

氨基糖苷类抗生素的耐药机制研究进展

钟艾玲¹ 田敏^{1,*} 刘艳全² 易欣² 龙燕² 雷叶明¹ 王富强²

(1 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 四川抗菌素工业研究所, 成都大学, 成都 610052; 2 微生物药物生物合成技术国家地方联合工程研究中心, 成都雅途生物技术有限公司, 成都 610041)

摘要: 氨基糖苷类抗生素 (AG) 是高效的广谱抗生素, 用于治疗许多革兰阴性菌和一些革兰阳性菌感染, 随着临床的广泛应用, 细菌的耐药性日趋严重。本文主要从核糖体修饰作用、氨基糖苷类抗生素的修饰酶的作用、药物的外排泵系统等方面对 AGs 的耐药机制进行阐述, 为能合理使用 AGs、控制细菌耐药性蔓延以及新型 AG 药物的开发提供参考。

关键词: 氨基糖苷类抗生素; 耐药机制; 甲基化酶; 修饰酶

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Research progress of resistance mechanism of aminoglycoside antibiotics

Zhong Ai-ling¹, Tian Min¹, Liu Yan-quan², Yi Xin², Long Yan², Lei Ye-ming¹ and Wang Fu-qiang²

(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 National Engineering Research Center for Microbial Drug Biosynthesis, Chengdu Yacht Bio-Technology Co., Ltd., Chengdu 610041)

Abstract Aminoglycoside antibiotics (AGs) are highly effective broad-spectrum antibiotics for the treatment of many Gram-negative bacteria and some Gram-positive bacteria. As antibiotics are widely used clinically, bacterial resistance is becoming more and more serious. This paper mainly describes the mechanisms of resistance to AGs in terms of ribosome modification, modification of AG-modifying enzymes and drug efflux pump system, which provides a reference for rational using of AGs to control the spread of antibiotic resistance in bacteria.

Key words Aminoglycoside antibiotics; Resistance mechanism; Methylase; Modifying enzymes

氨基糖苷类抗生素 (AGs) 是对革兰阳性菌和革兰阴性菌均有抗菌活性的高效广谱抗生素。自 1944 年发现链霉素后, 大量氨基糖苷类抗生素相继被发现, 并开发了阿米卡星、奈替米星等半合成衍生物^[1]。氨基糖苷类抗生素是由两个或多个与氨基环醇核心连接的氨基修饰的糖组成, 大部分 AGs 含有 2-脱氧链霉胺 (2-DOS) 核心, 如庆大霉素、妥布霉素等。链霉素及其衍生物双氢链霉素则不含 2-DOS^[2-3]。氨基

糖苷类抗生素虽然具有耳毒性和肾毒性^[4], 但它们仍是治疗革兰阴性菌感染的重要药物, 在临床应用中广泛使用。

细菌对抗生素耐药性可分为 3 大类: 固有耐药, 自适应耐药和获得性耐药。抗生素的固有耐药性如细菌细胞壁自然的低渗透性, 能限制许多抗生素的摄取; 抗生素的自适应耐药是由于环境改变 (如营养浓度变化) 引起抗生素的耐药基因或蛋白质表达水平

收稿日期: 2018-04-13

基金项目: 四川省科技计划应用基础研究项目 (No. 2017JY0256); 四川省医药微生物共享服务平台建设 (No. 2018TJPT004)

作者简介: 钟艾玲, 女, 生于 1993 年, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物菌种的遗传选育, E-mail: 1034860969@qq.com.

* 通讯作者, E-mail: tm65tm@aliyun.com

改变;通过掺入外源遗传物质,通常是携带多个抗性基因的质粒,或通过现有基因的突变,可以获得抗生素耐药性^[5-7]。

多重耐药细菌的出现,严重影响抗生素对感染性疾病治疗的成功率,了解AGs的耐药机制对耐药细菌感染性疾病的治疗以及新型AG药物的开发具有重大意义^[8]。本文集中阐述AGs耐药机制方面的研究进展。

1 核糖体修饰

1.1 核糖体突变

细菌核糖体由5S rRNA和23S rRNA及多种蛋白质组成的大亚基(50S)和小亚基(30S)组成。蛋白质翻译的步骤发生在核糖体的3个位点,E-、P-和A-位点。AGs与A位点结合,位于细菌小亚基的16S RNA上^[9-10]。最近晶体结构解析阐明AGs与大肠埃希菌16S RNA中高度保守的核苷酸碱基H44螺旋之间的结合,导致蛋白质翻译错误。一些含有2-DOS的AGs,如新霉素B(NEO)、庆大霉素(GEN)和巴龙霉素(PAR)还可以结合到23S RNA的H69螺旋上(图1),干扰了翻译和核糖体回收^[11]。

细菌通过16S rRNA编码基因*rrs*突变,阻碍AG的结合,产生AG抗性^[12]。如*rrs*基因A1408G的突变,破坏含有2-DOS的AGs和核苷酸A1048间的氢键作用产生AG抗性。在临床分离的耐药结核分枝杆菌中已经发现A1401G、C1402T和G1484T 3个*rrs*基因突变位点^[13-14]。除此之外,编码S12蛋白的基因突变也可提高结核分枝杆菌的抗链霉素活性。

1.2 甲基化酶修饰核糖体

除了突变之外,AG结合位点可以通过16S核糖

体RNA甲基化酶(Rmt酶)进行酶促修饰。放线菌产生Rmt酶,通过对自身16S RNA甲基化来保护核糖体免受自身产生的AG的抑制。

Rmt酶分为两类:1)外源性Rmt酶:主要通过修饰核苷酸G1405(RmtA, RmtB, RmtC, RmtD1, RmtD2, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH)的N7位甲基化基因和在A1408的N1位甲基化的基因(NPMA)产生AG抗性^[15]。N7-G1405 Rmt酶通过修饰核糖体使细菌对4,6-二取代的2-DOS AG,如阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、妥布霉素(TOB)和卡那霉素A(KANA)等抗生素具有耐药。N1-A1408 Rmt酶通过修饰核糖体是细菌对4,5-和4,6-二取代的含有2-DOS的AGs和对安普霉素(APR)产生pan-AG抗性(pan-aminoglycoside-resistance)^[15]。2)内源性Rmt酶:其三维结构与外源性Rmt酶相似。研究表明,内源性核糖体甲基化酶(如RsmH和RsmI)与外源性Rmt酶能共存,内源性甲基化酶在大肠埃希菌中使C1402位甲基化,修饰30S核糖体亚基^[17],当外源性Rmt酶存在时会阻碍C1402位甲基化作用,影响大肠埃希菌对氨基糖苷类抗生素的敏感性。研究发现,携带有RsmF酶的菌体具有更高的抗生素抗性,这也证实了内源性RsmF酶能够影响细菌对AGs的敏感性^[18]。

Rmt酶之间的结构相似性有助于开发多个靶向Rmt酶的抑制剂。因此,设计小分子抑制剂以克服Rmt酶的修饰作用,对于减缓AGs耐药性的研究至关重要。

2 AG修饰酶

氨基糖苷修饰酶(AMEs)的化学修饰作用是细菌产生AG耐药的最广泛的途径。根据AMEs对AGs的化学修饰作用,将其分为3个亚类^[19]:N-乙酰转移酶(AACs),O-核苷酸转移酶(ANTs)和O-磷酸转移酶(APHs)。AACs主要催化底物的乙酰化作用,根据它们对AG修饰部位的不同又分为4种酶:AAC(1)、AAC(3)、AAC(2')和AAC(6')。APHs对氨基糖苷分子上的磷酸盐基团进行催化,分为APH(2'')、APH(3')、APH(3'')、APH(4)、APH(6)、APH(7'')和APH(9)。ANTs修饰依赖于ATP的腺苷化,根据它们在底物氨基糖苷2'、3'、4'、6'和9位的化学修饰的区域,其可分为五种酶:ANT(2)、ANT(3)、ANT(4)、ANT(6)和ANT(9)^[20]。

每个AME在一个特定的位置修饰一个AG。此

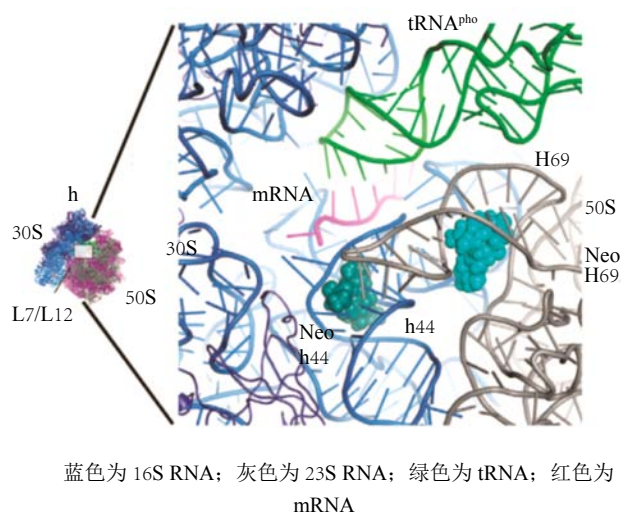


图1 新霉素在核糖体小亚基(H44)和大亚基(H69)上的结合位点

外, 在临床耐 AG 的菌株中发现一种双功能酶, 该酶的结构域的特点使得乙酰转移酶的活性域可以修饰 6'-NH₂, 还可以修饰 6'-OH, 磷酸转移酶虽然只能修饰羟基, 但其修饰位置有多个, 所以它的活性不受 AGs 的影响。如利维霉素中缺乏 6'-NH₂, 在双功能酶存在时, 细菌可以修饰 6'-OH 位点而被乙酰化^[21]。AMEs 基因大多位于可移动元件上, 常与其他抗性基因 (如 Rmt 酶或 β -内酰胺酶) 一起转移到质粒、整合子、转座元件上, 在致病菌中传播能力极强, 大部分致病菌通过水平基因转移获得抗性 AMEs 耐药基因^[22]。

近年来, AME 引起的耐药性的研究逐渐深入, 对抗菌药物的应用及研发新型药物有着极重要的意义。由于 AME 的协同组合作用, 导致细菌产生多种 AG 抗性, 目前新设计的抗菌剂有硫醚、烷基化和酰化的 AG 变体和异形二聚体、及侧链含有 AHB(fluorinated (S)-4-amino-2-hydroxybutyrate) 的 NEO 类似物等抗生素, 它们能够逃避多种 AME 的作用。同时研究表明了金属阳离子可以抑制 AAC 活性, 从而提高 AGs 对耐药菌株的作用^[23-25]。

3 细胞膜的修饰

AG 作用于细菌时, 必须穿过细菌的细胞壁。革兰阴性菌的细胞壁由内膜、肽聚糖层、磷脂双层和外膜 (OM) 组成。分枝杆菌有一个独特的细胞外壳, 由内膜组成, 接着是一层肽聚糖层, 与一层阿拉伯半乳糖相连, 并与高分子量分枝菌酸相连, 并被外层单层磷脂覆盖。这些多层细胞壁充当屏障, 为革兰阴性菌和分枝杆菌提供了对 AG 耐药性的先天机制, 细胞壁组合物的修饰可能导致对 AG 的渗透性更差^[26]。

OM 作为内在的第一道防线, 保护诸如 AG 等外来分子对革兰阴性菌作用。OM 向外的部分由带净负电荷的脂多糖 (LPS) 组成, 能吸引阳离子 AGs。LPS 的修饰作用等掺入带正电荷的阿拉伯糖, 有效的减少 LPS 层的净负电荷, 降低对 AGs 的亲和力^[27-28]。

孔蛋白通道含有大量的水, 允许亲水小分子的被动扩散。虽然已经研究了 β -内酰胺抗生素通过孔蛋白转运, 但在革兰阴性细菌中的通过孔蛋白的 AGs 转运尚不清楚^[29-30]。尽管目前还没有关于由孔蛋白变化引起的临床 AG 抗性的记录病例的报道, 但是孔蛋白表达变化可能产生较低的抗性机制, 因为它们也可能导致细菌对营养物质的摄取减少而增加药物的 MIC^[30]。

4 外排泵

细菌另一个抗 AG 的机制是通过主动外排系统的过量表达, 导致细菌对 AGs 耐药增强。但由于 AGs 的聚阳离子结构, 只有少数泵被证明可以转运出 AGs。其中, 革兰阴性菌的主要 AG 外排泵 AcrAD 是多药转运蛋白, 是 RND(resistance nodulation cell division) 家族的一员, 细菌通过 Acr AD 蛋白, 能够起到药物 - 质子逆向转运的作用。该家族还有 MexXY-OprM 系统等外排系统^[30]。

虽然外排泵对细菌产生 AG 耐药性的影响很低。但是慢性铜绿假单胞菌感染的囊纤维化患者的分离物中, 阻遏基因 *mex Z* 的突变导致的 MexXY 过表达, 从而产生 AG 耐药性。有研究已经证明了 AGs, 红霉素、四环素和甘氨酸环素可以诱导 Mex XY 的表达^[31-32]。

通过外排泵对 AG 耐药产生的机制设计抗生素来逃避或者阻断外排泵的作用已经成为开发新型抗生素的方向。

5 其他耐药机制

AGs 的作用之一是合成异常蛋白质, 扰乱细胞膜的完整性。膜蛋白酶是蛋白质生物合成质量控制的内在系统的一部分, 可识别和降解错误折叠和翻译的蛋白质。虽然传统上不被认为是抗性机制, 膜蛋白酶可以在一定程度上降低 AGs 的耐受性, 从而提高耐药性。铜绿假单胞菌中的膜蛋白酶 (Fts H) 的突变导致细菌对妥布霉素 (TOB) 的敏感性增加, 这表明 FtsH 在 AG 抗性中发挥作用^[33]。有研究发现, 当铜绿假单胞菌暴露于 TOB 时, 导致编码 Lon 型蛋白酶的 *asrA* 的表达以及热休克基因的表达增加, 细菌产生抗生素的适应性耐药^[34]。铜绿假单胞菌对 AG 的适应性耐药与其产生的生物膜有关^[35], 生物膜将细菌包围, 从而降低 AG 的作用。

6 结论

以上讨论的耐药机制对 AGs 的耐药作用程度不同, 且作用范围也不同。如 AME 通常只有对少数的 AG 底物 (如 GEN、TOB 或 AMK) 起作用, 而 RMTases 对许多的 AG 底物起作用。最具有威胁性的细菌种类具有多种抗性机制, 其多种抗性机制的影响是相加的。例如, 外膜作为限制 AG 摄取屏障的内在性质可以与其他抗性机制协同作用, 导致细菌高度的 AG 耐药性。

目前, 逃避细菌的 AG 抗性机制来设计药物是开发新药物的主要方向。20 世纪 70 年代设计了许多半合成衍生物, 包括阿贝卡星 (ABK)、异帕米星 (ISP)

等。虽然 ABK 和 ISP 仍然易受 RMT 酶和 AME 修饰,但是有时候不会被 AAC 修饰^[36],从而有效的降低耐药性。Plazomicin(PLZ)是西索米星(SIS)的衍生物,已经有研究显示其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和碳青霉烯耐药的肠杆菌(CRE)是有效的,它可以克服许多 AME 的作用,是目前抵抗抗生素耐药性的重要武器^[37]。

耐药性是一个重大的临床和公共卫生问题,一些医院内和社区获得性病原体已经对不同的抗生素产生了抗药性,使治疗更加复杂化。随着对 AGs 耐药机制的深入了解,设计能克服这些抗性机制的新型氨基糖苷类药物,将降低细菌耐药造成的全球健康危机的影响。

参考文献

- [1] Waksman S A. Antibiotic substances, production by microorganisms-nature and mode of action[J]. *Am J Public Health Nations Health*, 1944, 34(4): 358.
- [2] O'Shea R, Moser H E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: Implications for drug discovery[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(10): 2871-2878.
- [3] Becker B, Cooper M A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(1): 105-115.
- [4] 李明阳, 李勇, 王昉彤, 等. 氨基糖苷类抗生素肾毒性及生物标志物的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(2): 85-88.
- [5] Blair J M, Webber M A, Baylay A J, *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(1): 42-51.
- [6] Fernández L, Breidenstein E B M, Hancock R E W. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics[J]. *Drug Resist Updat*, 2011, 14(1): 1-21.
- [7] van Hoek A H, Mevius D, Guerra B, *et al.* Acquired antibiotic resistance genes: An overview[J]. *Front Microbiol*, 2012, 3(2): 384.
- [8] Kobayashi Y, Akiyama Y, Murakami T, *et al.* Aminoglycoside antibiotics: US, 9260465[P]. 2016-02-16.
- [9] 王雪玉. 利用糖芯片技术检测氨基糖苷类抗生素与 RNAs 和蛋白质之间的相互作用 [D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [10] Schroeder R, Waldsich C, Wank H. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics[J]. *EMBO J*, 2000, 19(1): 1-9.
- [11] Wasserman M R, Pulk A, Zhou Z, *et al.* Chemically related 4,5-linked aminoglycoside antibiotics drive subunit rotation in opposite directions[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7896.
- [12] Magnet S, Blanchard J. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance[J]. *Cheminform*, 2005, 105(2): 477-498.
- [13] Maus C E, Plikaytis B B, Shinnick T M. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(8): 3192-3197.
- [14] Georgioui S B, Magana M, Garfein R S, *et al.* Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: A systematic review[J]. *Plos One*, 2012, 7(3): e33275.
- [15] 费秋萍, 张顺, 蔡挺, 等. 外源性 16S rRNA 甲基化酶研究进展 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(7): 1674-1676.
- [16] Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update[J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(3): 133-148.
- [17] Gutierrez B, Douthwaite S, Gonzalezzorn B. Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of *Pseudomonas aeruginosa* rRNAs[J]. *Rna Biol*, 2013, 10(8): 1324-1332.
- [18] Gutierrez B, Escudero J A, San M A, *et al.* Fitness cost and interference of *Arm/Rmt* aminoglycoside resistance with the *RsmF* housekeeping methyltransferases[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(5): 2335-2341.
- [19] Ramirez M S, Tolmasky M E. Aminoglycoside modifying enzymes[J]. *Drug Resist Updat*, 2010, 13(6): 151-171.
- [20] 武灵芝, 胡栋, 秦猛. 氨基糖苷类修饰酶引起的细菌耐药性机制的研究进展 [J]. 生物物理学报, 2013, 29(1): 15-25.
- [21] 李聪然, 游雪甫, 蒋建东. 氨基糖苷类双功能修饰酶 AAC(6')-APH(2'') 的研究进展 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(6): 468-471.
- [22] Reeves A Z, Campbell P J, Sultana R, *et al.* Aminoglycoside cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* due to mutations in the 5' untranslated region of *whiB7*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 1857-1865.
- [23] Cox G, Stogios P J, Savchenko A, *et al.* Structural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenyltransferase ANT(2'')-Ia[J]. *Mbio*, 2015, 6(1): e02180-14.
- [24] Li Y, Green K D, Johnson B R, *et al.* Inhibition of aminoglycoside acetyltransferase resistance enzymes by metal salts[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(7): 4148-4156.
- [25] Maianti J P, Kanazawa H, Dozzo P, *et al.* Toxicity modulation, resistance enzyme evasion, and A-site X-ray structure of broad-spectrum antibacterial neomycin analogs[J]. *Acs Chem Biol*, 2014, 9(9): 2067-2073.
- [26] Li X Z, Plésiat P, Nikaido H. The Challenge of efflux-

- mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria[J]. *CMR*, 2015, 28(2): 337-418.
- [27] Fernández L, Gooderham W J, Bains M, *et al.* Adaptive resistance to the "Last Hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(8): 3372-3382.
- [28] Dong H K, Lu C D. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(5): 1615-1622.
- [29] Agafitei O, Kim E J, MAGuire T, *et al.* The role of *Escherichia coli* porins OmpC and OmpF in antibiotic cross resistance induced by sub-inhibitory concentrations of kanamycin[J]. *JEMI*, 2010, 14: 34-39 .
- [30] Fernández L, Hancock R E W. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance[J]. *CMR*, 2012, 25(4): 661-681.
- [31] 杨祚明, 谭孟源, 符春花, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌外排泵基因表达与耐药表型和耐药程度的关系 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(1): 86-88.
- [32] TBrake L H M T, Knecht G J D, Steenwinkel J E D, *et al.* The role of efflux pumps in tuberculosis treatment and their promise as a target in drug development: Unraveling the black box[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2018, 58(1): 271-291.
- [33] Hinz A, Lee S, Jacoby K, *et al.* Membrane proteases and aminoglycoside antibiotic resistance[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(18): 4790-4797.
- [34] Kindrachuk K N, Fernández L, Bains M, *et al.* Involvement of an ATP-dependent protease, PA0779/AsrA, in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5): 1874-1882.
- [35] Lau C H, Hughes D, Poole K. MexY-promoted aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a putative proximal binding pocket in aminoglycoside recognition[J]. *Mbio*, 2014, 5(2): e01068.
- [36] Almaghrabi R, Clancy C J, Doi Y, *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin and other agents[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4443-4451.
- [37] Garcíasalguero C, Rodríguezavial I, Picazo J J, *et al.* Can plazomicin alone or in combination be a therapeutic option