

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.045

外排转运蛋白介导的抗真菌药物耐药研究进展*

王 威 邵 龙 郑 娜 蒋胶胶 张家堂[△]

(中国人民解放军总医院神经内科 北京 100853)

摘要:近年来,随着广谱抗生素,免疫抑制剂,抗肿瘤化疗药物的广泛应用,器官移植的普遍开展以及 AIDS 患者的逐年增加,各系统侵袭性真菌感染日益增多。抗真菌药物的大量应用使得真菌耐药现象日渐严重。大量研究表明,耐药真菌细胞膜上外排转运蛋白的过量表达对抗真菌药物耐药形成起到重要作用。ATP 结合盒式蛋白(ABC 转运体)和易化扩散载体超家族蛋白(MFS 转运体)便是其中最重要的两种。本文从 ABC 及 MFS 转运体的结构和功能出发,分析其在抗真菌药物耐药形成中的作用,并对相关研究进展进行综述。

关键词:ATP 结合盒式蛋白;易化扩散载体超家族蛋白;抗真菌药物;耐药机制

中图分类号:R978.5;R379 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)12-2377-04

Efflux Transporter-Mediated Antifungal Drug Resistance*

WANG Wei, SHAO Long, ZHENG Na, JIANG Jiao-jiao, ZHANG Jia-tang[△]

(Department of Neurology, General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT: The incidence of life-threatening fungal infections has increased gradually in recent years due to the widespread use of broad-spectrum antimicrobial agents, immunosuppressants, anti-tumor drugs, the extensive development of organ transplantation, and the increasing number of patients with AIDS. Resistance to antifungal agents is becoming an increasingly significant clinical problem. Over-expression of efflux transporters at the plasma membrane may be responsible for the high-level drug resistance. There are two main superfamilies of efflux transporters, the ATP-binding cassette (ABC transporters) and the major facilitator superfamily (MFS transporters). This review focuses on the structure and function of ABC and MFS transporters of different fungal species to emphasize the recent advancement in this field.

Key words: ATP-binding cassette; Major facilitator superfamily; Antifungal agents; Drug resistance mechanisms

Chinese Library Classification (CLC): R978.5; R379 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2377-04

前言

侵袭性真菌感染的病原体主要包括念珠菌,隐球菌和曲霉菌等。该类感染往往继发于宿主免疫功能受损,其病情重,死亡率高^[1]。真菌耐药现象的日渐严重成为治疗该类疾病的一大障碍。而耐药机制中非常重要的一点就是耐药真菌细胞膜上外排转运蛋白的过量表达^[2],外排转运蛋白限制抗真菌药物进入细胞内或将进入细胞内的抗真菌药物排出,使得真菌细胞内药物浓度低于有效抑菌浓度而耐药。外排转运蛋白中,与真菌耐药关系最为密切的两类为 ATP 结合盒式蛋白(ATP-binding cassette proteins)和易化扩散载体超家族蛋白(major facilitator superfamily proteins),又分别称作 ABC 转运体和 MFS 转运体。在对念珠菌,隐球菌和曲霉菌的研究中,均已证实此两种外排蛋白编码基因的转录活性以及对抗真菌药物的外排作用^[3]。本文以念珠菌,隐球菌和曲霉菌为研究对象,对 ABC 转运体和 MFS 转运体这两种外排转运蛋白在真菌耐药中作用的研究进展做一综述。

1 侵袭性真菌感染临床流行病学

侵袭性真菌感染又称作系统性真菌感染,亦或深部真菌感染。常发生于各种原因导致的免疫功能缺陷的患者,以各系统原发或合并肺部感染较多。侵袭性念珠菌感染以白色念珠菌为主,多以严重的口咽部念珠菌感染表现为首发临床症状。近年来,近平滑念珠菌等非白色念珠菌导致的侵袭性感染正逐年上升。有研究表明,在我国,近平滑念珠菌目前仅次于白色念珠菌,为第二大临床致病念珠菌^[4],且其引起的侵袭性感染多见于老年患者。侵袭性曲霉菌病目前以烟曲霉菌和黄曲霉菌为主要病原菌,主要侵袭肺组织,其感染起病隐匿,预后差,死亡率高达 50%~100%^[5]。侵袭性隐球菌感染以新型隐球菌和格特隐球菌为主,是中枢神经系统真菌感染中最常见的致病菌。最新的一项多中心研究发现,我国临床分离的致病隐球菌中绝大多数为新型隐球菌格鲁比变种,其所收集到的 181 株新型-戈特隐球菌复合体中,仅有 2 株为戈特隐球菌,179 株新型隐球菌中有 98.9%均为格鲁比变种,其绝大多数样本均获取自

* 基金项目:全军医学科技“十二五”科研项目(CWS11J064)

作者简介:王威(1989-),硕士研究生,主要研究方向:中枢神经系统感染性疾病,E-mail: wwy1020@sina.com

[△] 通讯作者:张家堂(1968-),博士生导师,主要研究方向:中枢神经系统感染性疾病,E-mail: Edwin-zhang@263.net

(收稿日期:2016-11-08 接受日期:2016-11-30)

脑脊液标本^[6]。

2 ABC 转运体及 MFS 转运体的结构特点

ABC 转运体通常由两种结构域组成,包括核苷酸结合结构域(NBD)及跨膜结构域(TMD)。多数 ABC 转运体包含两个 NBD 和两个 TMD。NBD 通过结合并水解 ATP 为 ABC 转运体外排抗真菌药物提供能量。每个 TMD 均包括 6 个跨膜区,6 个跨膜区之间通过环形保护结构彼此相连。且 NBD 与 TMD 之间也通过这种环形结构相互连接。NBD 结合并水解 ATP 之后,TMD 拓扑结构随之改变,隐藏在 TMD 跨膜区内的底物结

合位点得以暴露,并与其底物特异性结合并完成跨膜外排^[7]。见图 1。

MFS 转运体没有 NBD 结构,但其可以利用质子电化学梯度势能对抗真菌药物起外排作用。同 ABC 转运体一样,MFS 转运体也是通过 TMD 与其底物结合并完成跨膜外排。根据 TMD 中跨膜区的数量,将 MFS 转运体分为含有 12 个跨膜区的 DHA1 和含有 14 个跨膜区的 DHA2 两种亚型。同 ABC 转运体一样,MFS 转运体 TMD 内各跨膜区之间也通过环形保护结构相连,维持其拓扑结构的稳定。见图 1。在真菌耐药形成过程中,ABC 转运体比 MFS 转运体更为重要^[8]。

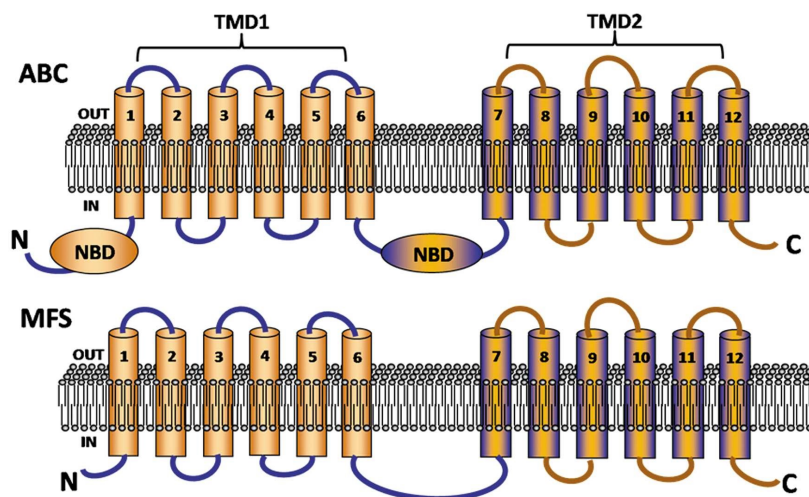


图 1 ABC 转运体及 MFS 转运体结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of the ABC and MFS transporters

3 外排转运蛋白与真菌耐药

3.1 外排转运蛋白与白色念珠菌耐药

目前,外排转运蛋白与真菌耐药形成机制的研究日渐增多,其中以白色念珠菌为主。在对白色念珠菌基因表达分析研究中,Gaur M^[9]等共标记出 20 余种 ABC 转运体,并根据 NBD 和 TMD 的拓扑结构将其分为 PDR (pleiotropic drug resistance),MDR (multidrug resistance),MRP (multidrug resistance-associated protein)等六种亚型,其中与白色念珠菌耐药关系最为密切的两种转运体为同属 PDR 亚型的 CaCdr1p 和 CaCdr2p。CaCdr1p 分子质量约 ~170 kDa,为典型的 ABC 转运体结构,即包括两个 NBD 以及两个 TMD,NBD 上的核苷酸结合位点可以通过结合并水解 ATP 供能,介导抗真菌药物(尤其是唑类)的外排。CaCdr1p 跨膜区上的转运底物结合位点结构十分复杂,研究表明,疏水性强,芳香结构特征明显且分支丰富的物质更容易成为 CaCdr1p 的转运底物^[10]。酮康唑,咪康唑,伊曲康唑以及氟康唑等唑类抗真菌药物均为 CaCdr1p 的转运底物^[11]。破坏 CaCdr1p 能恢复耐药白色念珠菌对唑类抗真菌药物的敏感性^[12]。单纯破坏 CaCdr2p 并不能显著恢复耐药白色念珠菌对唑类抗真菌药物的敏感性,而同时破坏 CaCdr1p 和 CaCdr2p 能使耐药菌株恢复对唑类药物的敏感性,且为高度敏感^[13]。同属 PDR 亚型的 CaCdr3p 和 CaCdr4p 已被证实并不参与白色念珠菌对唑类抗真菌药物的耐药^[14]。另有研究发现,在长

期应用特比萘芬患者临床分离株中,白色念珠菌细胞膜 CaCdr1p 和 CaCdr2p 的表达会有所上调^[15],CaCdr2p 还参与了白色念珠菌对棘白菌素类抗真菌药物卡泊芬净的耐药,但作用较弱^[16]。

除了 ABC 转运体之外,MFS 转运体也参与了白色念珠菌对抗真菌药物的耐药。研究表明,在众多的 MFS 转运体中,仅同属 DHA1 亚型的 CaMdr1p^[17]和 CaFlu1p^[18]的底物中包括唑类抗真菌药物,但 CaFlu1p 蛋白尚未在临床分离株中发现^[7]。CaMdr1p 的 12 个跨膜区分分为两个部分,含有羧基末端的区域主要负责底物的识别与结合,而含有氨基末端的区域则主要负责制造质子电化学梯度势能为外排药物提供能量。CaMdr1p 主要对氟康唑表现出底物特异性,但很多单纯应用氟康唑的患者白色念珠菌临床分离株中却没有发现 CaMdr1p 的过度表达,反而应用其他唑类抗真菌药物的临床分离株中常发现 CaMdr1p 的过度表达^[19]。这种矛盾现象也说明,抗真菌药物的耐药机制是复杂多样的,并不能用一元论来解释。

很多研究表明,所有外排转运蛋白中,对白色念珠菌唑类耐药影响最大的是 CaCdr1p,而 CaCdr2p 与 CaMdr1p 作用次之^[20]。其中,Xu D 等^[21]研究了不同剂量氟康唑对诱发白色念珠菌外排转运体表达的影响,结果表明,低剂量组仅表现为 CaCdr1p 的过量表达,而高剂量组才表现为 CaCdr1p 和 CaCdr2p 的过量表达。该实验也说明 CaCdr1p 在氟康唑耐药中的作用更为显著。

3.2 外排转运蛋白与非白色念珠菌耐药

与白色念珠菌相比,对光滑念珠菌和克鲁斯氏念珠菌等非白色念珠菌耐药机制的研究相对较少。与光滑念珠菌耐药机制相关的外排转运蛋白主要包括 CgCdr1p, CgPdh1p, CgSnq2p 和 CgErg11p^[22], 这些外排转运蛋白也均属于 ABC 转运体中的 PDR 亚型,它们通过蛋白磷酸化作用将唑类抗真菌药物排出细胞^[23]。其中 CgErg11p 尚未在临床分离耐药菌株中发现。相比白色念珠菌,光滑念珠菌耐药的发生更快,曾有研究表明,应用氟康唑数小时后即检测到实验室菌株中 CgCdr1p 的表达增多^[24]。另外,光滑念珠菌较白色念珠菌更易形成交叉耐药,且这种交叉耐药在停药后仍长时间存在^[25]。克鲁斯氏念珠菌由于临床分离株染色体核型尚不十分明确,现有基因操作技术并不完全适用于对克鲁斯氏念珠菌的研究。仅部分研究证实 CkAbc1p, CkAbc2p 及 CkErg11p 参与了其对唑类抗真菌药物的耐药。且 CkAbc1p 的作用明显大于后两者^[26,27]。

3.3 外排转运蛋白与隐球菌及曲霉菌耐药

对隐球菌耐药机制的研究中,通常认为只有属于 ABC 转运体 PDR 亚型的 CneAfr1p 与属于 MDR 亚型的 CneMdr1p 与其对抗真菌药物耐药相关。但最近 Yang ML^[28]等的研究表明, CnePdr11p 也可能参与了格特隐球菌对氟康唑的耐药。其实验通过对 CnePdr11p 编码基因敲除,实现了格特隐球菌对氟康唑的复敏。在对曲霉菌的研究中,虽然发现了许多 ABC 转运体和 MFS 转运体的表达,但其中与临床耐药相关的非常少。目前只有属于 ABC 转运体 PDR 亚型的 AfuAtrFp 被证实与烟曲霉菌的临床氟康唑耐药密切相关^[29]。

4 克服真菌耐药的策略及展望

外排转运蛋白介导的真菌耐药现象广泛存在,给临床治疗,预防真菌感染带来了极大的挑战。目前,克服该类原因导致真菌耐药的主要方法及研究方向包括:1.选用非外排蛋白底物的抗真菌药物,多烯类和棘白菌素类相对唑类抗真菌药物的外排蛋白要少,可作为耐药菌的治疗用药^[30]。但随着耐药菌的不断进化,外排蛋白的底物不断丰富,该类药物的临床疗效也在经受着挑战。研制新的非外排蛋白底物抗真菌药物势在必行。2.联合应用抗真菌药物和外排蛋白抑制剂,利用外排蛋白抑制剂来抑制其对抗真菌药物的外排作用,从而增加真菌细胞内药物浓度。但该类方法有许多临床限制,首先要考虑外排蛋白抑制剂的副作用,许多外排蛋白并非真菌特有,其在人体各正常组织细胞中也广泛分布,如在构成血-脑屏障的毛细血管内皮细胞上就广泛分布着外排蛋白,并起着重要的屏障作用,限制神经毒素或其他外源物质入脑,维持脑内环境稳态^[31]。抑制剂在抑制真菌耐药的同时,也削弱了正常组织的屏障功能^[8]。其次,已有研究表明,对于某一外排蛋白的抑制可以使其他亚型外排蛋白代偿性的过度表达^[32]。这种现象的出现将使联合用药作用大打折扣,限制了外排蛋白抑制剂的临床应用。3.联合应用抗真菌药物和质子泵抑制剂,利用质子泵抑制剂 ATP 酶的特性,减少外排转运蛋白的能量供应从而削弱其外排作用^[8]。现已有研究表明, Pma1p 是与真菌耐药最为相关的膜质子泵^[33],应用 Pma1p 抑制剂依布硒能够有效降低白色念珠菌对氟康唑的抵抗^[34],但其临床应用的安全性问题也有待进一步的验证。

总之,对外排转运蛋白与真菌耐药相关性的深入研究,有助于人们对致病真菌更好的认识,并为临床治疗及预防真菌感染提供理论依据及指导。

参考文献(References)

- [1] Liao Y, Chen M, Hartmann T, et al. Epidemiology of opportunistic invasive fungal infections in China: review of literature[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(2): 361-368
- [2] Liu JY, Shi C, Wang Y, et al. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China [J]. Res Microbiol, 2015, 166(3): 153-161
- [3] Prasad R, Rawal MK. Efflux pump proteins in antifungal resistance[J]. Front Pharmacol, 2014, 5: 202
- [4] 刘焱斌, 吕晓菊. 近平滑念珠菌的流行病学及致病机制的研究进展 [J]. 实用医院临床杂志, 2016, (02): 33-38
Liu Yan-bin, Lv Xiao-ju. Research progress in epidemiology and pathogenic mechanism of *Candida parapsilosis*[J]. Practical Journal of Clinical Medicine, 2016, (02): 33-38
- [5] 王蔚, 周愚, 赵灵, 等. 侵袭性肺曲霉感染诊治进展 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011, (05): 500-504
Wang Wei, Zhou Yu, Zhao Ling, et al. The progress of diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillus infection [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2011, (05): 500-504
- [6] 范欣, 肖盟, 王贺, 等. 新型隐球菌显色微量肉汤稀释法药敏流行病学折点的建立[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, (10): 2215-2218
Fan Xin, Xiao Meng, Wang He, et al. Epidemiological cutoff values of antifungal agents for clinical *Cryptococcus neoformans* determined by colorimetric broth microdilution method [J]. Chin J Nosocomiol, 2016, (10): 2215-2218
- [7] Prasad R, Rawal MK, Shah AH. *Candida* Efflux ATPases and Antiporters in Clinical Drug Resistance[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 892: 351-376
- [8] Holmes AR, Cardno TS, Strouse JJ, et al. Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance [J]. Future Med Chem, 2016, 8 (12): 1485-1501
- [9] Gaur M, Choudhury D, Prasad R. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans* [J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2005, 9(1): 3-15
- [10] Puri N, Prakash O, Manoharlal R, et al. Analysis of physico-chemical properties of substrates of ABC and MFS multidrug transporters of pathogenic *Candida albicans* [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45 (11): 4813-4826
- [11] Shukla S, Saini P, Smriti, et al. Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p [J]. Eukaryot Cell, 2003, 2 (6): 1361-1375
- [12] Holmes AR, Keniya MV, Ivnitski-Steele I, et al. The monoamine oxidase A inhibitor clorgyline is a broad-spectrum inhibitor of fungal ABC and MFS transporter efflux pump activities which reverses the azole resistance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(3): 1508-1515
- [13] 毛琼蕾, 陈小清, 房月. 抗真菌药物耐药机制的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, (14): 6660-6662
Mao Qiong-lei, Chen Xiao-qing, Fang Yue. The research progress of antifungal drug resistance mechanism [J]. Chin J Clinicians

- (Electronic Edition), 2013, (14): 6660-6662
- [14] Franz R. A fourth gene from the *Candida albicans* CDR family of ABC transporters[J]. 1998, 220(1-2): 91-98
- [15] Schuetzner-Muehlbauer M, Willinger B, Egner R, et al. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast [J]. Int J Antimicrob Agents, 2003, 22(3): 291-300
- [16] Liu TT, Lee RE, Barker KS, et al. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(6): 2226-2236
- [17] Mandal A. A key structural domain of the *Candida albicans* Mdr1 protein[J]. Biochem J, 2012, 445(3): 313-322
- [18] Dias PJ, Sa-Correia I. Phylogenetic and syntenic analyses of the 12-spanner drug: H (+) antiporter family 1 (DHA1) in pathogenic *Candida* species: evolution of MDR1 and FLU1 genes [J]. Genomics, 2014, 104(1): 45-57
- [19] Znaidi S, De Deken X, Weber S, et al. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*[J]. Mol Microbiol, 2007, 66(2): 440-452
- [20] Cannon RD, Holmes AR. Learning the ABC of oral fungal drug resistance[J]. Mol Oral Microbiol, 2015, 30(6): 425-437
- [21] Xu D, Jiang B, Ketela T, et al. Genome-wide fitness test and mechanism-of-action studies of inhibitory compounds in *Candida albicans*[J]. PLoS Pathog, 2007, 3(6): e92
- [22] Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(5): 1773-1777
- [23] Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata* [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4): 1199-1203
- [24] Niimi M, Nagai Y, Niimi K, et al. Identification of two proteins induced by exposure of the pathogenic fungus *Candida glabrata* to fluconazole [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 782(1-2): 245-252
- [25] Amirrajab N, Badali H, Didehdar M, et al. In Vitro Activities of Six Antifungal Drugs Against *Candida glabrata* Isolates: An Emerging Pathogen[J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9(5): e36638
- [26] Ricardo E, Miranda IM, Faria-Ramos I, et al. In vivo and in vitro acquisition of resistance to voriconazole by *Candida krusei* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(8): 4604-4611
- [27] He X, Zhao M, Chen J, et al. Overexpression of Both ERG11 and ABC2 Genes Might Be Responsible for Itraconazole Resistance in Clinical Isolates of *Candida krusei* [J]. PLoS One, 2015, 10 (8): e0136185
- [28] Yang ML, Uhrig J, Vu K, et al. Fluconazole Susceptibility in *Cryptococcus gattii* Is Dependent on the ABC Transporter Pdr11 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 60(3): 1202-1207
- [29] Meneau I, Coste AT, Sanglard D. Identification of *Aspergillus fumigatus* multidrug transporter genes and their potential involvement in antifungal resistance[J]. Med Mycol, 2016, 54(6): 616-627
- [30] Prasad R, Shah AH, Rawal MK. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 892: 327-349
- [31] Saunders NR, Habgood MD, Mollgard K, et al. The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system?[J]. F1000Res, 2016, 5
- [32] Opperman TJ, Nguyen ST. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 421
- [33] Andres MT, AUID- Oho, Acosta-Zaldivar M, et al. Antifungal Mechanism of Action of Lactoferrin: Identification of H⁺-ATPase (P3A-Type) as a New Apoptotic-Cell Membrane Receptor [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(7): 4206-4216
- [34] Billack B, Pietka-Ottlik M, Santoro M, et al. Evaluation of the antifungal and plasma membrane H⁺-ATPase inhibitory action of ebiselen and two ebiselen analogs in *S. cerevisiae* cultures[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2010, 25(3): 312-317