

环境放线菌中的达托霉素抗性机制

廖国建[#], 赵燕莉[#], 徐康力, 李丹, 代禄丹, 胡昌华^{*}

西南大学药学院, 现代生物医药研究所, 重庆 400715

摘要: 【目的】研究环境放线菌中的达托霉素抗性机制, 为临床耐药机制的出现提供预警。【方法】通过测定土壤放线菌(49株)和药用植物内生放线菌(10株)的达托霉素耐受谱, 筛选达托霉素抗性菌株; 通过达托霉素灭活实验, 确定抗性菌株的灭活能力; 通过形态观察和16S rRNA序列分析分类鉴定达托霉素降解菌。通过PCR扩增检测达托霉素去酰基化酶基因在降解菌株中的分布情况。【结果】本研究中所有的环境放线菌均耐受达托霉素。在土壤放线菌中和药用植物内生放线菌中, 分别有24株(49.0%)和4株(40%)能够灭活达托霉素, 25(51.0%)株和6株(60%)通过其他机制耐受达托霉素。序列测定表明, 链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)的部分菌株有灭活达托霉素的能力。PCR扩增表明, 5株(17.9%)放线菌含有编码达托霉素去酰基酶的基因。【结论】环境放线菌具有超高的达托霉素抗性频率, 灭活达托霉素是主要抗性机制之一。

关键词: 达托霉素, 链霉菌, 抗性机制, 灭活

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)02-0210-07

达托霉素(daptomycin)是2003年上市的一种新型脂肽类抗生素, 对大部分革兰氏阳性致病菌, 包括耐药菌, 如耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素的肠球菌(VRE)都有强力的杀菌作用^[1]。达托霉素已经成为对抗日益严重的耐药菌感染的重要抗菌药物。达托霉素是由玫瑰孢链霉菌(*Streptomyces roseosporus*)产生的次级代谢产物, 由13个氨基酸组成, 通过内部苏氨酸的羟基和犬尿氨酸的羧基形成酯键而成环, 氨基末端的色氨酸上连接了C₁₀的脂肪酸(癸酸)(图1)^[2]。脂肪酸侧链是达托霉素发挥抗菌所必需的结构。达托霉素

的作用机制是在钙离子存在的条件下, 插入到革兰氏阳性敏感菌的细胞膜中, 导致细胞的去极化, 细胞内容物外排, 最终导致细胞死亡^[3]。迄今为止, 达托霉素耐药性的发生率在临床上相当罕见。

最近, 大量证据表明土壤放线菌不仅是重要的抗生素产生菌也是耐受抗生素的耐药菌^[4]。土壤细菌中的抗性基因能够通过水平基因转移等方式转移到人类致病菌中, 如影响氨基糖苷抗生素活性的核糖体甲基化酶(ArmA, RtmB)^[5]。研究土壤细菌的抗性机制有充当新临床耐药机制出现时的预警系统的潜力, 并指导下一代抗生素的开发^[6]。在本文

基金项目: 微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题资助(SKLMR-20120602); 重庆市自然科学基金项目(cstc2012jjA10149); 国家大学生创新实验计划资助(201210635076, 201210635080)

^{*} 通信作者。Tel: +86-23-68250550; E-mail: chhhu@swu.edu.cn

作者简介: [#]对本文有同等贡献。廖国建(1981-)四川人, 博士, 副教授, 主要从事微生物来源新药开发研究, E-mail: guojianliao@yahoo.com.cn; 赵燕莉(1987-), 女, 四川人, 硕士研究生, 主要从事微生物次级代谢产物研究, E-mail: 1987zhaoyl@sina.com.cn

收稿日期: 2012-08-30; 修回日期: 2012-11-14

中,我们研究了土壤放线菌和药用植物内生放线菌的达托霉素抗性机制,希望能为达托霉素临床耐药

的出现提供预警。

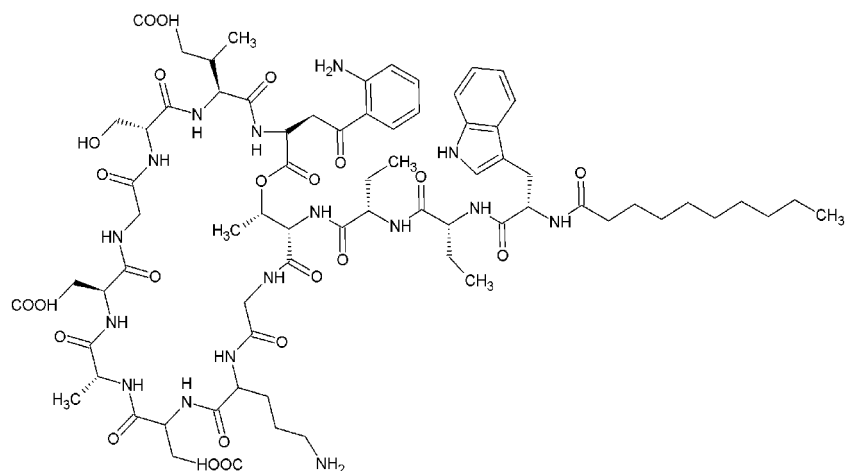


图 1 达托霉素的化学结构式

Fig. 1 The chemical structure of daptomycin.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 本研究所使用的放线菌为本实验室保藏。他们是土壤放线菌和药用植物内生放线菌(表 1)。

表 1 本研究采用的放线菌及其分离源

Table 1 The actinomycetes used in this study and their origin

Source	Amount
Lime rock	25
Vegetable field soil	24
Taxus chinensis endophytes	5
Camptotheca acuminata endophytes	5

1.1.2 培养基: SIM 培养基和 LB 培养基参见文献 [4]。

1.1.3 引物: 本研究中所使用的引物见表 2。

表 2 本研究中所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Size /bp
16S rRNA-27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20
16S rRNA-1525R	AAGGAGGTGWTCCARCC	17
dpa-F1	GCGGCGAGCGCTCCCGSTRSTTCGG	25
dpa-R1	AAGGGGACGCCGGTGGMSACSGTGTG	26

1.1.4 主要试剂和仪器: 达托霉素购自 Sigma 公司,其他常规试剂均为国产分析纯产品,购自北京鼎

国公司。引物由上海 Invitrogen 生物公司合成;DNA 测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。PCR 相关试剂由北京全式金公司提供;恒温摇床和生化培养箱(上海智诚分析仪器制造有限公司);PCR 扩增仪(Bio-Rad Mycycler)。

1.2 环境放线菌的达托霉素抗性谱

环境链霉菌达托霉素抗性谱的确定参照文献 [4]。抗性谱通过 96 孔板检测确定。抗性平板每孔内加入含有 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 达托霉素的 200 μL SIM 培养基(含有 1.5×10^{-3} mol/L CaCl_2),对照平板中每孔不加入抗生素。每个孔中加入 10 μL 冻存的孢子悬液后,在 30 $^\circ\text{C}$ 下培养 4-5 d。如果在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 达托霉素浓度下菌体能够生长,则表明菌株具有抗性。筛选出的抗性菌株,重复上述筛选过程,并将耐受菌株接种到 SIM 固体培养基上,观察菌株的生长情况,以确定菌株耐受达托霉素。

1.3 达托霉素灭活实验

往 200 μL 含有 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 达托霉素的 SIM 培养基中加入 0.5 μL 抗性菌株孢子悬液,在 30 $^\circ\text{C}$, 220 r/min 条件下培养 3 d。对照包括仅含有培养基(阴性对照),以及加入达托霉素而未接种菌株的培养基(阳性对照)。培养结束后,离心 1 min 收集培养物上清。以藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)为达托霉素敏感测试菌,通过纸片扩散实验测定达托霉素的含量。通过观察抑菌圈的消失来筛选潜在的达托霉素降解菌株。灭活实验重复 3 次。

1.4 放线菌基因组 DNA 提取和系统进化分析

放线菌的基因组 DNA 提取按照文献 [7] 的方法。16S rRNA 基因扩增的引物为 16S rRNA-27F/16S rRNA-1525R (表 2)。PCR 反应体系采用的是 25 μL 的反应体系,包括均为 0.4 μL 的 0.01 mol/L 的引物, 2.5 μL 10 \times buffer, 2.5 μL 的 2.5×10^{-6} mol/L dNTP, 0.3 μL DNA 聚合酶和 0.3 μL 的基因组 DNA。PCR 程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析,回收后连接至 T 载体,转化,测序。所得序列用 CLUSTALX 进行多重序列比对,并运用 MEGA 5.0 采用邻位相连法构建系统发育树。系统发育树选用 Bootstrap 验证,重复次数为 1000 [8]。

1.5 PCR 扩增筛选产达托霉素去酰基化酶菌株

达托霉素去酰基化酶产生菌的筛选采用的引物

为 dpa-F1 /dpa-R1 (表 2)。PCR 反应体系和 PCR 程序与 16S rRNA 基因扩增相同,唯一差异在于退火温度变为 65 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 产物用 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 达托霉素耐受环境放线菌筛选策略

环境放线菌通常能够产生各种抗菌物质,因此其培养上清可能杀死测试菌藤黄微球菌。为了排除这种可能性,我们首先对实验室保存的环境放线菌进行初筛,去除在 SIM 培养基中产生杀灭藤黄微球菌抗生素的菌株。通过初筛,选择出形态各异的 59 株环境放线菌,其中 49 株是土壤放线菌,10 株是药用植物内生菌。达托霉素抗性谱筛选表明(图 2),59 株菌株都能够耐受达托霉素,耐受比例高达

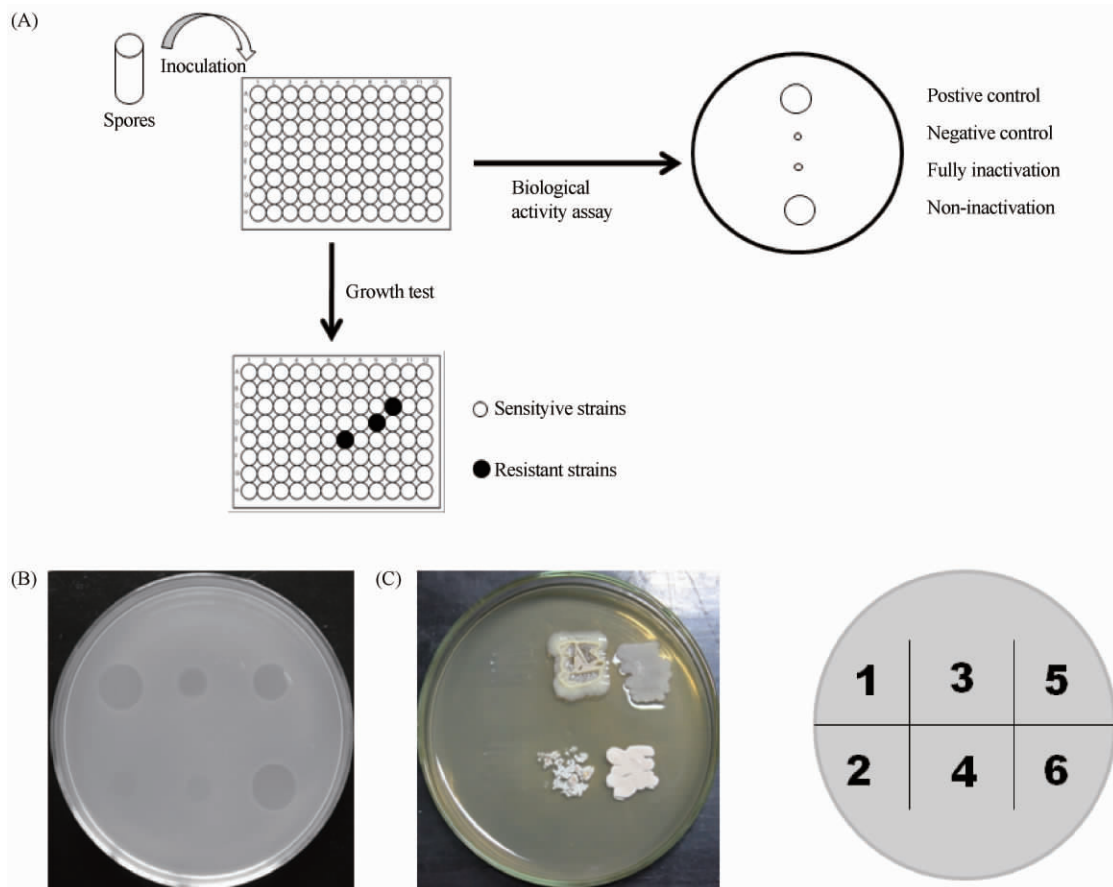


图 2 达托霉素耐受环境放线菌筛选策略及其结果

Fig.2 Schematic diagram of screening steps for daptomycin-resistant environmental actinomycetes and selected results. A: Screening process of daptomycin-resistant and daptomycin-degradation environmental actinomycetes; B: Screening result of daptomycin-degradation environmental actinomycetes; C: Screening result of daptomycin-resistant environmental actinomycetes. 1. Culture with daptomycin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 2. Culture only; 3 - 4. Daptomycin full degradation strains; 5. Daptomycin part degradation strains; 6. Daptomycin-resistant strain.

100%。微生物能够通过多种机制耐受抗生素,如水解失活,抗生素外排,靶位点突变等^[9]。为了研究环境放线菌的耐受机制,我们采用了达托霉素灭活实验来确定环境微生物是否通过灭活达托霉素而产生耐受性。研究发现,28株(57.1%)放线菌与达托霉素培养后,达托霉素抑菌圈完全消失,表明达托霉素灭活;21株(42.9%)放线菌与达托霉素培养后,抑菌圈无明显变化,表明菌株通过其他方式耐受达托霉素。49株土壤放线菌中,24株(49.0%)灭活达托霉素,25(51.0%)株通过其他机制耐受达托霉素,而在10株药用植物内生放线菌中,则分别是4株(40%)和6株(60%)。

2.2 灭活菌株的多样性分析

为了分析灭活菌株的组成情况,我们挑取了在实验条件下能够完全降解达托霉素14株放线菌(11株土壤放线菌和3株药用植物内生放线菌)进行16

S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序。序列分析表明,14株放线菌分别属于链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*),其中11株为链霉菌,2株属于小单孢菌,1株属于诺卡氏菌。基于16S rRNA基因序列构建的N-J系统发育树,由图可见(图3),11株链霉菌分成明显不同两簇,分别与*Streptomyces chattanoogensis*和*S. phaeochromogenes*亲缘关系最近。小单孢菌则与*Micromonospora globosa*亲缘关系最近,诺卡氏菌则与*Nocardia abscessus*亲缘关系最近。11株土壤放线菌中10株为链霉菌(swu1-007, 008, 009, 013, 015, 016, 030, swu1-B10, 15, 23),1株为诺卡氏菌(swu1-005),而3株植物内生放线菌则是链霉菌(swu1-s003)和小单孢菌(swu-s001, s002)。序列分析表明,达托霉素灭活菌株有较为丰富的菌种多样性。

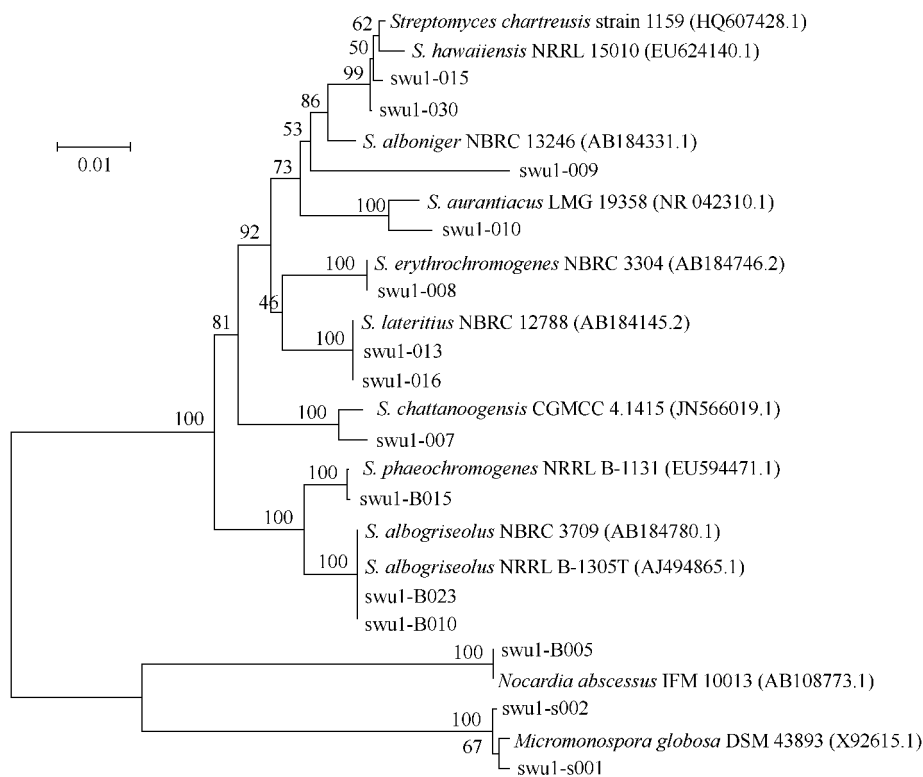


图3 菌株16S rRNA基因序列的系统发育N-J树

Fig. 3 Phylogenetic N-J tree based on partial 16S rRNA gene sequences showing the positions of isolates. Bootstrap values (%) based on 1000 resampled data sets are shown at the nodes. The scale bar represents 0.01 substitutions per site.

2.3 PCR 扩增检测达托霉素去酰基化酶基因

放线菌对达托霉素的灭活有多种途径,其中达托霉素的去酰基化是发现最早,研究较为透彻的一种。达托霉素去酰基酶已经从游动放线菌

(*Actinoplanes utahensis*)中被克隆和表达,研究发现此酶属于青霉素去酰基酶家族^[10]。根据文献报道的达托霉素去酰基酶氨基酸序列,检索NCBI数据库和下载相应序列,并通过Clustal W进行多序列比

对,选择保守氨基酸区域设计简并引物。比对分析发现,玫瑰孢链霉菌和产生钙依赖抗生素(CDA)的天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)不含达托霉素去酰基酶,而氯霉素产生菌委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae*)含有同源基因,生物活性测定也表明,该菌能够完全

灭活达托霉素(结果未显示)。因此 PCR 扩增以玫瑰孢链霉菌和天蓝色链霉菌基因组作为阴性对照,以委内瑞拉链霉菌基因组作为阳性对照,PCR 扩增检测灭活菌株中达托霉素去酰基酶基因的分布情况(图4)。

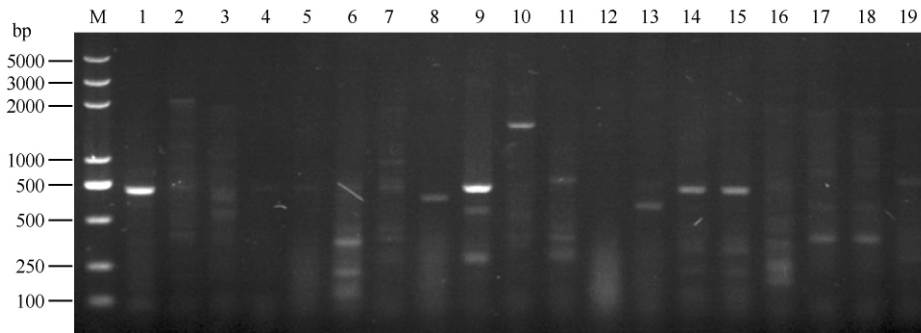


图4 PCR 扩增检测灭活菌株中达托霉素去酰基化酶基因的分布

Fig. 4 PCR analysis of the distribution of daptomycin acylase encoding gene in daptomycin inactivating actinomycetes. M. DNA marker. 1. *S. venezuelae*; 2. *S. roseosporus*; 3. *S. coelicolor*; 4. sterile water; 5 - 19. daptomycin inactivating actinomycetes.

PCR 扩增结果表明,28 株达托霉素灭活菌株中,有 5 株能够扩增出目的条带。除了 3 株链霉菌(*swu1-B015*, *swu1-013*, *016*)外,两株小单孢菌(*swu-s001*, *s002*)也能够扩增出目的条带,然而诺卡氏菌(*swu1-B005*)却扩增不出目的条带,暗示此菌通过其他途径灭活达托霉素。

表明达托霉素酶活菌株广泛存在于土壤微生物中。

3 讨论

达托霉素是一种重要的治疗耐药革兰氏阳性菌感染的抗生素,其临床耐药比例很低,仅见一些零星的报道^[11-13]。然而,本研究表明环境放线菌中达托霉素的耐受比例高达 100%,这与 D' costa 等的报道一致^[4]。D' costa 等研究发现土壤链霉菌普遍耐受达托霉素,其中 80% 的耐受菌株能够灭活达托霉素。我们的研究表明,除了土壤链霉菌外,土壤小单孢菌和诺卡氏菌也能灭活达托霉素。此外,植物内生放线菌也具有很强的达托霉素灭活能力,这可能源于很多植物内生菌来自植物周围的土壤的缘故。本研究中 47.4% 的环境链霉菌能够灭活达托霉素,低于 D' costa 的报道,其原因可能在于链霉菌分离自不同的土壤,链霉菌的组成不同;在植物内生放线菌中,灭活菌株比例较低。此外,本实验室的最近研究表明,除了土壤放线菌外,其他土壤细菌,如枯草芽孢杆菌也能够灭活达托霉素(另文报道),这

研究表明达托霉素的灭活主要通过两种方式,即达托霉素环的线性化和脂肪酸侧链的去酰基化^[6]。达托霉素去酰基酶已经从游动放线菌(*Actinoplanes utahensis*)中被克隆和表达,研究发现此酶属于青霉素去酰基酶家族,是一种具有广泛底物特异性的异二聚体蛋白^[10]。除了达托霉素外,其他脂肽抗生素如棘白霉素 B 和糖脂肽抗生素替考拉宁是其底物。序列分析表明,放线菌基因组中存在大量候选编码达托霉素去酰基酶基因的同源序列,然而在玫瑰孢链霉菌和天蓝色链霉菌等产生环脂肽的放线菌,则无此基因的同源体,暗示脂肽产生菌在进化过程丢失此酶,以避免产生的脂肽被降解失活。虽然,达托霉素去酰基酶基因同源序列在放线菌中广泛分布,然而未见在小单孢菌中的报道。本文首次报道了此基因也分布在小单孢菌中。分离的灭活菌株中,仅有 18% 的菌株可能通过达托霉素的去酰基化使其失活,更多菌株的失活机制尚待研究。最近有研究表明链霉菌(*Streptomyces* WAC4713)能够通过水解达托霉素的犬尿氨酸和苏氨酸之间的酯键而导致达托霉素线性化^[6]。生化分析表明,此水解酶是一种丝氨酸蛋白酶,虽然编码基因尚不清楚,但是这个结果暗示水解酯键可能是达托霉素灭活的重要途径。

阐明环境放线菌的达托霉素耐受机制有潜在的

临床意义。最近的研究表明, 与环境放线菌类似, 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和临床分离的诺卡氏菌 (*Nocardia*) 也耐受达托霉素^[14-15]。本研究也发现诺卡氏菌 (swu1-B005) 能够灭活达托霉素, 深入揭示环境放线菌中的灭活的分子机制有助于致病放线菌中耐受机制的阐明和开发对这些菌株有活性的达托霉素衍生物。

参考文献

- [1] Kosmidis C, Levine DP. Daptomycin: pharmacology and clinical use. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2010, 11:615-625.
- [2] McHenney MA, Hosted TJ, Dehoff BS, Rosteck PR, Jr., Baltz RH. Molecular cloning and physical mapping of the daptomycin gene cluster from *Streptomyces roseosporus*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180:143-151.
- [3] Baltz RH. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13:144-151.
- [4] D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 2006, 311:374-377.
- [5] Canton R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009, 15 Suppl 1:20-25.
- [6] D'Costa VM, Mukhtar TA, Patel T, Koteva K, Waglechner N, Hughes DW, Wright GD, De Pascale G. Inactivation of the lipopeptide antibiotic daptomycin by hydrolytic mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56:757-764.
- [7] Liao G, Li J, Li L, Yang H, Tian Y, Tan H. Selectively improving nikkomycin Z production by blocking the imidazolone biosynthetic pathway of nikkomycin X and uracil feeding in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8:61.
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24:1596-1599.
- [9] Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, Jacoby GA, Kishony R, Kreiswirth BN, Kutter E, Lerner SA, Levy S, Lewis K, Lomovskaya O, Miller JH, Mobashery S, Piddock LJ, Projan S, Thomas CM, Tomasz A, Tulkens PM, Walsh TR, Watson JD, Witkowski J, Witte W, Wright G, Yeh P, Zgurskaya HI. Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9:894-896.
- [10] Inokoshi J, Takeshima H, Ikeda H, Omura S. Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from *Actinoplanes utahensis* and expression in *Streptomyces lividans*. *Gene*, 1992, 119:29-35.
- [11] Arias CA, Panesso D, McGrath DM, Qin X, Mojica MF, Miller C, Diaz L, Tran TT, Rincon S, Barbu EM, Reyes J, Roh JH, Lobos E, Sodergren E, Pasqualini R, Arap W, Quinn JP, Shamoo Y, Murray BE, Weinstock GM. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 365:892-900.
- [12] Bertsche U, Weidenmaier C, Kuehner D, Yang SJ, Baur S, Wanner S, Francois P, Schrenzel J, Yeaman MR, Bayer AS. Correlation of daptomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55:3922-3928.
- [13] Rubio A, Conrad M, Haselbeck RJ, G CK, Brown-Driver V, Finn J, Silverman JA. Regulation of mprF by antisense RNA restores daptomycin susceptibility to daptomycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55:364-367.
- [14] Lai CC, Tan CK, Lin SH, Liao CH, Chou CH, Hsu HL, Huang YT, Hsueh PR. Comparative in vitro activities of nemonoxacin, doripenem, tigecycline and 16 other antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides* and unusual *Nocardia* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, 64:73-78.
- [15] Bastian S, Brossier F, Wichlacz C, Jarlier V, Veziris N. Daptomycin is not active against rapidly growing mycobacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59:135-136.

Characterization of daptomycin-resistance in environmental actinomycetes

Guojian Liao[#], Yanli Zhao[#], Kangli Xu, Dan Li, Ludan Dai, Changhua Hu^{*}

Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] Daptomycin-resistance in environmental actinomycetes was studied to provide warning systems for emerging clinical resistance. [Methods] In total 49 soil and 10 endophytic actinomycetes were used in this study. The daptomycin resistant strains were identified by measuring daptomycin resistance profile. Subsequently, daptomycin inactivating assay was performed to distinguish resistance from other nondestructive mechanisms. Then, the strains of interest were determined by morphology and 16S rRNA gene sequence analysis. Finally, PCR analysis was used to detect the daptomycin acylase gene (*dpa*) encoding daptomycin acylase in those strains [Results] All strains tested in this study were resistant towards daptomycin. Of them 24 soil actinomycetes and 4 endophytic actinomycetes had the ability to inactivate daptomycin, while the remaining strains used other measures to confer resistance. Sequence analysis demonstrated that strains inactivating daptomycin were *Streptomyces*, *Micromonospora* and *Nocardia*. PCR analysis shows that 17.9% strains contained the *dpa*. [Conclusion] There is very high percentage of resistance in environmental actinomycetes and inactivating daptomycin is one of the main resistant mechanisms.

Keywords: daptomycin, streptomyces, resistant mechanism, inactivation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (SKLMR-20120602), by the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (cstc2012jjA10149) and by the National innovation experiment program for university students (201210635076, 201210635080)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-23-68250520; E-mail: chhhu@swu.edu.cn

[#]These authors contributed equally to this work.

Received: 30 August 2012/Revised: 14 November 2012

微生物学一直是生命科学中领先的学科

微生物学学科的研究对象决定了它有如下两方面的显著特点:

微生物作为最简单的生命体而成为生命科学研究不可替代的基本材料,由此也奠定了微生物学在生命科学中的基础地位;

微生物极其丰富的生物多样性决定了它们具有代谢产物多样性,同时又与人类、动植物和环境有着密切的相互作用,使得微生物学也成为应用领域里十分活跃的一门学科。

摘自《国家自然科学基金1999年度项目指南》