

• 综述 •

喹诺酮类抗菌药的耐药性机制及研究进展

宋莹^{1,2}, 江振洲^{1,2*}, 张陆勇^{1,2*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 江苏省新药筛选中心, 江苏 南京 210009

摘要: 喹诺酮类抗菌药抗菌谱广, 在临床上广泛应用于各种感染的治疗。喹诺酮类药物可通过阻断拓扑酶的生理功能继而干扰细菌的复制, 从而起到抗菌的作用。也正是由于其广泛应用, 近年来此类药物的耐药现象严重, 且机制多样。综述了喹诺酮类药物的作用机制、耐药机制及其研究进展。

关键词: 喹诺酮类药物; 耐药性; 耐药机制

中图分类号: R978.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)03-0199-05

Advances in studies on quinolone resistance and its mechanisms

SONG Ying^{1,2}, JIANG Zhen-zhou^{1,2}, ZHANG Lu-yong^{1,2}

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Jiangsu Center for Drug Screening, Nanjing 210009, China

Abstract: Quinolones have potential and broad antimicrobial activity on gram-positive and -negative bacteria in clinic, respectively. They could interfere the duplication of bacteria by blocking the physiologic function of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV. So quinolones have been used worldwide against a variety of infections. As a result of their frequent use, bacterial resistance to quinolones has gradually developed and limited their therapeutic efficacy in infections. This article reviews the antibacterial and resistance mechanisms of quinolone based on the recent research advances.

Key words: quinolones; drug resistance; mechanisms of resistance

喹诺酮类(quinolones)又称吡酮酸类或吡啶酮酸类, 是一类合成抗菌药, 抗菌谱广, 主要作用于革兰阴性菌。自1962年萘啶酸作为第一代喹诺酮类药物诞生以来, 该类药物的发展突飞猛进, 相继开发出了第二代(吡哌酸、西诺沙星)、第三代(诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星)和第四代(加替沙星、莫西沙星)喹诺酮类药物, 并广泛应用于各种感染。近年来也有其用于多耐药结核病治疗的报道, 供不能耐受一线抗结核药物患者使用^[1]。但是随着该类药物的临床应用越来越广泛, 不合理用药也随之增加, 细菌的耐药性问题日益突出, 很多传染病难以治愈, 这导致治疗时间延长、费用昂贵, 并增加死

亡风险。喹诺酮类药物上市仅30多年, 细菌耐药形势已不容乐观。研究细菌对喹诺酮类药物产生耐药的机制对改善该问题, 开发耐药性小的新型药物, 以及使得喹诺酮类药物得到更好应用具有重要意义。现将喹诺酮类药物的作用机制、耐药机制及其近年来研究进展做一综述。

1 喹诺酮类药物作用机制

喹诺酮类药物是由吡啶酮酸并联苯或吡啶等芳香环组成的一类合成抗菌药, 一大优点就是能够快速杀灭细菌。其在细胞内作用靶点是2种DNA拓扑异构酶: 拓扑异构酶II和IV。在革兰阴性菌中, 拓扑异构酶II(DNA促旋酶)是喹诺酮类药物作用

收稿日期: 2012-03-20

基金项目: 江苏省省级科技创新与成果转化专项引导资金项目(BE2008672)

作者简介: 宋莹(1986—), 女, 天津人, 中国药科大学药理学在读硕士, 研究方向为药动学。

Tel: 13913841826 E-mail: lichil059@hotmail.com

*通讯作者 张陆勇, 男, 教授, 博士生导师。Tel: (025)83271023 E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn

江振洲, 男, 助理研究员。Tel: (025)83271043 E-mail: jiangcpu@yahoo.com.cn

的主要靶点；而在革兰阳性菌中，拓扑异构酶Ⅳ是大多数喹诺酮类药物的抑制靶点。喹诺酮类药物可形成药物-拓扑异构酶-DNA复合物，诱导DNA促旋酶和拓扑异构酶Ⅳ发生构型改变从而失活^[2]。拓扑异构酶是细菌生存的必需酶，所以影响其活性就可达到抑菌效果。但进一步研究表明，这种复合物的形成过程是可逆的，因此复合物并不是喹诺酮快速杀菌的直接原因。随后研究人员提出了染色体断裂假设，即喹诺酮的致死作用可能分为2步。第一步是药物与酶形成可逆的复合物，阻断细菌DNA的复制，诱导SOS反应的发生并造成细胞丝状生长。这些作用并不能快速致死细菌，但可能会造成慢性致死；第二步，即细胞致死阶段，则需要较高浓度的喹诺酮类药物，造成DNA缺口、染色体断裂等不可逆致死反应，最终导致细菌死亡。第二步过程是否需要蛋白参与，决定于喹诺酮药物的类型以及是否处于有氧环境^[2]。

2 喹诺酮类药物耐药性机制

抗菌素耐药性是指微生物对原本有效的抗菌药物产生耐性。耐药生物（包括细菌、病毒和某些寄生虫）能够承受抗生素、抗病毒药和抗疟药等抗菌药物的攻击，进而使治疗失去效果，导致感染难以治愈并可传染他人。当微生物发生突变或获得耐药基因时，就产生了耐药性。近年来，各种耐药菌株相继被发现，例如耐甲氧西林金葡菌（MRSA）、耐万古霉素肠球菌（VRE）、耐青霉素肺炎链球菌（PRSP）等，这些耐药菌引起的感染很难治疗。

根据目前的研究，喹诺酮类抗菌药物的耐药机制主要有以下几点：DNA促旋酶或拓扑异构酶变异、通过质粒介导耐药、细菌细胞膜通透性改变、细菌主动药物外排机制以及细菌生物被膜的形成。

2.1 DNA促旋酶或拓扑异构酶Ⅳ的变异

DNA促旋酶是由*gyrA*、*gyrB*基因分别编码的GyrA、GyrB蛋白各2分子组成的四聚体。拓扑异构酶Ⅳ是由*parC*、*parE*基因分别编码的ParC、ParE蛋白各2分子组成的四聚体。上述任一基因突变都可能引起耐药，而在革兰阴性杆菌中，主要是*gyrA*基因突变所致。在*gyrA*基因内，有一特定区域与耐药性密切相关，被称为喹诺酮类耐药决定区（quinolone resistant determining region, QRDR）^[3]，此区域在不同菌种内编码的蛋白具体位置不尽相同，例如在结核杆菌中对应Gly88-Asp94，在大肠杆菌中对应Ala67-Gln106^[4-5]。该区域发生突变可引

起耐药，以空肠弯曲杆菌为例，DNA促旋酶发生Thr86→Phe，Asp90→ASN，Ala70→Thr突变会造成耐药性，并且Thr-86比Asp-90和Ala-70上的突变引起的耐药水平高^[6]。而空肠弯曲杆菌分离菌群对喹诺酮类有更高的耐药水平，它有两个突变，一个在DNA促旋酶的Thr-86上，另一个在拓扑异构酶Ⅳ的Arg-139上^[7]，说明当DNA促旋酶和拓扑异构酶Ⅳ均发生突变时引起的耐药性更大。

*gyrA*基因的改变产生耐药可能有两种解释：一种是由于酶结构的改变引起空间上的障碍，阻止喹诺酮进入喹诺酮作用区；另一种是由于物理、化学变化干扰喹诺酮-酶-DNA相互作用。每一种*gyrA*基因突变都可能造成对喹诺酮类中所有药物的交叉耐药。

促旋酶或拓扑异构酶Ⅳ的变异是目前细菌产生耐药性的最主要原因。近年来报道过的由于该机制产生耐药性的细菌种类有结核分支杆菌^[8]、肺炎杆菌^[9]、沙门菌^[10]等。

2.2 由质粒介导的耐药性

除了拓扑异构酶变异外，近年来的研究热点还有由质粒介导的喹诺酮类耐药（plasmid mediated quinolone resistance, PMQR）^[11]。研究人员于1998年首次发现质粒中可介导喹诺酮耐药性的基因并将其命名为*qnr*，随后发现一系列该基因家族变体，如*qnrS*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*^[12-13]。*qnr*基因可表达细菌DNA解旋酶保护蛋白，从而起到拮抗喹诺酮的作用^[14]。该基因家族与多种酶基因相关，故虽然单纯由其介导的耐药性水平较低，但由于质粒可在细菌间发生水平转移并引起其他基因突变，所以近年来也受到关注。研究显示耐药性与*qnr*基因相关的细菌有粪肠球菌^[15]、肠杆菌^[16]等。

质粒还可介导药物外排进而产生耐药。2007年报道了能使喹诺酮类药物外排的 $qepA$ 系统，可使细菌对诺氟沙星和环丙沙星的耐药性增强。铜绿假单胞菌是临床上最常见的引起严重医院感染的条件致病菌，研究发现其耐药与主动外排泵的过度表达有很大的关系，外排作用主要与泵操纵子MexAB-OpM有关^[17]。

此外，质粒还可介导细菌产生灭活酶破坏抗菌药物。2006年，研究人员发现了对喹诺酮类药物有修饰作用的氨基糖苷类修饰酶aac(6')-Ib-Cr型^[14]。其作用机制是修饰喹诺酮6-氨基己糖环的6位，使其乙酰化，进而阻止其发生作用。因此可以使具备

此基团的环丙沙星和诺氟沙星失去抗菌作用,但对左氧氟沙星、莫替沙星等哌嗪环上氨基被甲基取代的喹诺酮类则无作用^[14]。与该机制相关细菌有大肠杆菌^[18]等。

2.3 细菌细胞膜渗透性改变

细菌细胞膜是一种具有高度选择性的渗透性屏障。细胞外膜上存在某些特殊蛋白名为膜孔蛋白(omp),它是一种非特异性的、跨越细胞膜的水溶性扩散通道。抗菌药物可通过这些膜孔蛋白进入菌体内部发挥效用。如果膜孔蛋白改变则可能减少细菌内药物的积累,进而增加其耐药性。以铜绿假单胞菌为例,其产生耐药性的主要原因就是其膜渗透性低^[19],如减少其 ompG 的表达并敲除其 ompD,会降低其对喹诺酮的敏感性。而在大肠杆菌中,ompF 和 ompC 是主要的外膜蛋白。其中 ompF 作为亲水小分子药物通道与喹诺酮发挥药效密切相关,ompF 的减少或缺失会造成细菌对药物的摄入减少,从而产生耐药。

2.4 细菌主动药物外排机制

细菌细胞内膜存在能量依赖性的蛋白外排泵,该泵由染色体基因编码,可将药物排出,导致药物在细菌体内达不到有限浓度,进而产生耐药。这是近年来研究较多的一种机制,是细菌对抗菌药物耐药的另一重要途径。

细菌对喹诺酮类药物的外排主要与耐药小节分裂(RND)家族有关,包括钙离子、钴离子和镍离子的转运器等。以大肠杆菌为例,其与氟喹诺酮类药物耐药性有关的主动外排泵主要是 acrAB-tolC 系统,属于质子依赖型。该系统包括药物质子转运子 acrB、周质融合蛋白 acrA 和外膜通道蛋白 tolC。内膜上的转运子 acrB 捕获细胞的有害物质,当底物与转运子结合时,tolC 与 acrAB 复合体结合并打开其内在通道,将有害物质泵出细胞^[20]。同属该机制的还有绿脓杆菌^[21]。

我国也有报道主动外排泵激活剂和抑制剂对喹诺酮类药物在菌体内蓄积量的影响,证明主动外排泵对相对亲水性氟喹诺酮类药物的泵出功能明显强于其对疏水性氟喹诺酮类药物的作用^[22]。由于主动外排泵与细菌外膜通透性改变在多重耐药中起重要作用,因此愈来愈受到研究人员重视。

2.5 细菌生物被膜的形成

细菌生物被膜是指多个细菌不可逆地黏附于机体或物体表面并被自身细胞分泌的基质所包被,细

菌间的多糖蛋白复合物形成孔道维持细菌物质代谢。细菌生物被膜可以保护细菌逃避宿主免疫和抗菌药物的杀伤作用,而游离于细菌外的药物对处于被膜中的细菌无效,故细菌形成被膜也是其产生耐药性的机制之一。近年来,随着生物医学材料的广泛应用,由导管、插管等造成的相关感染增多^[23],而该类感染大多有细菌生物被膜存在,使得治疗困难加重。

细菌的各种耐药机制可单独或协同作用,使细菌产生对喹诺酮类药物耐药,甚至多重耐药^[24]。为监测耐药性,研究人员利用 PCR 技术建立了可快速检测出 qnr、qepA 和 aac(6')-Ib-Cr 等耐药基因的方法^[25-26]。但仅有快速检测方法对于解决耐药性问题是远远不够的。

3 应对喹诺酮类药物耐药性的对策

3.1 临床合理用药

减缓细菌对喹诺酮类药物耐药的关键在于合理用药。加强医院药敏试验,并对耐药菌和感染耐药菌的患者进行动态监测,及时发现耐药菌感染,制止耐药基因扩散。临床选择喹诺酮时应根据病原诊断,尽量选择高敏药物,并确保足够用量及时间,以便彻底杀灭细菌。严格掌握适应证,防止滥用。同时,还可选用联合用药的方式,通过联合用药可扩大抗菌谱、增强疗效、减少用量、降低或避免不良反应,减少或延缓耐药菌株的产生。

3.2 开发新结构的喹诺酮

除合理利用现有喹诺酮药物外,开发新结构药物也是对抗耐药性的方法之一。喹诺酮药物是完全人工合成的化学品,对其结构进行改造将是非常有效的方案。近几年新发现的一些喹诺酮在耐药性问题上已经有了很大改善,如 DC-159a 具有强大的杀菌活性,并可杀死肺炎链球菌突变体和结核杆菌突变体^[27];TG-873870 对甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)、耐甲氧西林金葡菌(MRSA)、耐药肺炎链球菌等均具有很好的活性^[28];DW-224a 对具有耐药性的淋球菌有很好的活性^[29]。

3.3 其他措施

此外,加强药政管理,严格控制抗菌药物的生产和销售;建立广泛的监测网络,加强细菌的耐药性监测;加强对医护人员和病人的宣传教育,普及耐药性相关知识;医院执行消毒隔离制度,尤其是在耐药菌严重的重症监护病房等,防止耐药菌的交叉感染;减少喹诺酮类药物在食品和畜禽养殖业中的

使用以防止耐药性细菌进入食物链等均是延缓和控制耐药问题的重要措施。

4 结语

目前, 细菌的耐药性问题已经得到了全球范围内的广泛关注, 2011 年世界卫生日的主题是“抵御耐药性——今天不采取行动, 明天就无药可用”。而作为现在全球抗生素滥用最严重的国家, 我国卫生部也开展了抗菌药物专项整治的一系列活动。相信随着耐药性问题得到越来越多的重视, 会出现更多对策对抗喹诺酮耐药问题。

参考文献

- [1] Mugnaini C, Pasquini S, Corelli F. The 4-quinolone-3-carboxylic acid motif as a multivalent scaffold in medicinal chemistry [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(14): 1746-1767.
- [2] Drlica K, Malik M, Kerns R J, et al. Quinolone-mediated bacterial death [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(2): 385-392.
- [3] Sorlozano A, Gutierrez J, Jimenez A, et al. Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2740-2742.
- [4] Sun Z, Zhang J, Zhang X, et al. Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 31(2): 115-121.
- [5] Matrat S, Petrella S, Cambau E, et al. Expression and purification of an active form of the *Mycobacterium leprae* DNA gyrase and its inhibition by quinolones [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(5): 1643-1648.
- [6] Wang Y, Huang W M, Taylor D E. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* gyrA gene and characterization of quinolone resistance mutations [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(3): 457-463.
- [7] Gibreel A, Sjogren E, Kaijser B, et al. Rapid emergence of high-level resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* associated with mutational changes in gyrA and parC [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(12): 3276-3278.
- [8] Kim H, Nakajima C, Yokoyama K, et al. Impact of the E540V amino acid substitution in GyrB of *Mycobacterium tuberculosis* on quinolone resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(8): 3661-3667.
- [9] Bialek S, Lavigne J P, Chevalier J, et al. Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10): 4373-4378.
- [10] Kim K Y, Park J H, Kwak H S, et al. Characterization of the quinolone resistance mechanism in foodborne *Salmonella* isolates with high nalidixic acid resistance [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 146(1): 52-56.
- [11] Strahilevitz J, Jacoby G A, Hooper D C, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(4): 664-689.
- [12] Wang M, Guo Q, Xu X, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 1892-1897.
- [13] Cavaco L M, Hasman H, Xia S, et al. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(2): 603-608.
- [14] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G A, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase [J]. *Nat Med*, 2006, 12(1): 83-88.
- [15] Hegde S S, Vetting M W, Mitchenall L A, et al. Structural and biochemical analysis of the pentapeptide repeat protein EfsQnr, a potent DNA gyrase inhibitor [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(1): 110-117.
- [16] Carattoli A, Aschbacher R, March A, et al. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(10): 2070-2075.
- [17] Lomovskaya O, Warren M S, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(1): 105-116.
- [18] Montesinos I, Rodriguez-Villalobos H, De Mendonca R, et al. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase associated with the ST131 *Escherichia coli* clone in Belgium [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8): 1828-1830.
- [19] Breidenstein E B, Khaira B K, Wiegand I, et al. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(12): 4486-4491.

- [20] Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, *et al.* Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(9): 3030-3033.
- [21] Dunham S A, Mcpherson C J, Miller A A. The relative contribution of efflux and target gene mutations to fluoroquinolone resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010, 29(3): 279-288.
- [22] 方治平, 徐 炜, 刘小康, 等. 大肠杆菌体内氟喹诺酮类药物耐药机制的研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36(1): 4-7.
- [23] Williams G J, Stickler D J. Effect of triclosan on the formation of crystalline biofilms by mixed communities of urinary tract pathogens on urinary catheters [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 9): 1135-1140.
- [24] Pereira A S, Andrade S S, Monteiro J, *et al.* Evaluation of the susceptibility profiles, genetic similarity and presence of qnr gene in *Escherichia coli* resistant to ciprofloxacin isolated in Brazilian hospitals [J]. *Braz J Infect Dis*, 2007, 11(1): 40-43.
- [25] Guillard T, Cavallo J D, Cambau E, *et al.* Real-time PCR for fast detection of plasmid-mediated qnr genes in extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(6): 430-433.
- [26] Guillard T, Moret H, Brasme L, *et al.* Rapid detection of qnr and qepA plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(2): 253-259.
- [27] Disratthakit A, Doi N. *In vitro* activities of DC-159a, a novel fluoroquinolone, against *Mycobacterium* species [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(6): 2684-2686.
- [28] Chen Y H, Liu C Y, Lu J J, *et al.* *In vitro* activity of nemonoxacin (TG-873870), a novel non-fluorinated quinolone, against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococci* and *Streptococcus pneumoniae* with various resistance phenotypes in Taiwan [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(6): 1226-1229.
- [29] Jones R N, Biedenbach D J, Ambrose P G, *et al.* Zabofloxacin (DW-224a) activity against *Neisseria gonorrhoeae* including quinolone-resistant strains [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 62(1): 110-112.