗性细胞中发现,其共同特征是有2个ATP结合位点,12个跨膜折叠^[1,3,11]。*Streptomyces peucetius*(波赛链霉菌)合成道诺霉素(Dnr)和阿霉素(Dxr),其染色体 dnrAB 位点编码两种蛋白质^[12]。 DnrA 亲水,与肿瘤细胞中 P-170 糖蛋白相似; DnrB 疏水,是细胞膜上结合蛋白。 dnrAB 与合成 Dnr 和 Dxr 有关基因连锁,只有在合成 Dnr 和 Dxr 时才表达。 DnrA-DnrB 复合物水解ATP获得能量,把抗生素泵出胞外,以免对自身产生毒性。本族MDR还有*E. coli*溶血素(HLY)运输蛋白 HlyBD 、*S. fradiae*(弗氏链霉菌)抗泰乐菌素的 TlrC 和 TlrB 、*Halo-ferax volcanii*中 Dxr 抗性泵、*Lactococcus lactis*中的多重抗性泵、*S. antibioticus*(抗生链霉菌)抗竹桃霉素和红霉素的 OleC 、

Plasmodium falciparum (疟原虫) 抗氯奎的 Pfmdr 蛋白^[3,4,11,14,15,16]。

1.5 应激反应基因族(stress-response family)

E. coli 另一与多重抗性有关的操纵子 mar-RAB 定位在染色体 34min^[17]。MarR 蛋白与操纵基因 marO 结合, 阻碍 marAB 和其他基因的转录。MarA 与很多转录正调控子高度相似, 可促进其他抗性基因的转录。marA 高度表达的结果之一是激活一个远距离基因 micF, micF 的表达影响到 ompF mRNA 的稳定性, 部分降低外膜孔隙蛋白 OmpF 的合成, 增加外膜对药物的不可渗透性。不同研究人员用不同方法获得的 *E. coli* 与抗氧化剂突变有关基因群也定位在 34min。cfxB1 突变是 marR 基因内一段 285bpDNA 缺失, soxQ1 突变是 marR 内一个 GC→AT 的点突变, 多重抗性之一的 marR1 也是 marR 内一个点突变。这三个突变株内都无活性 MarR, 使得 marAB 可以转录, 激活其他抗抗生素和抗氧化剂基因。marRAB 还影响到另一抗氧化剂调节子 soxRS 的功能。MarA 和 SoxS (离该调节子最近的正调控蛋白) 结构相似, 因此 MarA 不仅导致细胞的多重抗性, 还激活其他氧化剂抗性基因群。类似的 soxRS 也影响到多重药物抗性基因。marRAB 调节范围很广, 最近发现在染色体 14、31.5、51.6min 各 1 个位点, 77min 2 个位点受其调控, 其中之一为编码脂蛋白的 slp 基因 (功能不详), 其他位点不与任何已知基因同源, 这些位点与多重抗性有一定关系^[18]。marAB 与 acrAB 表达也有关系^[19]。受 marRAB 调控的基因数量和性质目前还不清楚, 但 34min 上基因群与细胞对胞外不良条件 (温度、pH、氧化还原电位、各种药物等) 的反应密切相关, 这些基因在细菌中分布广泛, 使得多重抗性成为细菌中的普遍现象。

2 MDR 的分布

MF, RDN, Smr 族 MDR 广泛存在于 G⁺ 和 G⁻ 细菌中。同一种 MDR 可存在不同细菌中, 而同一种细菌中可能存在不同的 MDR 系统, 不同的 MDR 机理不同, 对抗性所起作用也不相等。Okusu 等^[19]在 *E. coli* K12 菌株中比较了 marRAB, emrAB 和 acrAB 等操纵子对抗性的影响, 发现 acrAB 对抗性起主要作用, 而 acrEF 在正常情况下并不表达。ABC 族 MDR 存在于人、鼠、疟原虫、真细菌和古细菌, 可见该族基因起源于古老的原始基因。

3 MDR 的起源

在 MF, RND, ABC 三族中都有一些抗生素生产菌分泌抗生素或抗自身合成的抗生素的基因, 这暗示着 MDR 基因可能起源于这些基因^[3,4,12]。另一方面各族 MDR 和族内其他移位酶、运输蛋白或特异性抗药物蛋白都不同程度相似^[4]。如果一种移位酶发生了某种突变, 使酶的构象发生改变, 导致底物运输方向改变, 从一种底物 / H⁺ 同向移位酶转变成异向移位酶, 就构成了一个 MF 族的抗性泵。或者突变对蛋白质构象不产生大的影响, 只是影响底物特异性, 使得特异性抗性蛋白变成了底物广泛的 MDR。因此某些 MDR 可能从通常的移位酶进化 (突变) 而来。只有 Smr 族是一例外, 是一些已知最小的 (约 100 个氨基酸) MDR, 可能本质上就是一些非特异性的原始的移位酶。

由于以前认为特异性抗性比非特异性抗性重要, 人们致力于研究对天然抗生素的修饰, 防止其被降解或钝化。细菌广泛存在的固有的非特异性多重抗性使得要重新评价这种半合成抗生素的策略。细菌多重抗性的研究和遗传机理的阐明不仅在临床上具有实用价值, 在揭示细胞对外界环境的反应、基因调控和生命本质现象等重大问题上都有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Endicott J A, Ling V. Ann Rev Biochem, 1989, 58: 137~171.
- [2] Tennent J M, Lyon B R, Midgley M, et al. J Gen Microbiol, 1989, 135: 1~10.
- [3] Lewis K. TIBS, 1994, 19: 119~123.
- [4] Nikaido H. Science, 1994, 264: 382~388.
- [5] Neyfakh A A, Bidnenko V, Chen L B. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 4781~4785.
- [6] Neyfakh A A, Borsch C M, Koatz G W. Antimicrob Agents Chemother, 1992, 37: 128~129.
- [7] Grinius L, Dreguniene G, Goldberg E B, et al. Plasmid, 1992, 27: 119~129.
- [8] Morimyo M, Hongo E, Hama-Inaba, et al. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 3159~3165.
- [9] Ma D, Cook D N, Alberti M. J Bacteriol, 1993, 175: 6299~6313.
- [10] Pool K, Krebes K, McNally C, et al. J Bacteriol, 1993, 175: 7363~7372.
- [11] Ames G F, Mimura C S, Shyamala V. FEMS Microbiol Reviews, 1990, 75: 429~446.
- [12] Guifoile P G, Hutchinson C R. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 8553~8557.

- [13] Rosteck P R, Reynolds P A, Hersberger C L. *Gene*, 1991, 102:27~32.
- [14] Miyauchi S, Komatsubara M, Kamo N. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1110:144~150.
- [15] Bolhuis H, Molenaar D, Poelarends G, *et al.* *J Bacteriol*, 1994, 176: 6957~6964.
- [16] Rodriguez A M, Olano C, Vilches C, *et al.* *Mol Microbiol*, 1993, 8: 571~582.
- [17] Ariza R R, Cohen S P, Bachhawat H, *et al.* *J Bacteriol*, 1994, 176: 143~148.
- [18] Seoane A S, Levy S B. *J Bacteriol*, 1995, 177: 530~535.
- [19] Okusu H, Ma D, Nikaido H. *J Bacteriol*, 1996, 178: 306~308.