

结核分枝杆菌外排泵及其抑制剂的研究进展

Research progress on efflux pump and its inhibitor in *Mycobacterium tuberculosis*

胡志东(HU Zhi-dong)^{1,2} 综述 张雪莲(ZHANG Xue-lian)², 王洪海(WANG Hong-hai)² 审校

(1 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2 复旦大学生命科学学院遗传学研究所, 上海 200433)

(1 College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2 Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

[关键词] 结核; 结核分枝杆菌; 抗药性; 微生物; 耐药结核病; 外排泵; 外排泵抑制剂

[中图分类号] R378.91⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2010)04-0294-04

结核病自古以来就威胁着人类的健康, 每年导致约 200 万人死亡。特别是近年来, 耐多药结核病、广泛耐药结核病以及结核分枝杆菌与人免疫缺陷病毒(HIV)共感染的出现, 给结核病的临床治疗带来了新的困难。耐多药结核病是耐受 2 种抗结核病一线药物的结核病, 广泛耐药结核病是在耐多药的基础上至少耐受 3 种二线药物的结核病。耐药结核病的蔓延已经成为全球性的公共卫生问题, 据世界卫生组织(WHO)最新的 2009 年度报告, 2007 年全球新发结核病病例 927 万例, 死亡 175 万例, 现有的 1 370 万例活动性结核病患者中, 耐多药者达 50 万^[1]。外排泵系统的泵出作用是导致结核分枝杆菌耐药的重要机制之一。本文综述了近年来国际上在结核分枝杆菌外排泵及其抑制剂方面的研究进展。

1 结核分枝杆菌外排泵系统研究方法

外排泵是指可以把细胞内物质排出胞外的转运蛋白。细菌外排泵的生理学和转运功能研究是目前热点之一, 然而, 对结核分枝杆菌外排泵蛋白的研究还处于探索阶段。1998 年, 结核分枝杆菌 H37Rv 全基因组测序的成功标志着结核病研究进入了分子水平, Cole 等^[2]运用基因组学方法预测, 结核分枝杆菌有 Rv0783c、Rv0849 和 Rv1145 等 20

个外排泵蛋白。近年来, 人们对结核分枝杆菌外排泵系统进行了探索性研究, 主要通过利用分子生物学和微生物遗传学的基本方法进行。

1.1 模式生物过量表达目标蛋白方法 因结核分枝杆菌生长缓慢和毒性大等特性, 一般把结核分枝杆菌的假定外排泵基因转入到模式生物[耻垢分枝杆菌和卡介苗(BCG)]中过量表达, 检测过量表达的外排泵蛋白在模式生物中对底物(抗生素和荧光染料)的转运功能。若该蛋白在模式生物中起到预期作用, 则其会帮助细胞将一部分底物外排出胞外, 导致抗生素对重组菌株的最低抑菌浓度(MIC)或者荧光染料在胞内的累积量升高; 加入外排泵抑制剂后, 因其对外排泵的抑制作用, 可引起 MIC 或荧光性反向的变化, 从而进一步确证外排泵的泵出作用和类别, 表 1 综述了近年来运用此种技术所发现的具有外排药物和荧光染料作用的外排泵蛋白。

1.2 基因敲除和突变方法 基因敲除和突变等技术的发展, 推动了外排泵蛋白功能的研究进展。通过构建外排泵基因缺失或突变菌株, 检测其对药物的敏感度和荧光染料的累积量与野生型菌株的差异, 从而证明外排泵在药物耐受中的作用。在结核分枝杆菌中, 利用突变技术确证的外排泵蛋白有 Rv1410c^[3], 利用基因敲除技术确证的外排泵蛋白有 Rv2333c^[4]和 Rv0342^[6], 研究发现它们的底物各

[收稿日期] 2009-10-20

[基金项目] 国家“八六三”高技术研究发展计划资助项目(2007AA02Z316); 国家“十一五”重大传染病计划资助项目(2008ZX10003006-2); 国家自然科学基金(30901828)

[作者简介] 胡志东(1986-), 男(汉族), 河南省商丘市人, 硕士, 主要从事微生物学研究。

[通讯作者] 张雪莲 E-mail: xuelianzhang@fudan.edu.cn

有不同,其中,Rv1410c 是利福平和氯苯吩嗪,和溴化乙锭。Rv2333c 是四环素和奇放线菌素,Rv0342 是异烟肼

表 1 模式生物过量表达目标蛋白方法确证的假定外排泵蛋白

基因家族	对应靶点	基因名称	模式生物	对应底物	参考文献
MFS	QacA	<i>Rv1258c</i>	耻垢分枝杆菌	氨基糖苷类和四环素	[3]
		<i>Rv1634</i>	耻垢分枝杆菌	氟喹诺酮类	[3]
		<i>Rv2333c</i>	BCG	四环素、奇放线菌素	[4]
		<i>Rv2936-Rv2937</i>	耻垢分枝杆菌	利福平、红霉素、四环素	[3]
		<i>Rv2686c-Rv268</i>	耻垢分枝杆菌	氟喹诺酮类	[3]
ABC	LmrA	<i>7c-Rv2688c</i>			
		<i>Rv0194</i>	耻垢分枝杆菌	氨基糖苷类、万古霉素、新生霉素、红霉素、溴化乙锭等	[5]
SMR	QacC	<i>Rv3065</i>	耻垢分枝杆菌	吡啶黄、红霉素、溴化乙锭、四苯基磷等	[3]
RND	AcrB	<i>Rv2942</i>	耻垢分枝杆菌	异烟肼	[3]
无		<i>Rv0342</i>	BCG	异烟肼、乙胺丁醇、溴化乙锭	[6]

1.3 检测外排泵基因转录和蛋白表达水平方法
在培养结核分枝杆菌尤其是耐药菌株的过程中添加抗结核药物,检测在不同药物浓度和作用时间的情况下,外排泵基因的转录和蛋白表达水平的差异,进而确证这些基因具有药物外排泵的功能。在结核分枝杆菌中,利用此技术确证的外排泵蛋白包括 Rv0341-Rv0342-Rv0343^[6]、Rv1258c^[7]、Rv1410c^[7]和 Rv1819c^[7]等,其中,Rv0341-Rv0342-Rv0343 是用异烟肼、乙胺丁醇处理普通结核分枝杆菌;Rv1258c、Rv1410c 和 Rv1819c 是用异烟肼、利福平处理耐药结核菌(1499)确证的。

目前,利用上述方法已经从生物学角度对 Cole 等人预测的近半数外排泵蛋白的药物外排功能进行了确证,而其他蛋白则有可能与细胞内物质的转运有关,与药物外排无关,如 Vipond 等^[8]利用 DNA 微阵列分析技术发现 *Rv0849* 等基因会在缺氧、缺碳能源等条件下上调或下调表达。而添加外排泵抑制剂后,抗结核一线药物异烟肼和利福平在结核分枝杆菌内的累积量明显增加^[9-10],从而更加证明了外排泵在结核分枝杆菌耐药方面的重要作用。另外,上述研究也发现,一些生物信息学未发现外排泵蛋白相似序列的未知功能蛋白,却具有外排药物的功能,如 Rv2942^[3]、Rv0194^[5]和 Rv0342^[6]等,表明了外排泵在结核分枝杆菌中的普遍存在。家族分类方面,作为外排泵两大家族的 ATP 耦联盒家族(ATP binding cassette, ABC)和主要易化子超家族(major facilitator superfamily, MFS),在结核分枝杆菌的耐药性方面都占有重要地位,但未发现与

多药及毒性外排家族(multidrug and toxic compound extrusion family, MATE)序列同源的外排泵基因。研究结果显示,MFS 家族可以转运 MATE 家族的相关底物,表明了结核分枝杆菌外排泵家族的特殊性。

2 外排泵系统及其耐药性

细菌中参与物质转运功能的基因占 5%~10%,其中外排泵占很大部分。外排泵基因编码蛋白可以转运一种或多种化合物,导致细菌对药物敏感性的降低,从而产生耐药。而外排泵基因的突变则可能致使其编码蛋白的过量表达,导致突变菌株对药物外排功能的增强而产生耐药性。以上耐药产生主要归于 2 种机制:(1)突变外排泵蛋白的表达量升高;(2)氨基酸的置换突变导致该蛋白的转运效率增高^[11]。由此可见,细菌外排泵及其突变对药物的转运作用是导致其耐药性的重要原因之一。

根据氨基酸序列同源性和底物特异性,可以将外排泵分为 5 类^[12]:MATE,介导对氨基糖苷类、氟喹诺酮类等药物的耐受;MFS,介导对吡啶黄素、潘他米丁等药物的耐受;小多耐药转运分子家族(small multidrug resistance family, SMR),介导对苯甲烷铵、溴棕三甲铵等药物的耐受;耐药性结节化细胞分裂家族(resistance nodulation cell division, RND),介导对大环内酯、四环素等药物的耐受;ABC,介导对氯霉素、四环素等药物的耐受。

3 外排泵抑制剂研究

一些化合物可以通过耗竭外排泵转运所需能量,干扰外排泵组装和阻碍底物通过外排通道等方式达到抑制其功能的目的,称为外排泵抑制剂。细菌外排泵机制的发现使我们认识到外排泵是潜在的药靶,外排泵抑制剂可以阻碍耐药菌对药物的外排,增加药物在胞内的存留时间以及恢复菌株对药物的敏感性,从而提高药物的临床疗效并减少耐药突变的发生^[13]。所以,外排泵抑制剂可作为一类新型抗生素与其他药物联用以达到治疗疾病、控制耐药发生的目的^[14]。另外,外排泵抑制剂还可以抑制肿瘤细胞对药物的外排作用,提高肿瘤的临床治疗效果,在改善某些药物的药代动力学特性方面也有一定作用。

近年人们发现了多种外排泵抑制剂^[15-17]。如最早发现的广谱抑制剂 PA β N,也称 MC-207,110,其与抗生素竞争外排泵蛋白上的药物非特异性结合位点,使该位点达到饱和,从而使其失去转运抗生素的作用。其作用底物包括左氧氟沙星、氯霉素、唑烷酮类药物等;5,9-二甲基-1-2,4,8-三烯酸酰胺可作用于金黄色葡萄球菌的 NorA 靶点以达到抑制其外排泵作用的效果;1-萘甲基-哌嗪抑制 AcrA 靶点而使耐药突变菌株进行回复突变。然而,由于外排泵系统的复杂性,目前为止还未生产出一种许可用于人体的化合物。不过,据最新报道,Mpex 制药公司合成了一种外排泵抑制剂 MC-601,205,将此物质同抗生素联合作用于含外排泵系统的细菌,可明显提高该抗生素的杀菌效果。该外排泵抑制剂已作为环丙沙星的辅助药物用于治疗囊性纤维化病,进入临床 II 期试验,具体结构和机制未发表。

对结核分枝杆菌而言,目前各国科研人员正在积极进行针对结核病的新型外排泵抑制剂的研究。Amaral 等^[18]建立了一个可以解释钾离子外排抑制剂如何抑制各类外排泵活性的模型;Lechner 等^[19]改进了一种评价植物酚类化合物抑制分枝杆菌外排泵效果的方法;Martins 等^[20]发现了一种对极端耐药株有杀灭作用的化合物 SILA 421,其可以抑制结核菌和肿瘤细胞的外排泵活性,使得吞噬体内钾离子和钙离子浓度过高而达到杀菌效果,且未对人体细胞显示出任何毒性,有潜力成为一种新型抗结核辅助药物。虽然目前还没有以单一外排泵蛋白作为靶点设计的抑制剂,但是各个外排泵家族蛋白的三

维结构和 X 射线晶体结构的研究已经全面展开^[20],此类研究将极大加快外排泵抑制剂的研究与优化。

4 结论与展望

自从外排泵系统在药物排出方面的作用被发现后,关于外排泵的药物耐受性角色的争论一直在进行。最新达成的共识是,外排泵确实是细菌耐药性的一种重要机制,它既单独发挥作用,又与外膜蛋白渗透性的改变等起协同作用。而外排泵在结核分枝杆菌耐药性方面的作用已经得到了初步的证明。笔者认为,未来还需要进一步确定结核分枝杆菌各个外排泵的外排药物以及其在每个特殊药物外排作用的重要程度,同时寻找对人体无害的外排泵的单一性抑制剂,从而可以根据某种药物的耐受性有的放矢地选择与此种药物耐受相关外排泵的单一抑制剂来配合此种药物的治疗。当然,进一步明确外排泵在胞内作用的机制,对现有药物的改造和新药的开发也具有重要意义。综上所述,结核分枝杆菌外排泵及其抑制剂的研究在全球抗结核运动的过程中必将发挥越来越重要的作用。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing [EB/OL]. [2009-04-11]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html.
- [2] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J]. Nature, 1998, 393(6685): 537-544.
- [3] De Rossi E, Alinsa J A, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance an unresolved question[J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(1): 36-52.
- [4] Ramon-Garcia S, Martin C, De Rossi E, et al. Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium bovis* BCG[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(3): 544-547.
- [5] Danilchanka O, Mailaender C, Niederweis M, et al. Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(7): 2503-2511.
- [6] Colangeli R, Helb D, Sridharan S, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* iniA gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol [J]. Mol Microbiol, 2005, 55(6): 1829-1840.

3 葡萄球菌属

3.1 定义耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)

MRSA 是金黄色葡萄球菌的某些菌株表达 *mecA* 基因或是其他耐甲氧西林机制,如青霉素结合蛋白与苯唑西林亲和力的改变。即 MRSA 是指含有 *mecA* 基因或者苯唑西林 MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ 的菌株。

3.2 青霉素试验 MIC 值 $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ 或纸片法直径 $\geq 29 \text{ mm}$ 的葡萄球菌菌株,在报告青霉素“S”之前需做 β -内酰胺酶诱导试验。对重症感染者,实验室应考虑做 MIC 试验和 β -内酰胺酶诱导试验。

3.3 增加利奈唑胺折点 见表 3。

3.4 对万古霉素 MIC $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 的任何金黄色葡萄球菌,应送至参考实验室进行试验。

3.5 苯唑西林和头孢西丁的检测 头孢西丁替代

苯唑西林检测耐药时,必须根据头孢西丁结果报告苯唑西林敏感或耐药。如果金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌对苯唑西林和/或头孢西丁耐药,则报告苯唑西林耐药。

表 3 葡萄球菌属利奈唑胺折点

方法	2009 CLSI 标准			2010 CLSI 标准		
	S	I	R	S	I	R
MIC 值($\mu\text{g/mL}$)	≤ 4	-	-	≤ 4	-	≥ 8
纸片法直径(mm)	≥ 21	-	-	≥ 21	-	≤ 20

[参考文献]

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, CLSI document M100-S20 [S]. Wayne, Pennsylvania, 2010; 1 - 160.

(上接第 296 页)

[7] Jiang X, Zhang W, Zhang Y, *et al.* Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR[J]. Microb Drug Resist, 2008, 14(1): 7 - 11.

[8] Vipond J, Vipond R, Allen-Vercoe E, *et al.* Selection of novel TB vaccine candidates and their evaluation as DNA vaccines against aerosol challenge[J]. Vaccine, 2006, 24 (37 - 39): 6340 - 6350.

[9] Viveiros M, Portugal I, Bettencourt R, *et al.* Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9): 2804 - 2810.

[10] Piddock L J, Williams K J, Ricci V. Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 45(2): 159 - 165.

[11] Piddock L J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8): 629 - 636.

[12] Piddock L J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2): 382 - 402.

[13] Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors[J]. Biochimie, 2005, 87(12): 1137 - 1147.

[14] Stavri M, Piddock L J, Gibbons S. Bacterial efflux pump in-

hibitors from natural sources[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(6): 1247 - 1260.

[15] Martins M, Dastidar S G, Fanning S, *et al.* Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multi-drug-resistant Gram-negative infections; mechanisms for their direct and indirect activities[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(3): 198 - 208.

[16] Lomovskaya O, Bostian K A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - a vision for applied use[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71(7): 910 - 918.

[17] Zechini B, Versace I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria[J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2009, 4(1): 37 - 50.

[18] Amaral L, Martins M, Viveiros M. Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(6): 1237 - 1246.

[19] Lechner D, Gibbons S, Bucar F. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(2): 345 - 348.

[20] Martins M, Viveiros M, Ramos J, *et al.* SILA 421, an inhibitor of efflux pumps of cancer cells, enhances the killing of intracellular extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33(5): 479 - 482.