

抗菌肽耐药性研究进展

陈福 罗玉萍* 龚熹 李思光

(南昌大学生命科学学院 南昌 330031)

摘要: 抗菌肽是生物体产生的一类具有抵抗外源性病原体功能的小分子多肽, 具有抗细菌、真菌、病毒、癌细胞等多种活性。近几年的研究发现细菌会对抗菌肽产生耐药性。本文就细菌的构成性耐药性机制和诱导性耐药性机制等研究进展进行综述。

关键词: 抗菌肽, 构成机制, 诱导机制, 耐药性

Mechanism of Antimicrobial Peptide Resistance

CHEN Fu LUO Yu-Ping* GONG Xi LI Si-Guang

(College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031)

Abstract: Antimicrobial peptides are a class of small peptides with anti-extrogenous pathogen activities. They are derived from organism and possess antibacterial, antifungus, antiviruses and anticancer cell actions. In recent years, it's found that some microbial pathogens are able to resist antimicrobial peptides. The constitutive and inducible mechanism of a pathogen resists a given peptide were reviewed in this paper.

Keywords: Antimicrobial peptides, Constitutive mechanism, Inducible mechanism, Resistance

自然界生物对抗有害微生物最古老的方法之一, 就是产生能破坏微生物细胞膜的抗菌肽(AMPs, Antimicrobial Peptides)^[1]。一些细菌或古生菌^[2]、原生动物^[3]、植物(植物防御素)^[4]及动物^[1]都能产生AMPs, 因此AMPs的种类繁多, 作用机制也多种多样。

抗菌肽因具有广谱、高效的抗菌活性, 以及不易产生耐药性等优点, 有望成为抗生素的良好替代品。然而抗生素的广泛使用导致了细菌的耐药性, AMPs也面临同样的问题。现已证明金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)可以对防御素和一些人源AMPs产生耐药性。*S. aureus*的耐药性机制是高度特异性地针对特定宿主的防御肽和细菌素或者阳离子抗菌肽(CAMPs, Cationic Antimicrobial Peptides)^[5]。AMPs药物的广泛使用是否会降低我们的防御体系对

微生物病原体的敏感性? 因此, 研究细菌对AMPs耐药性的机制有助于进一步了解AMPs的作用机制, 也有利于研制基于AMPs的新型抗菌药物。本文就病原体对AMPs耐药性的最新研究进展做综述。

病原体对AMPs产生耐药性主要有两个机制: 构成性耐药性(constitutive mechanisms of resistance)和诱导性耐药性(inducible mechanisms of resistance)。构成性耐药性机制取决于生物体本身的结构特征, 这些结构使得微生物先天性地对某些抗菌物质不敏感, 即这种机制是先天性的, 与AMPs是否出现无关。诱导性耐药性机制是由于AMPs或者细胞应激反应因子触发病原体产生的一种耐药性机制。这两种耐药性机制是相互协调的一个系统, 他们共同作用提高了病原体在各种环境中存活的可能性^[6]。

1 构成性耐药性机制

1.1 细菌内在的耐药性

一些AMPs是通过与病原体表层的靶因子相互作用而产生抗菌效果。当微生物病原体具有非标准的多糖-蛋白质复合物或者磷脂组分时,这些病原体就可能先天性地缺乏与AMPs的静电亲和力,甚至排斥AMPs。例如:某些葡萄球菌细胞膜上带负电的结构相对较少;Cashman等发现肠球菌对CAMPs的一个嵌板和重金属离子具有广泛的排斥性。此外,他们还在临床分离的肠球菌中发现:糖肽敏感菌株对CAMPs和被氧化的金属离子的抗性不强;反之,对糖肽不敏感的菌株却能很好地抵抗CAMPs和被氧化的金属离子。这个发现说明,病原体产生对AMPs的耐药性是以抑制自身一些不重要因子的功能为代价的^[7]。

系统发生的观察报告也支持这一观点:多种微生物拥有抵抗AMPs的结构特征。Bayer等比较了遗传上相关而对tPMP-1敏感性和抗性不同的*S. aureus*菌株的膜结构和功能参数。他们发现:具有耐药性的菌株与敏感菌株相比,前者的细胞膜含有更多的不饱和膜脂质,且膜流动性更高。这些数据说明细胞膜结构的改变导致*S. aureus*产生内在耐药性。因此,微生物先天性的磷脂膜结构特征是微生物形成构成性耐药性的基础^[8]。

1.2 改变膜能量

多种AMPs的抗菌活性已被证明会受到靶菌株的生长期或者跨膜电势影响。跨膜电势对一些AMPs来说很重要,因为它们通过与病原菌的细胞膜反应而产生抑菌作用。已发现*S. aureus*在生物能和电势降低的生长期对一些AMPs的敏感性降低^[9]。

1.3 静电屏蔽

多种致病菌和真菌病原体依靠荚膜或者糖被附着于宿主组织,从而避免被吞噬或者因蠕动而脱离。很多革兰氏阳性球菌病原体的糖被是由糖类、负电性的藻酸盐和磷酸盐组成。海藻酸是一种天然多糖,由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古罗糖醛酸两种单体通过1,4-糖苷键连接而成。它可以与钠离子或钾离子结合为海藻酸钠或海藻酸钾,也可以与多种二价和三价阳离子结合,形成海藻酸钙和海藻酸胺等。海藻酸分子还可以与二价阳离子如 Ca^{2+} 结合相交连而凝胶化,凝胶化会加固所结合的 Ca^{2+} ^[10]。因

此,微生物荚膜上负电性的海藻酸盐可以结合CAMPs,且海藻酸盐凝胶化后也可以阻止CAMPs到达病原体外膜。微生物通过这些结构可以很好地阻止CAMPs到达细胞膜,从而抑制CAMPs的抗菌作用。此外,高浓度的一价和二价阳离子也可以抑制AMPs的活性^[6]。相同的AMPs抗性机制在其他的呼吸道或者黏膜病原体的荚膜或者生物膜上都存在,这些病原体包括:*Klebsiella*、*Haemophilus*、*Streptococcus*、*Legionella*、*Staphylococcus species*和*Bacillus anthracis*^[11]。

1.4 小环境特异性耐药性

小环境特异性耐药性(niche-specific mechanisms of resistance)整合了很多种前面所提到的构成性耐药性。

一些病原体通过形成小环境或者利用宿主解剖学、生理学上的小环境而对原本敏感的AMPs产生抗性。例如:*S. aureus*的小菌落突变型因缺乏电荷运输的能力而具有较低的跨膜电势($\Delta\psi$),所以它们亲和阳离子AMPs的能力普遍降低,这使得它们对阳离子AMPs的抗性比同源的其他菌株强,并使得它们能在血管内及细胞中的小环境中存活^[12]。

此外,微生物利用宿主一些特殊的结构来制约AMPs的作用。最近研究发现绿脓假单胞菌会优先在渗透性和离子强度异常的组织中繁殖;在*S. aureus*或*C. albicans*感染性心内膜炎的研究中发现:病原体在不同器官中的增殖情况不同^[6]。在心脏和脾脏中,对tPMP-1敏感的路原体与耐药性菌株相比,前者的繁殖速度较慢;而肾脏中这种差别不存在。这说明tPMP-1在高离子强度下活性会降低,因为肾脏中离子强度较心脏和脾脏高。这些现象表明有部分病原体能利用宿主特殊组织或者生理结构来躲避宿主AMPs的防御作用。

2 诱导性耐药性

很多病原体已经进化出一系列对抗机制用于抑制或者扰乱宿主包括AMPs在内的多样的防御机制。适应性反应(大肠杆菌中的DNA修复系统)就是其中的一种,它来自于对毒性因子的快速诱导反应和对慢性毒性因子的敏锐的求生反应。此外,很多AMPs抗性机制代表了微生物对特定AMPs作用机制的直接抵抗。

2.1 微生物对 AMPs 的应激协同反应

微生物在含有 AMPs 的环境中已进化出快速而保守的抗性机制,但是这些机制之间也可以相互协调、共同作用。

PhoP/PhoQ 调节子在革兰氏阴性细菌中的作用就是产生球蛋白、磷脂和脂多糖的修饰子以削弱 AMPs 的作用。很多实验室发现 PhoP/PhoQ 系统在沙门氏菌(*Salmonella*)中是激活基因转录的重要组成部分。PhoP/PhoQ 系统可激活特定的表面蛋白和酶的表达,这些蛋白和酶可以修饰外膜脂多糖、脂质和蛋白质成分,以及降解特定 AMPs^[6]。PhoP/PhoQ 系统可以调控 pag(phoP-activated genes) 和 prg(phoP-repressed genes) 基因簇,这两个基因簇可以提高抵抗 AMPs 物质的表达量,并且抑制易受 AMPs 损害的结构和功能物质的表达。

PmrA/PmrB 是一个双组分调控系统,它们协调 PmrE、PmrH、PmrF、PmrI、PmrJ、PmrK 和 PmrL 等基因的表达,这些基因可以合成并连接氨基阿拉伯糖到革兰氏阴性菌外膜的脂类 A 上,增加外膜的正电荷电量以提高对 CAMPs 的抗性^[6]。

PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 两个不同的调节系统有可能在减弱 AMPs 作用效果及外膜表面的修饰功能上相互补充。比如, pagB 与 PmrA/PmrB 相互作用可以激活 2 个调节系统。因为, PagB 激活了 pmrA-pmrB 操纵子使 *Salmonella* 具有抵抗多种 AMPs (包括了:多粘菌素 B、天青杀素、鱼精蛋白等)的能力;而 PhoP/PhoQ 调控 pagP 编码酰基转移酶来催化脂质 A 的十六(烷)酰化,这个外膜的修饰可以阻止 AMPs 接近细胞膜。两个调节系统通过脂类 A 的修饰和分泌蛋白酶,协同扰乱了 AMPs 的抗菌作用。其他一些病原体(如致病真菌)也可通过类似的机制避开 AMPs 的作用。

2.2 蛋白酶和多肽酶介导的耐药性

在革兰氏阴性细菌病原体的研究中,发现蛋白酶可以介导病原体对 AMPs 的耐药性。正如上文所述,PhoP/PhoQ 系统可调控细菌抵抗 AMPs 的途径。这些途径中, PgtE 是沙门氏菌的一个外膜肽链内切酶,它有着与 *E. coli* 的外膜蛋白酶家族 OmPT 或者蛋白酶 VII 以及耶尔森菌(*Yersinia*)的 Pla 相似的结构。这些蛋白酶可以切割肽链的特异性片段,多种两性 and 阳性 AMPs 是 PgtE 酶的潜在底物。

鱼精蛋白是从鲑鱼中提取出来的一种可以和

DNA 结合的 CAMPs, Stumpe 等在 1998 年证明:在鱼精蛋白存在的条件下, OmPT 的表达可以增大 *E. coli* 的存活几率^[13]。*E. coli* 突变后因缺失 *degP*、*ptr*、*OmPT* 蛋白酶基因会对鱼精蛋白产生过度敏感,而将带有 *OmPT* 的质粒转化入这个突变体,这种敏感性将会消失。此外, OmPT 可以在低或者高浓度的 Mg^{2+} 环境中降解鱼精蛋白,但在高离子强度下分解速度会降低。这说明 OmPT 分解 AMPs 的功能是在 *E. coli* 的胞外进行的,这也为 *E. coli* 提供了一个重要的生存优势——对抗人体先天的免疫防御系统^[14]。在 *S. aureus* 和 *E. coli* 中,其他的一些蛋白酶也会参与抵抗 AMPs。但是,某些 AMPs 也会对蛋白酶的水解作用产生抗性。

此外,高等生物体内的病原体分泌的蛋白酶可以降解附着于成纤维细胞上的蛋白聚糖。这些蛋白聚糖包含的硫酸皮肤素会被降解并散布于病原体的周围。这些碎片能中和来自骨髓的 α -防卫素。

2.3 胞外结构的修饰

在革兰氏阴性菌中,修饰类脂 A 和脂多糖被认为是抗 AMPs 最常见的机制。这些诱导反应包括:类脂 A 的酰化^[15]、类脂 A 的 4-氨基-4-脱氧-L-阿拉伯糖和十六酸盐衍生物等,这些在 *E. coli* 和 *Salmonella* 中都很相似^[16]。假单胞菌中的氨基阿拉伯糖脂多糖菌株拥有纤维化囊和脂多糖的十四烷基化^[17],这些现象说明微生物病原体可通过多种途径改变它们的表面以阻止 AMPs 的吸附及作用。

2.4 细胞膜的耐药性修饰

微生物病原体产生特殊的生物学小环境修饰它们的膜以扰乱 AMPs 的敏感性。例如, Lysenko 及其同事发现 *H. 嗜血杆菌(H. influenzae)* 可以表达高浓度的磷酸胆碱以防止被 AMPs 杀死^[18]。磷酸胆碱在一些微生物中是脂多糖的组分之一,它在哺乳动物细胞膜可以模拟磷酸卵磷脂。*H. influenzae* 对 CAMPs 有耐药性与其表面分泌的磷酸胆碱相对含量有关。这些微生物只有在胆碱存在时才对 AMPs 有耐药性,而胆碱是 LPS 的磷酸胆碱修饰所必需的。呼吸道免疫机制是通过识别宿主和微生物细胞膜上不同靶部位而产生免疫反应的一种机制。这种外膜修饰的耐药性就是微生物针对这种免疫机制而产生的。这一发现说明:微生物在体外很难抵抗 AMPs 是因为微生物失去了耐药性机制和条件所依赖的生理学上的小环境。

PolyxinB是通过结合到病原菌细胞膜上带负电的组分来发挥杀菌作用的。有研究发现荧光假单胞菌可以通过改变膜的构成组分,使其细胞膜中带负电荷的磷酸盐含量降低。与此同时,正电性的鸟氨酸也会出现在细胞膜的组分中。此外,整个细胞,无论是细胞膜的或者是胞外的耐药性细胞器都减少了polyxinB的结合容量^[19]。经过上述的修饰,荧光假单胞菌就可以很好的避开polyxinB的作用。近来研究也发现革兰氏阳性菌高度调控的耐药性机制也存在细胞膜修饰。

2.5 基于外流机制的耐药性

淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)通过一个叫做mtr的泵出系统实现对AMPs的耐药性。经证明,MtrCDE复合体可以泵出抗菌素、Dyes和去污剂,这说明这种机制可以阻止细胞受到黏膜的或生殖泌尿道内的、宿主内源或外源的AMPs的伤害^[20]。在耶尔森菌(*Yersinia*)中也存在类似机制,这个机制还涉及到一个K⁺反向转运系统,该系统由RosA和RosB蛋白组成,编码这两种蛋白质的基因在受到AMPs的诱导后才表达^[21]。这就可能增加这种菌在酸性和富含AMPs的吞噬溶酶体中的存活几率。在革兰氏阳性菌和真菌中也有这种效应。

2.6 修饰胞内的靶目标

AMPs与细胞膜相互作用后细胞死亡,这说明AMPs通过细胞膜可以抑制细胞膜及细胞内部的靶目标。有数据证明通过修饰胞内物质的复杂耐药性机制已经出现。比如小菌素B17(microcin B17)是一种可以抑制DNA复制的AMPs。*E. coli*的gyrB基因突变株对microcin B17敏感性显著降低^[22]。原因是这个突变体的GyrB多肽的751位点的色氨酸被精氨酸取代了,这就减少了microcin B17对DNA螺旋酶的抑制作用。这些研究表明AMPs不仅仅是通过磷脂双分子层产生作用,还有其他的作用机制。

如前面所说,病原体通过多种策略进行抵抗AMPs的杀菌作用:避免与AMPs直接接触、减少与AMPs的亲合性或者通过复杂的协同作用扰乱宿主的防御体系等。这些策略都能达到目的,并且产生了许多耐药性机制。但是,病原体还有很多更隐蔽和复杂的分子机制用于扰乱宿主的AMPs防御机制,这还有待进一步研究。

3 讨论

虽然微生物可以对AMPs产生耐药性,但是完全没有必要过度担忧。因为:1)微生物对抗菌肽产生抗药性并不容易。微生物可以对AMPs产生耐药性并不说明这种耐药性将广泛存在,而且目前的实验表明微生物不能轻易通过进化产生对AMPs的耐药性。耐药性的进化取决于两者相互作用的几率。例如:微生物与自然界的抗生素(如青霉素和链霉素)共同存在了漫长的岁月,但是微生物对抗生素的耐药性都维持在很低的水平,直到1940年这些抗生素在临床上被广泛使用,并随着抗生素在临床上的滥用增加了抗生素和病原体相互作用的几率,导致病原微生物对抗生素产生广泛的耐药性。2)微生物的耐药性机制会影响其生存和繁殖。耐药性是微生物妥协其他功能的产物,例如,是以降低生长率为代价的。这就说明当外界不存在AMPs的时候,对AMPs敏感的微生物会与有耐药性的菌株进行竞争^[23]。Perron等调查了这个可能性,并发现了耐药性菌株付出的代价:当AMPs不存在的时候,耐药性菌株比对照菌花更多的时间开始DNA的复制^[24]。3)AMPs可通过特殊的结构防止被蛋白酶水解。如,Indolicidin是在牛的嗜中性白细胞质洋地黄毒苷中发现的相对独特的AMPs,这个小的CAMPs由13个氨基酸组成,其中有5个(所有残基的40%)是色氨酸残基。它的螺旋和折叠结构与其他AMPs不一样。X-indolicidin是Indolicidin两个吡啶环侧链被氧化而形成,它具有同样的氨基酸序列和抗菌活性,但是对蛋白酶有抗性^[25]。天然的蛋白质也可以通过内在的特有结构防止被蛋白酶分解。Oren等^[26]在1999年发现LL-37(人源AMPs)无论在溶液中还是结合到动物或者人造膜的靶目标,都能抵抗蛋白酶的水解作用。4)自然界中存在的AMPs种类非常多,且作用机制各不相同。因此,细菌只能针对一部分AMPs的作用机制产生耐药性^[23]。

AMPs将对我们的健康和农业做出更大的贡献,但是为了防止微生物对它们产生广泛的耐药性,在开发和使用时都应该格外小心。

参 考 文 献

- [1] Kraus D, Peschel A. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, **306**: 231–250.
- [2] Riley MA, Wertz JE. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 2002, **84**(5-6): 357–364.
- [3] Leippe M, Herbst R. Ancient weapons for attack and defense: the pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa. *J Eukaryot Microbiol*, 2004, **51**(5): 516–521.
- [4] Lay FT, Anderson MA. Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr Protein Pept Sci*, 2005, **6**(1): 85–101.
- [5] Peschel A, Otto M, Jack RW, et al. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 1999, **274**(13): 8405–8410.
- [6] Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev*, 2003, **55**(1): 27–55.
- [7] Cashman KA, Bayer AS, Yeaman MR. Diversity and susceptibility to antibiotics and cationic peptides among *Enterococcus faecalis* or *Enterococcus faecium* isolates of diverse clinical or geographic origin. 98th Genreal Meeting for the American Society for Microbiology, May 17–21 Atlanta GA, 1998.
- [8] Bayer AS, Prasad R, Chandra J, et al. *In vitro* resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. *Infect Immun*, 2000, **68**: 3548–3553.
- [9] Yeaman MR, Bayer AS, Koo SP, et al. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J Clin Invest*, 1998, **101**(1): 178–187.
- [10] 顾其胜, 朱 彬. 海藻酸盐基生物医用材料. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, **11**(26): 5194–5198.
- [11] Yount NY, Yeaman MR. Immunocontinuum: Perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. *Protein and Peptide Letters*, 2005, **12**(1): 49–67.
- [12] Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, et al. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis*, 1996, **173**(3): 739–742.
- [13] Stumpe S, Schmid R, Stephens DL, et al. Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1998, **180**(15): 4002–4006.
- [14] Stumpe S, Bakker EP. Requirement of a large K⁺-uptake capacity and of extracytoplasmic protease activity for protamine resistance of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 1997, **167**(2/3): 126–136.
- [15] Guo L, Lim KB, Poduje CM, et al. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, 1998, **95**: 189–198.
- [16] Zhou Z, Cotter RJ, Raetz CRH, et al. Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH₄VO₃ in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, phosphoethanolamine and palmitate. *J Biol Chem*, 1999, **274**(26): 18503–18514.
- [17] Ernst RK, Yi EC, Guo L, et al. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 1999, **286**(5444): 1561–1565.
- [18] Lysenko ES, Gould J, Bals R, et al. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun*, 2000, **68**(3): 1664–1671.
- [19] Dorrer E, Teuber M. Induction of polymyxin resistance in *Pseudomonas fluorescens* by phosphate limitation. *Arch Microbiol*, 1977, **114**(1): 87–89.
- [20] Shafer WM, Qu X, Waring AJ, et al. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(4): 1829–1833.
- [21] Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol Microbiol*, 2000, **37**: 67–80.
- [22] del Castillo FJ, del Castillo I, Moreno F. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli gyrB* gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. *J Bacteriol*, 2001, **183**(6): 2137–2140.
- [23] Buckling A, Brockhurst M. Microbiology: RAMP resistance. *Nature*, 2005, **438**(7065): 170–171.
- [24] Perron GG, Zasloff M, Bell G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci*, 2006, **273**(1583): 251–256.
- [25] Osapay K, Tran D, Ladokhin AS, et al. Formation and characterization of a single Trp-Trp cross-link in indolicidin that confers protease stability without altering antimicrobial activity. *J Biol Chem*, 2000, **275**(16): 12017–12022.
- [26] Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, et al. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J*, 1999, **341**(Pt3): 501–513.