

曲霉菌对唑类药物的耐药机制最新研究进展

刘登科, 牛虹博, 葛正茂, 刘宇鹏

(中国人民解放军联勤保障部队第967医院 ICU, 辽宁大连 116000)

摘要: 侵袭性曲霉病 (invasive *Aspergillosis*, IA) 是一种死亡率极高的机会性感染疾病, 疾病早期诊断率低, 其病原曲霉菌广泛存在于自然界中。多烯类、唑类和棘白菌素是治疗侵袭性曲霉病的主要药物, 其中唑类药物在临床应用较多。近年流行病学调查发现, 不仅侵袭性曲霉病发病率逐年上升, 而且曲霉菌对唑类药物的耐药率也逐渐增加, 其耐药形势日益严峻, 对人类健康造成了极大威胁。其中, 曲霉菌的外排系统、生物膜的产生、基因的改变以及环境的选择作用等因素都参与了曲霉菌对唑类药物的耐药。因此, 该文针对曲霉菌对唑类药物耐药机制的最新研究进展作以简要综述, 以期曲霉菌耐药菌株的监测以及新型治疗药物作用靶点的研制提供理论基础。

关键词: 曲霉菌; 唑类药物; 耐药机制; cyp51; hapE

中图分类号: R379; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 02-161-04

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2020.02.044

Recent Advances in the Mechanism of *Aspergillus* Resistance to Azole Drugs

LIU Deng-ke, NIU Hong-bo, GE Zheng-mao, LIU Yu-peng

(ICU of the 967 Hospital, the Joint Logistic Support Force of the People's Liberation Army of China, Liaoning Dalian 116000, China)

Abstract: Invasive aspergillosis (IA) is an opportunistic infectious disease with high mortality, low early diagnosis rate, and its pathogen *Aspergillus* widely exists in nature. Polyene, Azole and Acanthomycin are the main drugs for the treatment of invasive *Aspergillosis*. Epidemiological survey found in recent years, not only the increasing incidence of invasive *Aspergillosis*, and *Aspergillus* of azole drug resistant rate also increased gradually, the situation of drug resistance is becoming increasingly serious, caused a great threat to human health. Among them, the efflux system of *Aspergillus*, the generation of biofilm, the change of gene and the selective action of environment are all involved in the resistance of *Aspergillus* to azole drugs. Therefore, this paper briefly reviewed the latest progress in the research on the mechanism of *Aspergillus* resistance to azole drugs, in order to provide a theoretical basis for the monitoring of *Aspergillus* resistance strains and the development of new therapeutic drug targets.

Keywords: *Aspergillus*; azole drugs; drug resistance mechanism; cyp51; hapE

曲霉菌在自然界中分布广泛且种属众多, 在湿润的土壤、谷类中都可存在^[1-2]。其本身为条件致病菌, 正常情况下不致病, 但是当人体免疫功能下降时, 即可侵入人体, 造成侵袭性曲霉病 (invasive *Aspergillosis*, IA)^[3]。因为 IA 的死亡率高、早期诊断率低^[4-5], 所以针对曲霉菌的杀菌药物就显得尤为重要。目前, 治疗曲霉菌感染常用三类抗真菌药物: 多烯类、唑类和棘白菌素^[6], 其中伏立康唑 (voriconazole, VRC) 被美国的最新指南推荐为曲霉菌病的一线治疗药物^[7]。但越来越多的研究显示, 曲霉菌在世界范围内对于唑类药物的耐药率逐渐升高, 给临床治疗带来极大困难, 严重威胁了病患的生命安全^[5-9]。由于多烯类药物具有较强的毒性, 棘白菌素类药物的价格较为昂贵, 因此唑类药物是治疗曲霉菌感染的一线药物^[8-9], 因此本文就曲霉菌对唑类药物的耐药机制的最新研究进展进行简要

阐述, 以期曲霉菌耐药菌株的监测以及新型治疗药物作用靶点的研制提供理论基础。

1 曲霉菌对唑类抗真菌药物的耐药机制

1.1 外排系统过表达将抗菌物质泵出菌体外 外排系统的过表达是曲霉菌对唑类药物产生耐药性的一种重要机制, 相关作用基因主要是三磷酸腺苷结合盒蛋白 (ATP-binding cassette transporter, ABC) 超家族和主要协同转运蛋白 (the major facilitator superfamily, MFS) 超家族^[10]。有关文献显示, 酿酒酵母的 PDR5 和 PDR15 蛋白参与了酿酒酵母对唑类药物的耐药, 而 CHAM10S 等^[11]人在烟曲霉中发现的 12 个 ABC 转运蛋白与酿酒酵母的 PDR5 和 PDR15 蛋白同源, 提示人们 ABC 转运蛋白可能与烟曲霉对唑类的耐药相关。到目前为止, 已知的与耐唑相关的转运蛋白有 5 个: AfuMDR1, AfuMDR2, AfuMDR3,

作者简介: 刘登科 (1986-), 男, 本科, 主治医师, 从事耐药菌株的监测及呼吸急危重症学研究, E-mail: ldking2005@163.com。

通讯作者: 刘宇鹏 (1974-), 男, 硕士, 主任医师, 从事急诊及重症医学研究, E-mail: 616081896@qq.com。

AfuMDR4 和 AtrF。AfuMDR1 和 AfuMDR2 是最早报道的 ABC 转运蛋白,直接参与了烟曲霉对药物的外泵作用^[12],而 AtrF 则是分离自对伊曲康唑(itraconazole, ITC)耐药的临床烟曲霉株,对 ITC 耐药株中 AtrF mRNA 的表达水平是对 ITC 敏感株的 5 倍^[13]。还有报道表明,对 ITC 耐药菌株中转运蛋白 AfuMDR3 和 AfuMDR4 的表达上调^[14];对泊沙康唑(posaconazole, POS)耐药烟曲霉株中 AfuMDR4 的表达上调^[15]。MFS 与 AfuMDR3 具有相似性,SUN 等^[16]人通过研究发现,MFS 转运蛋白 Mdr1p 可以通过细胞膜的质子梯度为转运体提供能量,其过表达可导致曲霉菌对唑类药物耐药性的产生。然而,关于曲霉菌外排系统过表达将唑类药物泵出菌体外的机制尚未研究透彻,还需要进一步详细的研究。

1.2 曲霉菌生物膜的产生 曲霉菌的耐药性可以通过生物膜的产生来调节,生物膜不仅可以在恶劣环境中保护病原体,还能引起暂时性的对抗真菌药物的耐药性^[17-18]。此前 MOWAT 等^[19]人在培养曲霉菌时发现其形成的生物膜结构对抗真菌药物具有耐药性,随后 BEAUVAIS 等^[20]人则报道了烟曲霉菌落表面的细胞外基质的作用。他们认为烟曲霉细胞外基质有助于菌丝结合在一起形成生物膜结构,阻止药物扩散到真菌感染部位,从而降低了药物敏感度。PAUL 等^[17]人也认为生物膜的形成是曲霉菌对抗真菌药物的高最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的原因。此外,在生物膜结构中,多种耐药蛋白被激活,也可通过主动外排系统泵出抗真菌药物^[15]。生物膜有关感染的死亡率极高,现有药物治疗难以治愈,因此对生物膜在耐药性中的研究十分重要。

1.3 曲霉菌自身基因的改变

1.3.1 cyp51 的突变与过表达:目前常用的抗真菌药物的作用机理主要是通过干扰麦角固醇的生物合成来影响真菌细胞膜的形成^[21]。自 1997 年首次报道烟曲霉唑类耐药菌株以来,越来越多的人对其耐药分子机制进行了探讨^[22]。在烟曲霉属中,唑类药物的目标是蛋白 cyp51,它有两个同源的基因编码,即 cyp51A 和 cyp51B,其序列一致性为 63%,相关研究表明,大多数烟曲霉唑类耐药株的出现都与 cyp51A 的点突变有关^[23]。在烟曲霉菌中羊毛甾醇 14- α -脱甲基酶由 cyp51A 编码,是真菌细胞膜重要成分麦角固醇生物合成途径的关键酶。唑类抗真菌药中的氮原子可以结合位于 cyp51A 活性位点的血红素的铁原子上。通过这种方法,可以阻断羊毛甾醇第 14 位碳原子的脱甲基作用,从而干扰麦角固醇的合成。缺乏麦角固醇会改变细胞膜的流动性,

导致真菌细胞的死亡^[5,24]。

如前所述,大多数耐唑类菌株 cyp51A 发生了改变,而 cyp51B 在烟曲霉耐唑类药物菌株中的作用尚不清楚。近年来,也有相关研究报道了 cyp51B 在唑类耐药临床分离菌株中的作用^[25],BUIED 等^[26]人在所分离得到的 12 株烟曲霉临床耐药菌株中均发现了 cyp51B 的过表达。随后他们对 cyp51B 过表达的菌株进行了基因敲除,又对唑类药物敏感的菌株进行了 cyp51B 的过表达,验证了 cyp51B 的过表达与曲霉菌对唑类药物的耐药有关这一发现。

1.3.2 hapE 的突变:hapE 是 CCAAT 结合转录因子复合物亚基,hapE 的突变所引起的烟曲霉对唑类药物耐药是近年来发现的一种基因突变所致的耐药机制^[27]。这一发现由 CAMPS 等^[28]人于 2012 年发现并提出,他们通过全基因组测序、聚合酶链式反应等多种方法证明了 hapE 中 P88L 的替换是导致烟曲霉对唑类药物耐药性产生的原因。hapE 的突变会引起其与 CCAAT 复合物之间的亲和力变低,而减少了功能性 CCAAT 结合转录因子复合物后又会造曲霉菌致病力的减弱。GSALLER 等^[29]人进一步研究发现,CCAAT 结合转录因子复合物作为调控麦角固醇合成的负作用因子,若其减少,将会解除包括 cyp51 在内的多种关于麦角固醇合成的基因转录水平的抑制,造成麦角固醇的增多和耐药菌株的产生。

1.4 环境对耐药株的产生和传播 此外,环境对耐药株的产生和传播作用也不可忽视。多种唑类杀菌剂广泛用于农作物的保护,这些唑类杀菌剂的分子结构与三唑类药物相似,但曲霉菌并不是在农业中使用杀菌剂的目标病原体,曲霉菌在自然界分布广泛,土壤、作物中都有其孢子的存在,因此用杀菌剂处理过的作物上的真菌暴露于高浓度的唑类物质中^[5],导致了耐药株的产生和传播^[5,22,30]。截至目前,欧洲是烟曲霉对唑类药物耐药性最高的地区,其中基因型为 TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A 的耐药菌株已在欧洲各地发现,且被报道与农业杀菌剂的广泛使用有关^[22,31]。虽然对亚太地区报告表明,其三唑耐药率低于欧洲,但也出现了部分新型耐药菌株^[30,32],亚太地区和欧洲曲霉菌唑类药物耐药率的差异可能是由于亚洲国家对唑类杀菌剂的使用较少所致^[5]。

1.5 其他作用导致的耐药性的产生 热休克蛋白 90(heat shock proteins90, Hsp90)是一种真核分子伴侣蛋白,可以在环境作用下调控蛋白的折叠、运输和成熟^[33]。钙调神经磷酸酶不仅是 Hsp90 的沉默蛋白之一,还是钙信号通路的重要组成部分,在对唑类药物的耐药性中也发挥着一定作用。有关实

验发现,抑制了钙调神经磷酸酶后,烟曲霉对唑类药物的耐药性也随之下降^[5,9]。

外源性胆固醇在有氧条件可以作为麦角固醇的替代物,也是一种导致曲霉菌对唑类药物产生耐药的机制。体外实验发现当培养基中存在胆固醇血清时,伊曲康唑对烟曲霉的作用活性降低^[34]。另有研究发现,在烟曲霉中,一种固醇调节元件结合蛋白-SrbA可以通过`erg11`,`cyp51A`调节菌株对唑类药物的耐药性,而`srbA`的突变菌株(Δ `srbA`)对氟康唑(Fluconazole,FLC)和VRC表现出高度敏感^[35]。

2 讨论

近年流行病学调查发现,曲霉菌感染率正呈逐年上升趋势,再加上曲霉菌感染诊断率低,死亡率高的特点,对人类社会健康造成了极大威胁^[4-5]。目前,治疗曲霉菌感染常用三类抗真菌药物:多烯类、唑类和棘白菌素^[6,9]。其中,唑类药物广泛用于曲霉菌感染的预防、经验性治疗以及慢性真菌感染的长期保守治疗,其中VRC被推荐用作曲霉菌感染的一线治疗方案^[6-7,21]。但在过去的几年间,世界各地均有烟曲霉对唑类药物产生耐药性的报道,且报道数量仍在不断增加,所以对曲霉菌进行耐药率和耐药机制的研究就显得尤为重要^[9,21]。因此,对于以上情况,本文给与以下建议:由于抗菌剂在农业生产中的大规模使用,使得每个国家都应密切关注并调查最新耐药株的流行情况,并依据调查结果在耐药株发生率高的地区积极调整治疗方案。实验室则应对临床曲霉菌分离株进行常规药敏试验,以便临床医生选择最佳的抗真菌治疗方案。而对于正在进行单唑类抗真菌药物治疗的患者,需进行密切监测,当发现唑类耐药、临床治疗失败时,应迅速调整新的治疗方案,使之包括两性霉素B,或在VRC中加入一种棘白菌素。总的来说,有效的抗真菌管理对于控制耐药性的产生至关重要,本文针对曲霉菌对唑类药物的耐药机制的最新研究进展作了简要阐述,以期曲霉菌耐药菌株的监测以及新型治疗药物作用靶点的研制提供理论基础,但耐药性的研究是项大工程,仍有许多机制不够明确,需要人类进一步探究。

参考文献:

- [1] KWON-CHUNG K J, SUGUI J A. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(12): e1003743.
- [2] 徐媛,陈敏,廖万清. 中国侵袭性曲霉病流行病学现状[J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13(1): 57-60.
XU Yuan, CHEN Min, LIAO Wanqing. Epidemiology of invasive *Aspergillois* in China [J]. Chinese Journal of Mycology, 2018,13(1):57-60.
- [3] 马梦亭,王凤超. 临床患者血流真菌感染的实验诊断及治疗研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 161-164.
MA Mengting, WANG Fengchao. Advances in experimental diagnosis and treatment of blood flow fungal infection in clinical patients [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(4):161-164.
- [4] 姜鉴芳,梅亚宁,张世昌,等. 不同实验室环境下ELISA法检测血清GM结果的可靠性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(1): 101-103.
LOU Jianfang, MEI Yaning, ZHANG Shichang, et al. Reliability study on serum GM results by ELISA method in different laboratory conditions [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(1):101-103.
- [5] RIVERO-MENENDEZ O, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, MELLADO E, et al. Triazole resistance in *Aspergillus spp*: A worldwide problem?[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2016, 2(3): 21.
- [6] SHISHODIA S K, TIWARI S, SHANKAR J. Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus species* against antifungal agents[J]. Mycology, 2019, 10(3): 151-165.
- [7] MISCH E A, SAFDAR N. Updated guidelines for the diagnosis and management of *Aspergillois*[J]. Journal of Thoracic Disease, 2016, 8(12): E1771-E1776.
- [8] 张丽,王贺,肖盟,等. E-test方法与微量肉汤稀释法检测念珠菌属对唑类抗真菌药物的敏感性评价[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 67-70.
ZHANG Li, WANG He, XIAO Meng, et al. Comparison of E-test and broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida species* to azoles [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(4):67-70.
- [9] 陈勇,韩黎. 深部真菌医院感染及其耐药性现状[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(4): 372-375.
CHEN Yong, HAN Li. Nosocomial infections of deep fungi and their drug resistance status[J]. Chinese Journal of Disinfection. 2016,33(4):372-375.
- [10] CANNON R D, LAMPING E, HOLMES A R, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22(2): 291-321.
- [11] CHAMILOS G, KONTOYIANNIS D P. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*[J]. Drug Resistance Updates, 2005, 8(6): 344-358.
- [12] TOBIN M B, PEERY R B, SKATRUD P L. Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*[J]. Gene, 1997, 200(1/2): 11-23.
- [13] SLAVEN J W, ANDERSON M J, SANGLARD D, et al. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, `atrF`, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate[J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 199-206.

- [14] NASCIMENTO A M, GOLDMAN G H, PARK S, et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(5): 1719-1726.
- [15] RAJENDRAN R, MOWAT E, MCCULLOCH E, et al. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(5): 2092-2097.
- [16] SUN Nuo, LI Dongmei, FONZI W, et al. Multidrug-resistant transporter *mdr1p*-mediated uptake of a novel antifungal compound[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(12): 5931-5939.
- [17] PAUL S, LUDEÑA Y, VILLENA G K, et al. High-quality draft genome sequence of a biofilm forming lignocellulolytic *Aspergillus higer* strain ATCC 10864[J]. Standards in Genomic Sciences, 2017, 12(1): 37.
- [18] KAUR S, SINGH S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*[J]. Medical Mycology, 2014, 52(1): 2-9.
- [19] MOWAT E, BUTCHER J, LANG S, et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(Pt 9): 1205-1212.
- [20] BEAUVAIS A, SCHMIDT C, GUADAGNINI S, et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*[J]. Cellular Microbiology, 2007, 9(6): 1588-1600.
- [21] 喻玮, 楼亚玲, 裘云庆, 等. 曲霉菌对唑类抗真菌药物的耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43 (7) : 801-805.
- YU Wei, LOU Yaling, QIU Yunqing, et al. Research progress on the mechanism of *Aspergillus fungi* resistant to azoles family antifungal agents [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2018, 43(7): 801-805.
- [22] LINDEN J W, ARENDRUP M C, WARRIS A, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*[J]. Emerging Infectious Diseases, 2015, 21(6): 1014-1041.
- [23] SNELDERS E, KARAWAJCZYK A, SCHAFTENAAR G, et al. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(6): 2425-2430.
- [24] CHOWDHARY A, SHARMA C, HAGEN F, et al. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms[J]. Future Microbiology, 2014, 9(5): 697-711.
- [25] WARRILOW A G, MELO N, MARTEL C M, et al. Expression, purification, and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14- α demethylase (CYP51) isoenzymes A and B[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(10): 4225-4234.
- [26] BUIED A, MOORE C B, DENNING D W, et al. High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(3): 512-514.
- [27] HORTSCHANSKY P, ANDO E, TUPPATSCH K, et al. Deciphering the combinatorial DNA-binding code of the CCAAT-binding complex and the iron-regulatory basic region leucine zipper (bZIP) transcription factor HapX[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(10): 6058-6070.
- [28] CAMPS S M, DUTILH B E, ARENDRUP M C, et al. Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50034.
- [29] GSALLER F, HORTSCHANSKY P, FURUKAWA T, et al. Sterol biosynthesis and azole tolerance is governed by the opposing actions of *SrbA* and the CCAAT binding complex[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(7): e1005775.
- [30] 陈先华, 牛军, 郝飞. 烟曲霉菌对唑类抗真菌药的耐药机制研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10 (3) : 418-423.
- CHEN Xianhua, NIU Jun, HAO Fei. Progress in the mechanisms of azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* [J]. Chinese Journal of Clinicians(Electronic Edition), 2016, 10(3): 418-423.
- [31] CHEN Yong, LU Zhongyi, ZHAO Jingjun, et al. Epidemiology and molecular characterizations of azole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates from China[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(10): 5878-5884.
- [32] HAGIWARA D, TAKAHASHI H, FUJIMOTO M, et al. Multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* harboring Cyp51A TR46/Y121F/T289A isolated in Japan[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2016, 22(8): 577-579.
- [33] LAMOTH F, JUVVADI P R, FORTWENDEL J R, et al. Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*[J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(11): 1324-1332.
- [34] XIONG Quanbo, HASSAN S A, WILSON W K, et al. Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(2): 518-524.
- [35] WILLGER S D, PUTTIKAMONKUL S, KIM K, et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(11): e100020.

收稿日期: 2020-01-06

修回日期: 2020-01-24