

青霉素结合蛋白及其介导细菌耐药的研究进展

苏思婷 毛丹丹 许师文 俞晨洁 袁振亚 温洪宇*

(江苏师范大学生命科学学院 江苏 徐州 221116)

摘要: 青霉素结合蛋白(PBPs)是一类广泛存在于细菌细胞膜表面的膜蛋白,是 β -内酰胺类抗生素的主要作用靶位。在细菌合成细胞壁肽聚糖的过程中, PBPs 主要发挥糖基转移酶、肽基转移酶和 D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶(D,D-羧肽酶)活性,是细菌生长繁殖中不可或缺的酶。不同种类细菌所含 PBPs 各不相同,其结构的改变、数量的增多、与抗生素亲和力的下降以及产生新的青霉素结合蛋白是直接导致细菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药性的重要原因。随着各类抗菌药物在临床上的广泛应用,细菌对抗菌药物的耐药问题日趋严重,其耐药水平也越来越高。因此,近年来全球围绕 PBPs 开展的研究工作越来越多。本文对 PBPs 的分类、结构和功能、与细菌耐药性的关系及检测方法的最新研究进展进行综述,并对未来可能的研究方向进行展望。

关键词: 青霉素结合蛋白, 细菌耐药性, β -内酰胺类抗生素

Research progress in penicillin binding proteins and their mediated bacterial resistance

SU Si-Ting MAO Dan-Dan XU Shi-Wen YU Chen-Jie YUAN Zhen-Ya WEN Hong-Yu*

(School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: Penicillin binding proteins (PBPs) are a class of membrane proteins that are widely present on the surface of bacteria. They are the main target of β -lactam antibiotics. In the process of the bacterial cell wall peptidoglycan synthesis, PBPs play key roles of glycosyl transferase, peptidyl transferase and D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase and thus are indispensable for bacterial growth. Different bacteria contain various PBPs. Changes of protein structure, increase of quantity, decrease of susceptibility to antibiotics and production of new PBPs are important reasons resulting in drug-resistance to β -lactam antibiotics. With wide use of different antibacterial agents, the problem of bacterial resistance is becoming increasingly serious. Therefore, research on PBPs has been carried out in recent years around the world. In this paper, the classification, structure and function of PBPs, their relationship with bacterial drug-resistance and detection methods are summarized. This paper also indicates future research directions.

Foundation item: Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Jiangsu Province (No. 201610320087Y)

*Corresponding author: Tel: 86-516-83536173; E-mail: wenhy@jsnu.edu.cn

Received: June 20, 2016; Accepted: September 28, 2016; Published online (www.cnki.net): November 03, 2016

基金项目: 江苏省大学生创新创业训练计划项目(No. 201610320087Y)

*通讯作者: Tel: 86-516-83536173; E-mail: wenhy@jsnu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-20; 接受日期: 2016-09-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-11-03

Keywords: Penicillin binding proteins, Bacterial resistance, β -lactam antibiotics

随着抗生素在临床上的大量使用, 抗生素的耐药性问题日趋严重, 这不仅关系到个人健康, 同时也对社会造成了一定影响。Blaser^[1]2016 年 4 月发表在“Science”上的文章提出, 抗生素是一把“四刃剑”: (1) 帮助对抗细菌感染; (2) 防止病原菌在人群和环境中的扩散; (3) 细菌对抗生素产生抗性, 减弱抗生素的治疗效果; (4) 直到最近人们才意识到, 使用抗生素对人体内正常的肠道菌群也具有一定负面作用, 进而影响人体健康。前两者是抗生素的优势, 这在抗生素发现初期就为人所知, 而后两者则是危机。

目前, 由于细菌中青霉素结合蛋白(Penicillin binding proteins, PBPs)的改变而引起的抗生素耐药性问题已经成为全世界关注和研究的热点。青霉素结合蛋白是一类位于细菌细胞膜上的膜蛋白, 因其可与 β -内酰胺类抗生素共价结合为作用靶蛋白而得名。通过广泛的多序列比对和结构数据分析, PBPs 和 β -内酰胺酶的亲缘性已被确证^[2-5], 因此可以得到 PBPs 与 β -内酰胺酶相似性很高的结论。目前, 普遍认为 β -内酰胺酶是由 PBPs 进化而来的, 而 PBPs 是 β -内酰胺类抗生素特异的靶蛋白, 且 β -内酰胺酶可使这些抗生素失活^[6]。研究表明, PBPs 的改变与 β -内酰胺类药物亲和力降低是引起细菌出现耐药的重要机制之一^[6]。

1972 年, Suginaka 等^[7]首次报道了青霉素结合蛋白, 他们通过放射性同位素标记青霉素的方法标记出了细菌表面的 PBPs。本质上, 青霉素结合基团(即青霉素结合蛋白)可以用来水解药物, 即 PBPs 通过脱酰基作用水解抗生素。 β -内酰胺类抗生素作用于细菌表面的青霉素结合蛋白, 从而酰化其活性丝氨酸位点, 形成稳定的酰基化结构基团, 阻止 PBPs 参与细菌细胞壁的合成过程^[8]。 β -内酰胺酶在经历酰基化活性位点并形成稳定的基团后, 迅速地进行脱酰基过程, 使酰基化结构基团不稳定并水解, 最终达到水解抗生素的目的。所有细菌均含有多种不同的青霉素结合蛋白, 不同细菌所含的青霉

素结合蛋白的种类和数量各不相同, 不同 PBPs 的改变在细菌耐药机制中发挥的作用也不尽相同。

1 PBPs 的分类

不同种属的细菌细胞膜上的 PBPs 的数量、结构功能、相对分子质量以及对 β -内酰胺类抗生素的敏感程度不尽相同。根据这些不同可将青霉素结合蛋白分为三大类。

1.1 根据相对分子质量及其氨基酸序列的相似程度分类

根据相对分子质量及其氨基酸序列的相似程度的不同, 可将 PBPs 分为: (1) A 型高相对分子质量(High molecular mass, HMM) PBPs; (2) B 型高相对分子质量 PBPs; (3) 低相对分子质量 PBPs (Low molecular mass, LMM)。A 型高相对分子质量 PBPs 是一类具有双重酶活性的 PBPs, 其 N-末端具有糖基转移酶的活性, C-末端具有肽基转移酶的活性^[8]。B 型高相对分子质量 PBPs 仅具有肽基转移酶的活性, 但其一定程度上可以维持细胞形态。低相对分子质量 PBPs 普遍具有 D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶(D,D-羧肽酶)的活性, 可催化 D-丙氨酰-D-丙氨酸间的肽链断裂, 在肽聚糖交联过程中起着重要作用^[9]。

1.2 根据细菌对 β -内酰胺类抗生素的敏感度分类

根据细菌对 β -内酰胺类抗生素的敏感度不同, 可将 PBPs 分为: (1) 对青霉素敏感度稍差, 但对大多数头孢菌素敏感的 PBPs: 其相对分子质量较低(24.8–34.7 ku), 一般是 D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶, 如金黄色葡萄球菌的 PBP4 和大肠埃希氏菌的 PBP5、PBP6^[10]; (2) 对青霉素和头孢菌素均敏感的 PBPs: 其相对分子质量较高(59.5–89.3 ku), 其羧基末端是青霉素结合域, 催化青霉素敏感的肽聚糖转肽酶反应(肽交联), 氨基末端是催化青霉素不敏感的肽聚糖转糖基酶反应(糖链延伸)^[11]。不同抗生素作用于不同的 PBPs, 而对于不同的细菌来说, 即使是同一抗生素也是作用于不同的 PBPs 上。如头孢噻肟作用于链球菌的靶位是 PBP2x, 而作用于金黄

色葡萄球菌的靶位是 PBP2。苯唑西林也主要作用于金黄色葡萄球菌的 PBP2, 而金黄色葡萄球菌的 PBP3 却是头孢拉定的主要作用靶位点。此外, 作用于同一 PBP 的抗生素合用时会产生拮抗作用, 作用于不同 PBP 的 β -内酰胺类抗生素在联用时则会产生协同作用^[12]。

1.3 根据与细菌生理功能的关系分类

根据与细菌生理功能的关系可将 PBP 分为:

(1) 细菌生长必需蛋白; (2) 细菌生长非必需蛋白。以大肠杆菌为例, HMM PBP 在菌体生存过程中是必需的, 因此称之为细菌生长必需 PBP; 而去除 LMM PBP 后, 菌体细胞仍能继续存活, 因此称其为细菌生长非必需 PBP^[13-14]。

2 PBP 的结构与功能

2.1 结构

以前, 利用现代分子生物学、生物物理学和生物化学等方法研究 PBP 的结构和基因构成(如分析细菌提取的羧肽酶的青霉素-肽衍生物的氨基酸序列), 明确了数种细菌 PBP 的活性中心。研究结果显示, 细菌的 PBP 活性中心通常是丝氨酸, 后来有研究者采用液相色谱法和纳电-色谱法证实了这一发现^[10]。另外也有研究表明, 可能存在以半胱氨酸-巯基为活性中心的羧肽酶^[10]。 β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺环与细菌 D-丙氨酰-D-丙氨酸末端具有相似的结构, 能与 D-丙氨酰-D-丙氨酸竞争 PBP 的活性位点。并且, 相比于 D-丙氨酰-D-丙氨酸, β -内酰胺环与 PBP 的亲合性更高。 β -内酰胺类抗生素通过 β -内酰胺环中的羧基和细菌相应 PBP 中的丝氨酸羟基共价结合形成丝氨酸酯, 从而有效控制生物学功能, 致使网状细胞壁无法形成, 导致细菌细胞死亡, 以此发挥杀菌作用^[15]。

研究发现, 低分子质量的 PBP 与 A 类 β -内酰胺酶有相似的二级结构空间排布(均是双结构域蛋白)以及相似的三级结构, 且在三级结构中相同的关键位置至少有 Ser-Xaa-Xaa-Lys 盒、Lys-Thr-Gly/His-Thr-Gly 盒、Asp225/Glu150/Glu166 盒, 也有研究认为 PBP 青霉素结合区包括此 3 个保守序

列: 含氨基酸活化位点的 SerXxxXxxLys (SXXX 盒)、SerXxxAsn (SXN 盒)、LysThr/SerGly(KT/SG 盒)^[10]。

目前, 对于耐甲氧西林型金黄色葡萄球菌 PBP2a 和肺炎链球菌 PBP3 的晶体结构研究较为清楚。耐甲氧西林型金黄色葡萄球菌的 PBP2a 含有 668 个氨基酸残基, 其前 23 位氨基酸为 N-末端跨膜区, 除了 N-末端 23 个氨基酸以后的蛋白具有水溶性。水溶性的 PBP2a 具有 N-末端非青霉素结合域, C-末端 TPase 功能域两个功能域, N-末端负责延伸和锚定蛋白质, 而 C-末端则具有 TPase 活性和 β -内酰胺酶的作用^[10]。在转肽酶区具有 β -内酰胺类抗生素作用的位点^[16], 由于 PBP2a 与 β -内酰胺类抗生素亲和力很低, 因而表现出耐药性。如果 PBP2a 保守序列或相邻的氨基酸被替代, β -内酰胺类抗生素不能有效地与 PBP 结合, 也会导致 MRSA (Multiple-resistant *Staphylococcus aureus*) 产生耐药性。肺炎链球菌 R6 菌中的 PBP3 共有 413 个氨基酸, 基因编码 PBP3 全长 1 242 bp。PBP3 的一级结构由 NH₂-端信号肽序列、2 个结构域和 COOH-端结合到膜上的两亲螺旋三部分组成^[17]。

2.2 功能

不同细菌的 PBP 组成不同, 其功能也各不相同, 研究表明并非所有的 PBP 均是抗生素的作用靶位。现在研究得比较多的是革兰氏阳性菌中的肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等, 革兰氏阴性菌中的大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、流感嗜血菌(*Hemophilus influenzae*)等^[10]。

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)通常称为大肠杆菌, 迄今为止最早开展的 PBP 研究就是大肠杆菌的 PBP, 这也是研究最多且比较具有代表性的。现以大肠杆菌为例阐明不同 PBP 的功能(表 1)。

大肠杆菌含有 8 种 PBP, 包括 PBP1-PBP8^[18]。

大肠杆菌 PBP1 的主要功能是合成细胞壁的主要成分肽聚糖, 从而维持细胞形态, 主要分布于细

表 1 大肠杆菌 PBP 的种类和功能
Table 1 The classifications and functions of *Escherichia coli*'s PBP

种类 Classifications	主要功能 Functions
PBP1	维持细胞的形态
PBP2	维持大肠杆菌的张力,使细菌维持杆棒状
PBP3	与细菌分裂有关
PBP4	具有 D,D-羧肽酶和 D,D-内肽酶活性
PBP5	其羧基末端可稳定蛋白质
PBP6	在细菌静止期稳定肽聚糖结构
PBP7	有 D,D-内肽酶的活性
PBP8	是 PBP7 的蛋白降解产物,具有 D,D-内肽酶的活性

胞内膜,少部分分布于细胞外膜,与抗生素结合可以导致细菌快速溶解。PBP1 分为 PBP1a 和 PBP1b。PBP1a 是细菌生长非必需蛋白,缺少 PBP1a 的变异株能够存活,且 PBP1a 不能独立维持细胞完整性。PBP1b 是维持细菌生长的重要蛋白,是肽聚糖交联过程中的必需酶,也是青霉素溶解细胞作用的靶位^[10]。PBP1b 是一种球蛋白,具有 2 个密切相关的酶活性区,一个是转肽酶活性区,另一个是转糖酶活性区,PBP1b 的缺失会损害大肠杆菌生物膜的形成及其运动性。PBP1a 和 PBP1b 与细菌生长有关,青霉素、氨苄西林等与它们有高度的亲和力,会使细菌生长繁殖受到抑制,导致细菌死亡^[8]。

大肠杆菌 PBP2 能维持大肠杆菌的张力,使细菌维持杆棒状。美西林、克拉维酸和亚胺培南与 PBP2 有高度亲和力,与 PBP2 结合后,导致 PBP2 的减少或缺乏时可使细菌变成圆球体,最终导致细菌溶解死亡。有实验证明,在缺乏 PBP2 基因的菌株中,如能使 PPGPP 大量表达及分裂蛋白 FtsZ、FtsA、FtsQ 大量表达,细菌仍能存活并分裂繁殖^[19]。

大肠杆菌 PBP3 与细菌分裂有关,在 DNA 复制完成后 PBP3 被激活,并催化羧基酶反应,产生细菌分裂必需的肽聚糖合成反应。PBP3 是隔膜的胞壁质形成的必需成分,抗生素选择性作用于 PBP3 后,能够阻止大肠杆菌的分裂并使细胞形成丝状体而不溶解^[20]。

大肠杆菌 PBP4 同时具有 D,D-羧肽酶活性和 D,D-内肽酶活性,缺乏 PBP4 的菌株仍可以很好的存活,因此,PBP4 不是 β -内酰胺类抗生素的主要作用靶位^[11]。

大肠杆菌 PBP5 是细菌生长非必需蛋白,PBP5 具有 D-丙氨酸羧肽酶 IA 的活性,这个酶在细菌体内能保护大肠杆菌不被低浓度的 β -内酰胺类抗生素杀死。缺少 PBP5 的菌株对于一些抗生素特别敏感^[14]。在 PBP5 羧基端有一个约 100 个氨基酸的末端,切除这个末端后细菌仍保留 PBP5 蛋白与青霉素结合能力及酶活性,但容易被蛋白酶降解,因此 PBP5 的羧基末端具有稳定蛋白质的作用。

大肠杆菌 PBP6 在细菌静止期的含量远比指数生长期的要高(2-10 倍),能在静止期稳定肽聚糖的结构^[21]。

大肠杆菌 PBP7 有 D,D-内肽酶的活性,大肠杆菌 PBP8 是 PBP7 的蛋白降解产物,也具有 D,D-内肽酶的活性,能够特异性地分解一些细胞壁质的 D,D-DAP-Ala 间的肽键^[10]。

另外,沙门氏菌(*Salmonella*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等的 PBP 类型和大肠杆菌具有很高的相似度。

3 PBP 与革兰氏阳性细菌耐药性的关系

不同革兰氏阳性菌的 PBP 组成不同,其功能和耐药机制也有一定的差别。研究表明,并非所有的 PBP 都是抗生素的作用靶位。目前研究较多的是肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)等革兰氏阳性菌的 PBP。

3.1 肺炎链球菌

经研究发现,肺炎链球菌共有 6 种 PBP,分别为 PBP1a、PBP1b、PBP2a、PBP2x、PBP2b 和 PBP3^[22]。其中,肺炎链球菌耐药株 4 个分子量较大的 PBP1a、PBP2a、PBP2x 和 PBP2b 与青霉素的亲和力较低。这 4 个 PBP 是 β -内酰胺类抗生素作用的致命靶点^[23]。肺炎链球菌对青霉素耐药是多基因逐步变异累加的结果,其中 PBP1a、PBP2x 和

PBP2b 起主要作用, PBP2x 和 PBP2b 为原耐药抗性决定簇, 它们的变异可导致低水平耐药。当 PBP1a 发生变异时通常导致高水平耐药, 但与此同时, PBP2x 和 PBP2b 中至少有一种发生变异^[24]。最近研究显示, 由镶嵌基因导致的低亲和力 PBP2x 和 PBP1a 是产生高水平头孢噻肟耐药的主要原因^[25]。Yin 等对患有急性腹泻儿童肠道致病菌的研究^[26]中, 通过高通量测序的方法分析了肠道致病菌和急性腹泻的关系, 发现链球菌所造成的影响因素所占比例最大, 其余为韦荣球菌及肠杆菌, 这与细菌对青霉素产生的耐药机制有紧密联系, 其中链球菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药机制主要分为三类: (1) 改变抗生素与 PBP 的亲和力: 当细菌与 PBP 结合后, PBP 丧失酶活性, 细菌与青霉素的结合能力降低, 因而产生耐药性; (2) 细菌外膜通透性改变: 改变细胞膜和细胞壁的结构导致通透性降低, 使 β -内酰胺类抗生素无法达到靶位而产生耐药; (3) 主动外排: 细菌依赖主动外排将已经进入体内的抗生素排出菌体外, 从而降低抗生素吸收速率或改变转运途径, 这也是导致耐药性产生的重要因素^[27]。

3.2 金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌产生耐药性的主要青霉素结合蛋白是 PBP2a。据研究, 甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌存在 5 种 PBP, 它们分别是 PBP1、PBP2、PBP3、PBP4 及 PBP2b。近年研究^[28]表明, PBP1 在肽聚糖交联过程中不起主要作用, 它的功能必需整合到细胞分裂机制过程中才能发挥作用。另外, 在耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)中还有 PBP2a, 此蛋白由 *mecA* 基因编码, 其在介导耐药性时需要 PBP2 的同时参与。Pinho 等对 MRSA 的 PBP2 转糖基酶功能域灭活, 而不灭活转肽酶功能域, 尽管发现有 PBP2a 存在, 但是不能表达对 β -内酰胺类抗生素的耐药性, 研究结果证明在 β -内酰胺类抗生素存在条件下, MRSA 细胞壁的合成需要 PBP2 转糖基酶和 PBP2a 转肽酶联合作用^[29]。PBP2a 与青霉素的结合能力较差, 可维持菌体肽聚糖的稳定, 从而使细菌产生耐药性^[30]。此外, 金黄色葡萄

球菌中的 PBP1 是一种肽酰转移酶, 在金黄色葡萄球菌细胞周期中 PBP1 起双重作用, 它既是细胞分隔中的必需蛋白, 又是一种在细胞分裂末期产生关键信号的肽酰转移酶^[31]。

PBP 对革兰氏阳性菌细胞壁合成过程至关重要, 其种类繁多, 编码基因不同, 分子质量大小也存在差异, 但其在肽聚糖合成中的功能相近。因此, 在发生 β -内酰胺类抗生素耐药时, PBP 相应的基因也会发生变异, 构成了细菌耐药机制中的重要部分^[32]。

4 PBP 与革兰氏阴性细菌耐药性的关系

对于革兰氏阴性菌而言, 主要耐药机制是产生 β -内酰胺酶。除此之外, 革兰氏阴性菌的细胞壁含有外膜, 可以有效阻止抗生素进入细菌而产生耐药性, 同时还有通过靶位点 PBP 改变, 使已经进入菌体内的抗生素不能与 PBP 位点结合, 从而不能继续发挥抗生素杀菌作用。下面将对革兰氏阴性菌耐药机制的研究进展做进一步综述。

4.1 大肠杆菌

在以往对肠杆菌科野生菌株的研究中^[6], 认为 *ampD* 失活和 *ampR* 点突变导致了 *ampC* 的过表达, 最终会出现耐药现象。而目前的研究发现^[33], PBP5 的突变是导致大肠杆菌耐药的主要原因。已探究出的大肠杆菌 PBP 有 12 种, 分为高分子量 PBP 和低分子量 PBP 两类。其中, 起主要作用的 PBP5 属于低分子量的 PBP, 它与维持大肠杆菌的直径和外形等相关^[34]。从相关文章中可以知道它的突变原理^[35], 由于 β -内酰胺的中部位电子密度极强, 但侧链的电子密度较弱, 甚至不存在, 且抗生素和 PBP5 区域的关系与酰化速率不相关, 又因为水解水分子的相应位点被 β -内酰胺的环氮堵塞导致叠加亚胺培南-酰化产的复合物与 PBP5 结合, 因此, PBP5 极易发生突变, 由此还说明个别 PBP 的失活也能产生高水平的 β -内酰胺类抗生素耐药。

4.2 淋球菌

淋球菌不产生 β -内酰胺酶, 但具有抗生素抗

性。青霉素抗性淋球菌首先降低 PBP2 对青霉素的亲和力, 然后降低 PBP1 对青霉素的亲和力。降低 PBP1 的亲和力可使菌株获得较高水平的青霉素抗性, 这一作用同时受其它基因位点的调节^[36]。目前, 在关于淋球菌耐药机制的研究中, 研究人员大多研究 *ponA*、*penA*、*mtrR*、*penB*、*penC* 等基因^[37]。其中 *ponA* 和 *penA* 基因分别编码 PBP1 和 PBP2, *ponA* 基因位点突变可以改变抗生素靶位点, 导致细菌的敏感性降低^[38-39]。*penA* 基因主要决定淋球菌对青霉素的低水平抗性, 且 *penA* 与降低 PBP2 对青霉素的亲和力有关, *mtr* 基因编码产物本身具有增加细菌青霉素抗性的作用^[32]。另外, 研究人员从一起淋球菌暴发流行中分离到含上述基因突变的菌株, 他们发现这些菌株不仅对抗生素的亲和力降低, 也缺少一种正常的外膜蛋白^[36]。

4.3 绿脓杆菌

研究抗性 M 型和 K 型绿脓杆菌, 发现 PBPs 的改变可以增加菌株抗药水平。不同的是, 在 K 型绿脓杆菌中, 因 PBP3 缺少而丧失对青霉素的结合能力。M 型绿脓杆菌则是降低所有 PBPs 与青霉素的结合。由研究发现可知, 绿脓杆菌对抗菌药物的抗性通常是由于药物进入的能力较差和细菌产生的钝化酶修饰药物所致^[40]。

4.4 铜绿假单胞菌

铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类抗生素耐药主要是因为高分子靶点 PBPs。在铜绿假单胞菌中, 分子量的 PBP3 只具有转肽酶功能, 是关键的治疗靶位, 它是肽聚糖合成过程中的必需酶, 并且由 β -内酰胺类抗生素共价灭活。有关研究者发现^[41], 铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类抗生素高水平耐药是由于非必需 PBP4 的失活而产生对 β -内酰胺类抗生素的虚假靶位, 导致染色体的 β -内酰胺酶产生过度以及双组分调节器的特殊活性。从原理来看, 可以明白 PBP4 失活是能够决定一个高效复杂的抗生素耐药反应。

4.5 鲍曼不动杆菌

在鲍曼不动杆菌中, 有学者指出, 在 pH 为

6.3-7.0 范围内, β -内酰胺酶的产生和 PBP2 表达量的减少是鲍曼不动杆菌耐药的主要原因。曾在 2011 年有报道研究鲍曼不动杆菌 PBPs 异常与耐药性的相关性^[42]。鲍曼不动杆菌的 36 ku PBP 可能是一种新的 PBP 或者其他高分子量 PBP 的产物。但在后来鲍曼不动杆菌耐亚胺培南克隆菌株的实验中, 证明这种产物可能对调节鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类的耐药没有作用^[42]。

4.6 流感嗜血杆菌

由于流感嗜血杆菌的通透性较好, 细胞通透性的改变引起外膜蛋白改变, 从而降低 PBP3 和 PBP6 或 PBP3 和 PBP4 或 PBP4 对青霉素的亲和力^[36]。它的抗药性是由多重因子决定的, 产生了具有内在庄内酰胺抗性但不产生 β -内酰胺酶的菌种, 且这种菌至少对大多数 β -内酰胺类抗生素相当敏感。

4.7 分枝杆菌

分枝杆菌的外膜结构是一道渗透性很低的有效屏障, 与绿脓杆菌相似。分枝杆菌外膜高度有序的脂双层结构和细胞壁上的分支酸使其流动性比一般的革兰氏阴性细菌的流动性更低, 所以, 它对大多数抗菌药物都能表现固有耐药性。例如近年出现多重耐药的结核杆菌, 它们对人类的危害极大。

4.8 其他革兰氏阴性菌

其他革兰氏阴性菌如胸膜肺炎放线杆菌, 有研究者详细分析了 PBPs 与胸膜肺炎放线杆菌的联系以及细胞溶解动力学, 在 PBP1b 优先失活的条件下, 细菌细胞可以快速溶解, 从而表明其敏感度与 PBP3 对抗生素的高亲和力相关^[43]。

5 PBPs 的检测技术

PBPs 检测技术在 β -内酰胺类抗生素耐药性研究方面有重要的应用。由于 β -内酰胺类抗生素耐药性研究的需要, PBPs 检测技术不断发展, 现已有多种方法如分离纯化方法、PBPs 图谱研究方法及特定的 PBPs 检测方法。

5.1 分离纯化方法

基于 PBPs 能与青霉素衍生物共价结合的特性,

研究者们采用亲和层析分离纯化这些蛋白质,因为羟胺是转肽酶作用的受体,所以洗脱剂常采用羟胺,用该法可以纯化活性 PBP_s^[10]。此外,可采用离子型去污剂如十二烷基硫酸钠,其可以选择性作用于胞浆膜使之破裂,释放菌体蛋白制备样品,然后对样品进行煮沸操作,排除其他蛋白质的干扰。这个操作会使游离的蛋白质失去活性,存在局限性。另外,体外克隆耐药菌株编码 PBP_s 的基因,双酶切鉴定及测序,再转化到敏感菌种,观察其对各种抗生素的耐药性影响,是检测 PBP_s 最直接的方法。研究过程中运用这种表达系统和这种纯化重折叠方法,能获得大量易于进行生物化学分析的水溶性蛋白,且证明水溶性 PBP_s 有酶活性,由此更有利于设计新的抗生素^[10]。

5.2 PBP_s 图谱研究方法

研究者常采用传统的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和荧光放射自显影的方法分析 PBP_s 图谱,通常所用的荧光标志物为 3H、14C 或 125I,所得结果相似,但是这种方法不容易分辨出所有的 PBP_s,且操作过程不能间断,所用具有放射性的标记物危害社会环境和人体健康,不利于长期操作。另外还有商用且较敏感的非放射性的新方法,用 BOCILLIN FL 作为检测和研究 PBP_s 的标签试剂^[6]。这种方法可在荧光图像的帮助下实现快速检测 2–4 ng 的蛋白,所得结果与用 3H、14C 或 125I 作为标志物所得结果相同。竞争结合抑制试验可用于测定不同浓度抗生素与 PBP_s 亲和力的改变,抗生素浓度越高,亲和力越强,作用靶位自显影条带的颜色越浅。还有一种建立在使用氨苄西林-毛地黄毒苷共轭(AMP-DIG 共轭)基础之上,并且通过免疫斑点和化学发光检测的方法,这种方法可快速鉴别 PBP_s 高度敏感性。相对于使用传统的放射标记 β-内酰胺类抗生素来说,由于化学发光的敏感性可使 X 线胶片曝光时间减少到数分钟,这种方法大大提高了实验效率^[10]。

5.3 特定 PBP_s 检测方法

这种检测方法介绍以 MRSA 的 PBP2a 的研究

为代表。一种三明治式的放免法(IRMA,此方法在报道 MRSA PBP2a 的氨基酸序列基础之上合成了 10 种约 21–32 个氨基酸长度的肽)和一种 30 min 乳胶凝集试验(LA 试验),用免疫兔子的方法产生抗这些合成肽的抗体,用这些抗体建立了 IRMA 法检测 PBP2a^[10]。这种方法可以从少至 3×10^4 的临床分离 MRSA 株细胞提取物中测到 PBP2a,并且在细胞数量和信号的放射量之间有良好的相关性^[10]。RMA 是一种简单且可靠的检测方法^[44]。

6 小结与展望

近年来,耐药菌引起的感染性疾病愈发严重,对其耐药机制的研究急不可待,而其中非常重要的一种耐药机制——PBP_s 机制引起研究者的关注与研究。在细菌中广泛存在着 PBP_s 改变导致细菌产生抗性的现象,且细菌对于 β-内酰胺类抗生素的抗性主要涉及到通过细菌外膜药物靶位点的改变,或使抗生素与靶位点无法结合,或阻止药物进入细菌细胞的机理。本文综述了青霉素结合蛋白的研究进展,从其结构功能深入了解 PBP_s,由此分析其生理生化特征,并进一步扩展,针对革兰氏细菌耐药性的特征,阐述其抗性与 PBP_s 改变之间的关系,因而更好地帮助研究细菌的耐药机制,使医学上能够做到有效地破坏细菌耐药性^[45],控制抗生素的滥用,并开发新的药物和治疗手段。

目前,针对抗生素产生的耐药性主要有以下 3 种措施:(1) 联合用药;(2) 改造现有的药物;(3) 研制新的药物^[8]。温洪宇等对连云港盐田中生长的嗜盐古菌物种资源进行了研究,嗜盐古菌可以产生一类蛋白类抗生素,称为嗜盐菌素,其对相近的属或种的微生物有抑制或致死作用,而且性质稳定,潜在应用领域广泛^[46],因此,研究嗜盐菌素的抑菌机制具有重要的实用价值。Langdon 等的研究中显示,随着窄谱抗生素的进一步研究发展,通过添加益生菌并利用噬菌体疗法有望击败致病细菌,同时限制微生物产生的附加危害^[47]。展望未来,通过逐步深入地认识抗生素耐药性所产生的影响,研究者们将开发研制出新的治疗策略,以应对全球性抗生素耐药性问题。

参 考 文 献

- [1] Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome[J]. Science, 2016, 352(6285): 544-545
- [2] Hall BG, Barlow M. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future[J]. Drug Resistance Updates, 2004, 7(2): 111-123
- [3] Thomson KS, Moland ES. Version 2000: the new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium[J]. Microbes and Infection, 2000, 2(10): 1225-1235
- [4] Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42(1): 1-17
- [5] Matagne A, Dubus A, Galleni M, et al. The β -lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity[J]. Natural Product Reports, 1999, 16(1): 1-19
- [6] Wang XH, Jiang YQ. Research progress of penicillin-binding proteins and gram-negative bacterial resistance[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science), 2012, 32(6): 820-822 (in Chinese)
王欣慰, 蒋燕群. 青霉素结合蛋白与革兰阴性细菌耐药性的研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(6): 820-822
- [7] Suganaka H, Blumberg PM, Strominger JL. Multiple penicillin-binding components in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(17): 5279-5288
- [8] Li J, Yang H, Huan T, et al. Penicillin binding proteins of bacteria[J]. Chemistry of Life, 2013, 33(4): 418-426 (in Chinese)
李冀, 杨慧, 呼延霆, 等. 细菌青霉素结合蛋白[J]. 生命的化学, 2013, 33(4): 418-426
- [9] Sauvage E, Kerff F, Terrak M, et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 234-258
- [10] Xiong YL. Research progress of penicillin binding protein[J]. World Notes on Antibiotics, 2004, 25(5): 193-197 (in Chinese)
熊亚莉. 青霉素结合蛋白研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2004, 25(5): 193-197
- [11] Sahin F, Karasartova D, Ozsan TM, et al. Identification of a novel lytic bacteriophage obtained from clinical MRSA isolates and evaluation of its antibacterial activity[J]. Mikrobiyoloji Bülteni, 2013, 47(1): 27-34
- [12] Wu BQ, Tang YC, Zhang KX, et al. Cefradine and cefotaxime induction of PBP_{2a} and effects of it on MRSA morphology and resistance[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 1999, 24(6): 440-444 (in Chinese)
吴本权, 唐英春, 张扣兴, 等. 头孢拉定、头孢噻肟对 MRSA PBP_{2a} 的诱导作用以及形态、耐药性的影响[J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(6): 440-444
- [13] Meberg BM, Paulson AL, Priyadarshini R, et al. Endopeptidase penicillin-binding proteins 4 and 7 play auxiliary roles in determining uniform morphology of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(24): 8326-8336
- [14] Sarkar SK, Chowdhury C, Ghosh AS. Deletion of penicillin-binding protein 5 (PBP5) sensitises *Escherichia coli* cells to β -lactam agents[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, 35(3): 244-249
- [15] Guignard B, Entenza JM, Moreillon P. β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2005, 5(5): 479-489
- [16] Tomasz A. "Intelligence coup" for drug designers: crystal structure of *Staphylococcus aureus* β -lactam resistance protein PBP2A[J]. The Lancet, 2003, 361(9360): 795-796
- [17] Morlot C, Pernot L, Le Gouvellec A, et al. Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(16): 15984-15991
- [18] Denome SA, Elf PK, Henderson TA, et al. *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(13): 3981-3993
- [19] Vinella D, Joseleau-petit D, Thévenet D, et al. Penicillin-binding protein 2 inactivation in *Escherichia coli* results in cell division inhibition, which is relieved by FtsZ overexpression[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(20): 6704-6710
- [20] Schmidt LS, Botta G, Park JT. Effects of furazlocillin, a β -lactam antibiotic which binds selectively to penicillin-binding protein 3, on *Escherichia coli* mutants deficient in other penicillin-binding proteins[J]. Journal of Bacteriology, 1981, 145(1): 632-637
- [21] Buchanan CE, Sowell MO. Synthesis of penicillin-binding protein 6 by stationary-phase *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1982, 151(1): 491-494
- [22] Qin HN, Yu SM. Penicillin-binding protein gene cloning and expression PBP2b[J]. Bio-IT World, 2016(2): 11-12 (in Chinese)
覃鸿妮, 俞苏敏. 青霉素结合蛋白 PBP2b 基因的克隆与表达[J]. 生物技术世界, 2016(2): 11-12
- [23] Kearns AM, Graham C, Burdett D, et al. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(2): 682-684
- [24] Izdebski R, Rutschmann J, Fiet J, et al. Highly variable penicillin resistance determinants PBP 2x, PBP 2b, and PBP 1a in isolates of two international *Streptococcus pneumoniae* clonal groups, Poland^{23F}-16 and Poland^{6B}-20[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(3): 1021-1027
- [25] Zerfaß I, Hakenbeck R, Denapate D. An important site in PBP2x of penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: mutational analysis of Thr338[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(3): 1107-1115
- [26] Yin X, Gu XH, Yin TT, et al. Study of enteropathogenic bacteria in children with acute diarrhoea aged from 7 to 10 years in Xuzhou, China[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 91: 41-45
- [27] Liu DQ, Li YH, Cai XH, et al. Antibiotic resistance mechanism of *Streptococcus*[J]. World Notes on Antibiotics, 2007, 28(3): 103-107 (in Chinese)
刘荻荻, 李艳华, 蔡雪辉, 等. 链球菌对抗生素产生耐药性的作用机制[J]. 国外医药抗生素分册, 2007, 28(3): 103-107
- [28] Pereira SFF, Henriques AO, Pinho MG, et al. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(9): 3525-3531
- [29] Pinho MG, De Lencastre H, Tomasz A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(19): 10886-10891
- [30] Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. Clinical Infectious Diseases, 2008, 46(S5): S350-S359
- [31] Pereira SFF, Henriques AO, Pinho MG, et al. Evidence for a dual role of PBP1 in the cell division and cell separation of *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2009, 72(4): 895-904
- [32] Philippe N, Pelosi L, Lenski RE, et al. Evolution of penicillin-binding protein 2 concentration and cell shape during a long-term experiment with *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(3): 909-921
- [33] Chowdhury C, Nayak TR, Young KD, et al. A weak DD-carboxypeptidase activity explains the inability of PBP 6 to substitute for PBP 5 in maintaining normal cell shape in *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 303(1): 76-83
- [34] Xie XS, Zhao YJ, Zhang DX, et al. Drug resistance mechanism of gram negative bacteria mediated by PBPs[J]. Chinese Journal of

- Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(2): 169-172 (in Chinese)
- 解晓双, 赵玉军, 张德显, 等. PBPs 介导革兰氏阴性菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药机制[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(2): 169-172
- [35] Nicola G, Tomberg J, Pratt RF, et al. Crystal structures of covalent complexes of β -lactam antibiotics with *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5: toward an understanding of antibiotic specificity[J]. Biochemistry, 2010, 49(37): 8094-8104
- [36] Zhang LJ, Yu Q. Penicillin binding protein and mechanism of drug resistance of bacteria to beta lactam antibiotics[J]. Foreign Pharmic Archies of Antibiotics, 1987, 8(5): 374-377 (in Chinese)
- 张丽娟, 于泉. 青霉素结合蛋白与细菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性机理[J]. 国外药理学抗生素分册, 1987, 8(5): 374-377
- [37] Yuan LF, Yin YP. Progress in research on drug resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and resistance mechanism of ceftriaxone[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2009, 36(4): 264-267 (in Chinese)
- 袁柳凤, 尹跃平. 淋病奈瑟菌对头孢曲松耐药性及耐药机制研究进展[J]. 国际药理学研究杂志, 2009, 36(4): 264-267
- [38] Tanaka M, Nakayama H, Huriya K, et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2006, 27(1): 20-26
- [39] Shigemura K, Shirakawa T, Massi N, et al. Presence of a mutation in *ponA1* of *Neisseria gonorrhoeae* in numerous clinical samples resistant to various β -lactams and other, structurally unrelated, antimicrobials[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2005, 11(5): 226-230
- [40] Nayler THC, Shi YG. Limited beta lactamase and permeability in gram-negative bacteria to β -lactams plays the role of antibiotic resistance[J]. Foreign Pharmic Archies of Antibiotics, 1988, 9(3): 170-178 (in Chinese)
- Nayler THC, 施耀国. β -内酰胺酶和通透性受限在革兰氏阴性细菌产生对 β -内酰胺类抗生素耐药性中起的作用[J]. 国外药理学抗生素分册, 1988, 9(3): 170-178
- [41] Moya B, Dötsch A, Juan C, et al. β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(3): e1000353
- [42] Vashist J, Tiwari V, Das R, et al. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Indian Journal of Medical Research, 2011, 133(3): 332-338
- [43] Inui T, Endo T, Matsushita T. Morphological changes and lysis induced by β -lactams associated with the characteristic profiles of affinities of penicillin-binding proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(6): 1518-1523
- [44] Sekiguchi K, Saito M, Yajima R. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with antibodies against synthetic peptides derived from penicillin-binding protein 2'[J]. Microbiology and Immunology, 1995, 39(8): 545-550
- [45] Aygöl A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance[J]. Mikrobiyoloji Bülteni, 2015, 49(2): 278-291
- [46] Wen HY, Yang L, Shen LL, et al. Isolation and characterization of culturable halophilic microorganisms of salt ponds in Lianyungang, China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(10): 1727-1732
- [47] Langdon A, Crook N, Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation[J]. Genome Medicine, 2016, 8: 39