

· 综述 ·

铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进展

郑璇儿 杨杰

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 又称绿脓杆菌, 是引起急性或慢性感染的最常见的条件致病菌之一, 由其引起的院内感染往往治疗难度极大, 几乎具有目前已知的细菌主要耐药机制, 已成为引起院内获得性肺炎多重耐药革兰阴性菌的代表^[1-2]。PA 感染是治疗的难题, 归其原因, 在于其广泛而多重的耐药性。因此, 了解铜绿假单胞菌的耐药相关基因的情况, 有助于临床研发更有效的治疗铜绿假单胞菌感染性疾病的抗菌药物。PA 的耐药机制概括起来主要有以下几个方面: 各种外排泵系统的过度表达、外膜通透性的降低、药物作用靶位的改变、氨基糖苷类修饰酶的产生、细菌生物被膜形成以及产生抗菌药物灭活酶等。由于这些机制可以共存, 故 PA 往往具有多重耐药性。本文主要对上述几种耐药机制的相关耐药基因的进展作一综述。

一、与主动外排泵系统相关的耐药基因研究

铜绿假单胞菌药物是一种革兰阴性杆菌, 其主动外排泵系统最早于 1993 年被报道, 具有编码超过 50 个潜在多药转运体的能力。目前在 PA 中已报道有 MexGHI-OprD、MexVW-OprM、MexPQ-OprE 和 MexMN-OprM 等 9 种外排泵系统^[3]。其中, 外排泵 MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexJK-OprM 和 MexXY-OprM 对 PA 耐药性的作用已被明确证实^[4-5]。PA 的主动外排系统主要由 3 部分组成: 一是具有药物识别作用的内膜蛋白, 如 MexB、MexD、MexF 和 MexY 等。二是可以将药物泵出菌体的外膜通道蛋白, 如 OprM、OprJ 和 OprN 等。三是起到连接作用的辅助蛋白, 如 MexA、MexC 和 MexE 等。正是由于这些主动外排系统的存在, PA 对多种抗菌药物能够形成固有性耐药或获得性耐药。

MexAB-OprM 在 PA 外排泵系统研究中最详实, 其决定了 PA 的固有耐药性^[6]。MexAB-OprM 包含 3 个结构编码基因, 在野生铜绿假单胞菌株中可表达。MexAB-OprM 外排泵系统可转运包括 β -内酰胺类、喹诺酮类和大环内酯类等抗菌药物以及 β -内酰胺酶抑制剂等种类繁多的底物, 使得 PA 具有广泛的耐药性。MexAB-OprM 外排泵的关键特性是可将大量的 β -内酰胺类抗菌药物泵出菌体外。MexA 和 (或) MexB 在该外排系统中起着至关重要的药物识别作用。 β -内酰胺类药物先经外膜进入膜间隙, 然后被 MexB 俘获, 最后借助 MexA 的桥接作用, 经 OprM 排出菌体外^[7]。在生理状态下, MexAB-OprM 阻遏蛋白是 mexR 基因编码的产物, 当 mexR 基因发生突变时, MexAB-OprM 可因脱离抑制而出现表达增强,

形成获得性耐药^[8]。

MexCD-OprJ 在实验室条件生长的野生 PA 菌株中, 该外排泵系统通常不发生表达, 但在 nfxB 突变株中却高度表达。单一使用喹诺酮类药物治疗后有可能出现突变株的产生^[9]。MexCD-OprJ 外排泵可导致 PA 对四代头孢、氯霉素类、四环素类和其他抗菌复合物的耐药。

MexEF-OprN 在 nfxC 突变的 PA 株中, 此系统可发生高度表达^[10]。mexT 抑制 OprD 基因表达的同时增加了 MexEF-OprN 外排泵系统的表达, 使细胞内通过 OprD 通道进行渗透的抗菌药物的浓度出现普遍降低, 从而导致 PA 对碳青霉烯 (主要是亚胺培南) 类抗菌药物出现交叉耐药。

MexXY-OprM 该外排泵系统受 mexZ 基因调控, mexZ 基因的突变可导致细菌对氨基糖苷类、氟喹诺酮类等耐药性的形成^[11]。

MexJK-OprM 该外排泵系统由 mexL 基因调控, 可选择性暴露在三氯生下表达, 可将四环素和红霉素泵出细菌体外。

MexVW-OprM 该外排泵系统的编码基因为 mexVW, 该基因位于重组性质粒 pTAJ2 上, 该外排系统可介导 PA 对氟喹诺酮类、四环素等产生耐药性。

多研究发现, 各种类型外排泵的表达可呈现相关性, 如外排泵系统 MexAB-OprM 与 MexCD-OprJ、MexEF-OprN 的表达呈现负性相关, 临床分离所得的耐药 PA 亦常常检出两种或三种外排泵同时高表达的状况^[12]。国内有学者对临床标本分离所得的 80 株多重耐药铜绿假单胞菌株进行耐药表型检测发现, 其中有 80% 的菌株检出了不同类型外排泵基因^[13]。

二、与外膜通透性障碍相关的耐药基因研究

外膜上的孔蛋白通道或脂质通道是抗菌药物通过的桥梁^[14]。如果这些通道发生改变或缺失, 抗菌药物的杀菌作用将受到限制, 敏感性将大大降低, 从而使耐药性增强。大量的研究表明, 大部分革兰阴性杆菌具有高通透性的孔蛋白通道和相对较少的特异性蛋白通道, 而铜绿假单胞菌外膜则存在着主要的特异性通道^[15], 如 OprC、OprD2、OprE1 和 OprF 等, 其中 OprC、OprD2 和 OprE1 为小分子微孔蛋白, 分子质量分别为 70 kD、46 kD、43 kD, 这些微孔蛋白形成的孔道渗透速度仅为其他多数革兰阴性杆菌的 1%。而 Bent 等^[16]研究结果表明, PA 中富含大孔通道蛋白 OprF。但 OprF 并不具备通透功能^[17], 这使得 PA 外膜低通透性与大通道之间的矛盾得到解释。除此之外, 特异性外膜通道的突变可以导致细菌耐药性的形成。如当外膜蛋白 OprD2 的缺失或表达减少时, 可引起 PA 对亚胺培南耐药。有实验证明,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.01.034

作者单位: 511442 广州市, 广州医科大学附属广东省妇幼保健院新生儿科 (郑璇儿); 广东省妇幼保健院新生儿科 (杨杰)

通讯作者: 杨杰, Email: jasjie_yang163.com

对耐亚胺培南的 PA 转入带有 OprD2 编码基因的质粒后, PA 对亚胺培南的耐药性消失。因此, OprD2 被认为是亚胺培南进入 PA 的通道^[18]。

三、改变药物作用靶位的耐药基因研究

当抗菌药物的作用靶位(如青霉素结合蛋白和 DNA 拓扑异构酶 II)发生改变时,可引起 PA 对其耐药。青霉素结合蛋白(penicillin-binding proteins, PBPs)存在于 PA 的内膜上,当其与 β -内酰胺类药物结合后会失去酶的活性,从而引起 PA 死亡。因此,当 PBPs 基因发生变异时,其与 β -内酰胺类药物的结合能力就会出现降低或者难以与此类药物发生结合,从而使 PA 形成对该类抗菌药物的耐药性。当然,PA 亦可改变 DNA 拓扑异构酶 II 的结构而使其对喹诺酮类药物的敏感性消失。如当 DNA 旋转酶(DNA gyrase)的 gyrA 基因或 IV-topoisomerase 的 parC 基因此类细菌的靶位基因产生突变时,可引起铜绿假单胞菌对喹诺酮类药物耐药性的形成^[19]。

四、与氨基糖苷类修饰酶产生相关的耐药基因的研究

PA 可通过产氨基糖苷类修饰酶(aminoglycoside-modifying enzymes, AME)而形成耐药性^[20]。这一途径是 PA 对氨基糖苷类抗菌药物耐药的主要原因。除此之外,PA 亦可因其作用靶位基因的突变(如 16S rRNA 基因的突变)而导致其对氨基糖苷类抗菌药物敏感性的消失^[21]。AME 由乙酰转移酶(acetyl transferase, AAC)、磷酸转移酶(phosphate transferase, APH)和核苷转移酶(nucleotidyltransferase, ANT)3 大类所组成。这些修饰酶相关编码基因有 aac(3)-I、aph(3')-VI、ant(3'')-I 等 30 余种。Aghazadeh 等^[22]对 67 株 PA 菌株进行氨基糖苷类修饰酶基因检测发现 aph(3')-II b 是其中最主要的基因型。

五、与生物被膜形成相关的耐药基因研究

生物被膜是造成抗菌药物耐药的重要原因,指的是一个多菌细胞群体结构,可由细菌自身,及其产生的外部多糖基质、蛋白质和核酸等共同包裹所组成^[23],其通过阻止和抑制白细胞、抗菌药物等进入生物膜中杀灭细菌而产生耐药性。有调查表明,超过 65% 的细菌感染与生物被膜形成相关^[24]。当生物被膜成熟后,菌体密度增加引起了群体感应系统(quorum sensing, QS)的激活,从而激活特定的基因发生表达。PA 具有 QS 系统典型的特征,其代表为 Las 群体感应系统^[25]。Las 系统由 LasR 和 LasI 基因组成, LasR 基因编码转录激活蛋白 LasR, LasI 基因编码转录自诱导分子 3-氧十二烷酰高丝氨酸内脂(3-O-C12-HSL)。当 3-O-C12-HSL 增加到一定浓度时便分别与 Las 蛋白特异性结合并激活转录,从而调节 LasA、LasB、aprA 和 Rpos 等一系列下游致病基因的表达,调控毒力因子的产生。QS 系统已被证实与抗菌药物的耐药性相关。其机制目前尚不十分清楚,目前存在 3 种假说:一是渗透限制,主要从生物膜的结构上分析;二是营养限制,由于细菌密度增加形成了营养成分梯度,被膜内的细菌生长速度出现减慢,从而引起各种耐药基因表达的上调;三是表型推断,指的是膜内某些细菌采用与浮游细菌不同的有保护作用的生物膜表型。

其中表型推断是目前解释生物膜耐药的主要研究方向,已被证实。

六、与产生灭活酶相关的耐药基因研究

产生 β -内酰胺酶是 PA 耐药的重要机制之一。PA 产生的灭活酶包括超广谱 β -内酰胺酶、头孢菌素酶及金属 β -内酰胺酶。灭活酶起作用的途径是破坏 β -内酰胺环。这个过程通过质粒介导或染色体突变产生。

1. 超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs):包括 A 类 ESBLs 及苯唑西林酶(OXA)。A 类 ESBLs 主要包括 TEM、SHV、PER、VEB、GES/IBC 和 BEL 共 6 型,都具有类似的水解作用,但基因同源性不高。OXA 属于 Ambler D 类, Bush 2d 组,耐药谱通常较窄,但近年来不断发现超广谱 OXA 型酶,主要包括 OXA-2 或 OXA-10 的突变衍生酶^[26]。

2. 头孢菌素酶(又称为 AmpC 酶):AmpC 酶由 AmpC 基因编码产生,有很强的诱导性。AmpC 酶可分为诱导型、结构型和质粒型^[27]。其中质粒型 AmpC 酶使人类对抗 PA 的斗争非常困难,因为其耐药质粒可以在相同菌种间或不同菌种间相互传播^[28]。

3. 金属 β -内酰胺酶(MBLs),又称金属酶或碳青霉烯酶。MBLs 的活性部位为金属离子,其活性不能被舒巴坦等常见的 β -内酰胺酶抑制剂抑制,随着这些金属酶的出现,耐亚胺培南 PA 的比例在增加,其中以 VIM-2 型占主导地位^[29]。目前 PA 中发现的 MBLs 有 IMP、VIM、SPM 和 GIM 共 4 种类型,耐药基因由染色体或质粒介导。耐药方式产生形式多样,例如耐药酶的水平传播。这是一种借助整合子的移动及基因盒的插入、切除方式实现的传播方式。另外,由于基因环境的不断变化,基因盒与整合子可以出现不断进化,从而使得耐药方式不断更新。

综上所述,PA 的耐药机制复杂,耐药相关基因繁多,不同的药物存在着不同的耐药机制,同一类药物亦可以是多种机制相互形成的结果。随着认识及研究的不断深入,新的耐药机制有可能不断被发现,对于 PA 的耐药相关基因的研究更待进一步探索。

参考文献

- 1 Parker CM, Kutsogiannis J, Muscedere J, et al. Canadian Critical Care Trials Group. Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes[J]. J Crit Care, 2008, 23(1):18-26.
- 2 El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(2):229-238.
- 3 Mima T, Sekiya H, Mizushima T, et al. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(11):999-1002.
- 4 Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions[J]. Genet Mol Res, 2003, 2(1):48-62.
- 5 Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, et al. Involvement of the

- MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(4):1347-1351.
- 6 Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2):382-402.
- 7 Mao W, Warren MS, Lee A, et al. MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7):2001-2007.
- 8 Shinabarger DL, Marotti KR, Murray RW, et al. Mechanism of action of oxazolidinones; effects of linezolid and eperzolid on translation reactions[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(10):2132-2136.
- 9 Jeannot K, Elsen S, Köhler T, et al. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(7):2455-2462.
- 10 Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions[J]. Genet Mol Res, 2003, 2(1):48-62.
- 11 Muller C, Plésiat P, Jeannot K, et al. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(3):1211-1221.
- 12 周丹秋, 李敏, 蒋晓飞, 等. 全耐药铜绿假单胞菌中多药外排泵mRNA表达的定量RT-PCR检测[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(2):103-105.
- 13 吕锦, 刘瑞康, 段晓晶, 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]. 临床检验杂志, 2012, 30(7):549-552.
- 14 Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794(5):808-816.
- 15 Tamber S, Ochs MM, Hancock RE. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(1):45-54.
- 16 Benz R, Hancock REW. Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes[J]. Biochem Biophys Acta, 1981, 646(2):298-308.
- 17 左联. 铜绿假单胞菌外膜通透性与耐药性的关系[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(4):241-245.
- 18 Ochs MM, McCusker MP, Bains M, et al. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD2 selective for imipenem and basic amino acids[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(5):1085-1090.
- 19 Mouneimne H, Robert J, Jarlier V, et al. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(1):62-66.
- 20 糜祖煌, 陆亚华. 氨基糖苷类修饰酶及其基因检测[J]. 现代实用医学, 2004, 16(1):13-16.
- 21 Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P. Spectinomycin resistance in *Neisseria* spp. due to mutations in 16S rRNA[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(5):1365-1366.
- 22 Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, et al. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates[J]. Microb Drug Resist, 2013, 19(4):282-288.
- 23 Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(9):623-633.
- 24 Green SL, Maddox JC, Huttenbach ED. Linezolid and reversible myelosuppression[J]. JAMA, 2001, 285(10):1291.
- 25 Bjarnsholt T, Givskov M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(2):409-414.
- 26 林冬玲, 陈茶, 曾建明. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(3):91-95.
- 27 徐英春, 陈民钧. AmpC酶与革兰阴性杆菌的耐药特征[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(增刊):14-16.
- 28 Walther-Rasmussen J, Høiby N. Plasmid-borne AmpC β -lactamases[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(6):479-493.
- 29 Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update[J]. Curr Opin Infect Dis, 2008, 21(4):367-371.

(收稿日期: 2013-09-23)

(本文编辑: 孙荣华)

郑璇儿, 杨杰. 铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进展 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (1): 123-125.