

# 细菌外排泵抑制剂研究进展

孙影, 顾觉奋\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 细菌外排泵造成了抗生素耐药的严重问题, 为此, 近年来外排泵抑制剂研究广受关注。外排泵抑制剂可以抑制耐药细菌对外排, 从而恢复其对抗生素的敏感性。简要介绍几类外排泵的结构, 综述化学合成和天然产物来源的各类外排泵抑制剂的研究进展, 以期为研究者们提供新的思路, 设计或筛选出活性更好的新型外排泵抑制剂。同时还提出了外排泵抑制剂的研究方法和药敏实验的规范化问题, 希望人们更全面而准确地筛选、评价外排泵抑制剂及其临床应用价值。

**[关键词]** 抗生素耐药; 外排泵; 抑制剂; 研究方法

**[中图分类号]** R978.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094 (2018) 06-0411-09

## Research Progress of Bacterial Efflux Pump Inhibitors

SUN Ying, GU Juefen

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** Bacterial efflux pump (EP) has caused serious antibiotic resistance, and consequently much attention has been paid to efflux pump inhibitors (EPIs) in recent years. EPIs could inhibit the efflux of drugs from bacteria and restore the susceptibility of drug-resistant bacteria to antibiotics. In this review, the structural features of several types of EPs were briefly introduced, and the current progress of synthetic and natural EPIs was summarized, hoping to provide researchers with new ideas to design or screen out new EPIs with higher inhibitory activity. Meanwhile, for more accurate and comprehensive screening and evaluation of EPIs and their clinical effects, research methods for EPIs and standardization of their antimicrobial susceptibility testing (AST) were also proposed

**[Key words]** antimicrobial resistance; efflux pump; inhibitor; research method

全球监测数据显示, 抗生素耐药 (antibiotic resistance, AR) 已成为 21 世纪公共卫生安全的主要威胁<sup>[1]</sup>。人类的社会活动, 譬如大量使用抗生素控制细菌感染, 促进了细菌抗耐药性基因的自然选择, 导致了大量具有复杂基因型和表型的耐药细菌在全球不断出现和蔓延<sup>[2-3]</sup>。已知的细菌耐药的分子和生化机制包括抗生素结合靶标的改变、耐药酶催化抗生素失活以及细菌生物膜形成等<sup>[4]</sup>。通过细菌细胞膜上的外排泵 (efflux pumps, EPs) 将抗生素排出细胞外, 是临床上固有耐药和获得性多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 的主要机制, 在于革兰阴性菌如肠杆菌科、不动杆菌属和假单胞菌属中, 尤其以通过细菌细胞膜上的外排泵将抗生素排出细胞的固有耐药和获得性多药为常见方式<sup>[5]</sup>。另外, 目前市场上针对耐药革兰阴性菌的抗生素相对较少, 这些存在于阴性菌上的外排泵更是给临床阴性 MDR 菌株感染的治疗带来极大的挑战。本文综述

了化学合成和天然产物来源的各类外排泵抑制剂 (efflux pump inhibitors, EPIs) 的研究进展, 以期为研究者们提供新的思路。

### 1 细菌细胞膜上外排泵分类及其作用机制

根据氨基酸序列同源性, 研究人员将这些细菌细胞膜上的外排泵分为 5 大类<sup>[6]</sup>: 多药及毒性化合物外排分子家族 (multi-antimicrobial and toxic compound extrusion, MATE)、主要促进剂超家族 (major facilitator superfamily, MFS)、小多重耐药转运分子家族 (small multidrug resistance family, SMR)、耐药性结节化细胞分化分子家族 (resistance nodulation division family, RND) 以及三磷酸腺苷 (ATP) 结合盒超家族 (ATP-binding cassette superfamily, ABC) (见图 1)。所有的外排泵家族均由质粒或染色体编码, 具有不同的结构形态与底物特异性。在真菌和人体中, 涉及药物外排的大多数转运蛋白属于 ABC 家族外排泵, 通常被称为主要转运蛋白, 利用 ATP 水解的能量从细胞中泵出药物。相应地, MFS 和 SMR、RND 和 MATE 超家族被称为次级多药转运蛋白, 主要利用跨膜质子动

接受日期: 2018-03-05

\*通讯作者: 顾觉奋, 教授;

研究方向: 微生物制药;

Tel: 025-86200377; E-mail: juefengu@126.com

力 (PMF) 或钠 / 水合氢离子电化学梯度来促使药物从细胞内泵出。5 类外排泵的组成和一般作用机制见表 1。

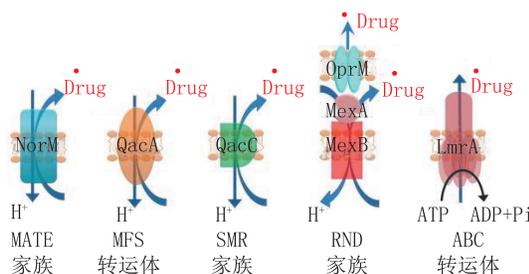


图 1 5 类外排泵的简单模式图

Figure 1 Simple model diagrams of five types of efflux pumps

表 1 5 类外排泵的组成和一般作用机制

Table 1 The composition and general mechanism of action of the five types of efflux pumps

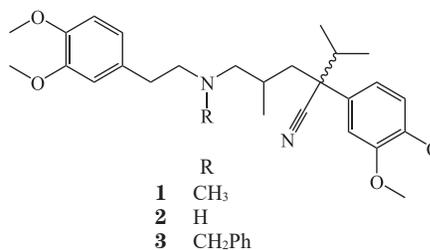
外排泵	结构描述	转运机制
RND	由36个跨膜的 $\alpha$ 螺旋构成的三聚体结构, 3个单体分别是内膜蛋白 (inner membrane protein, IMP)、外膜蛋白 (outer membrane protein, OMP) 和周质膜融合蛋白 (periplasmic membrane fusion proteins, MFP)	IMP决定了外排泵作用底物的广泛性, OMP与IMP为物质转运形成通道, 二者与MFP相互作用, 促使外排泵系统形成稳定结构, 通过进入、结合、外排三个步骤实现底物的转运, 药物与活性部位结合形成过渡态中间产物, 降低反应的活化能, 促进底物的外排
MFS	由2种不同的蛋白结构域构成, 即12碳和14碳跨膜结构, 14碳跨膜结构由12碳跨膜结构与输水中央环组成。12碳跨膜蛋白是由一个编码6碳跨膜结构 (穿膜 $\alpha$ 螺旋) 的基因重复表达并在膜内外以轴对称方式形成	2个6碳穿膜 $\alpha$ 螺旋被称为N、C蛋白结构域, 结构域中的多个带电荷氨基酸残基能够与质子结合, 利用胞内外的质子浓度梯度提供的化学势能为跨膜转运供能, 实现底物在细胞内外的转运, 作用机制实质上是一种交替通路机制
ABC	由2个疏水跨膜结构域 (TMD) 及2个亲水细胞质ATP结合域 (nucleotide binding domain, NBD) 组成	NBD水解ATP为细胞跨膜转运提供能量, TMD与底物特异性结合形成中间产物, 通过构象的改变将底物转运至细胞膜外
SMR	SMR家族转运蛋白较小, 只有4个跨膜区, 是 $H^+$ 偶联外排泵 (由质子驱动供能的转运蛋白), EmrE是其代表成员之一	SMR家族前3个跨膜区中保守的氨基酸残基侧链与底物疏水部位结合, 药物与带电荷残基的质子交换并驱动药物进出输水通道, 孔蛋白OmpW参与跨越外膜的EmrE特异性底物的流出 <sup>[7]</sup>
MATE	MATE家族具有12个穿膜结构域, 面朝外的构象具有2个向内膜外边层开放的入口, 有一个较宽的中心底物结合腔 <sup>[8]</sup>	由质子势能和钠离子浓度梯度共同提供能量将药物泵出细胞外, Asp41的质子化对于在运输底物期间构象调节是必需的 <sup>[8,9]</sup>

## 2 外排泵抑制剂

### 2.1 化学合成外排泵抑制剂

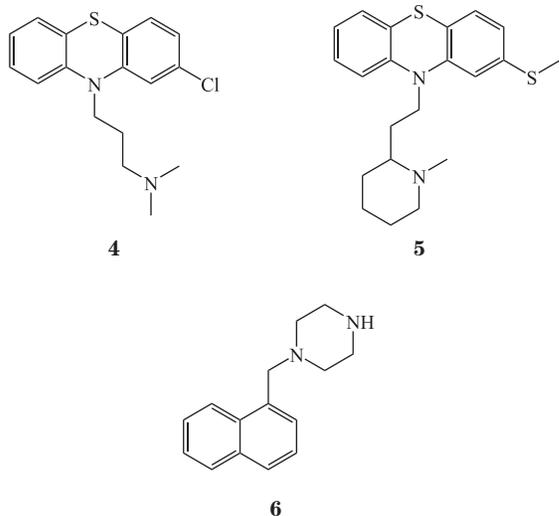
**2.1.1 维拉帕米及其类似物** 维拉帕米 (verapamil, VER, **1**) 是 L-型电压依赖型钙通道阻断剂, 近年来多被用于治疗高血压、心绞痛、心律失常等。VER 可阻断结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*, Mtb) 的外排泵, 能够降低各种抗分枝杆菌药物的最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) <sup>[10-12]</sup>。目前, VER 的原核外排泵抑制机制尚未完全阐明。部分研究认为维拉帕米与外排泵有直接相互作用, Chen 等<sup>[13]</sup> 研究则提出, VER 在生理 pH 下是质子化的两性性分子 (pKa 9.68), 可使 VER 能溶解在脂质双分子层中, 其蓄积可增加细菌细胞膜通透性并干扰膜蛋白的功能; 类似膜活性剂, VER 可破坏膜功能并诱导膜应激反应, 从而与抗结核杆菌药物如利福平或贝达喹啉产生协同作用。尽管由于系统性副作用或药物相互作用等不确定因素, 临床上尚未使用 VER 作为 EPI, 但 VER 及其类似物仍有望作为可开发利用的 EPI 先导化合物。Adams 等<sup>[11]</sup> 研究

表明, R-verapamil、去甲-VER (norverapamil, **2**) 与 VER 对于降低感染巨噬细胞模型中巨噬细胞诱导的药物耐受性同样有效, 提示其逆转耐药性的机制与 VER 及其类似物的钙通道阻断活性并不直接相关, 而可能是抑制了细胞膜上的外排泵逆转了模型的耐药。Singh 等<sup>[10]</sup> 也合成了一系列 VER 类似物并计算了部分抑制浓度指数 (FICI), 以评估这些化合物与利福平对实验菌株 H37Rv 是否有协同活性, 发现化合物 **3** 显示出最好的协同活性 (FICI=0.3), 其对照 VER 的 FICI 为 0.5。



**2.1.2 吩噻嗪类和 1-(1-萘基甲基)-哌嗪** 吩噻嗪类 (phenothiazines) 化合物 **4** 在临床上具有如抗精神病、止吐, 抗组胺和抗胆碱能活性等广泛的治疗作用。除此

之外, 吩噻嗪对各种类型细胞均有抗增殖作用, 且被证实与各种化疗剂有协同作用<sup>[14]</sup>。吩噻嗪类除了能增强巨噬细胞的细胞内杀伤作用或直接作用于分枝杆菌外, 还能作用于病原体外排泵, 从而增加药物在细胞内的积累, 增强抗结核杆菌药物的治疗效果。De Keijzer 等<sup>[15]</sup>研究显示, 化合物 **5** 可通过减少主动外排所需的能量而间接抑制外排泵的活性, 而且其对分枝杆菌的作用也会引起膜介导的外排泵抑制。Kern 等<sup>[16]</sup>对一系列芳基哌嗪类化合物进行筛选时, 得到了目前被广泛使用的外排泵抑制剂 1-(1-萘基甲基)-哌嗪 (NMP, **6**), 与最常用的苯丙氨酸-精氨酸  $\beta$ -萘酰胺 (phenylalanyl arginyl  $\beta$ -naphthylamide, PA $\beta$ N, MC-207 110, **7**) 相比, 其活性稍弱, 50 mg·L<sup>-1</sup> 时才能降低左氧氟沙星对大肠埃希菌产 AcrB 的 MIC, 且 NMP 与 PA $\beta$ N 的特异性差异很大, 例如, NMP 可使临床分离的大肠埃希菌对溴化乙锭 (EtBr) 更敏感, 却不能提高大肠埃希菌对利福平和克拉霉素的敏感性, 而 PA $\beta$ N 恰恰相反。然而, 由于潜在的血清素激动作用, 化合物 **6** 很可能对人体产生神经或情绪上的严重副作用, 所以其目前开发成临床可用药物的可能性不大。



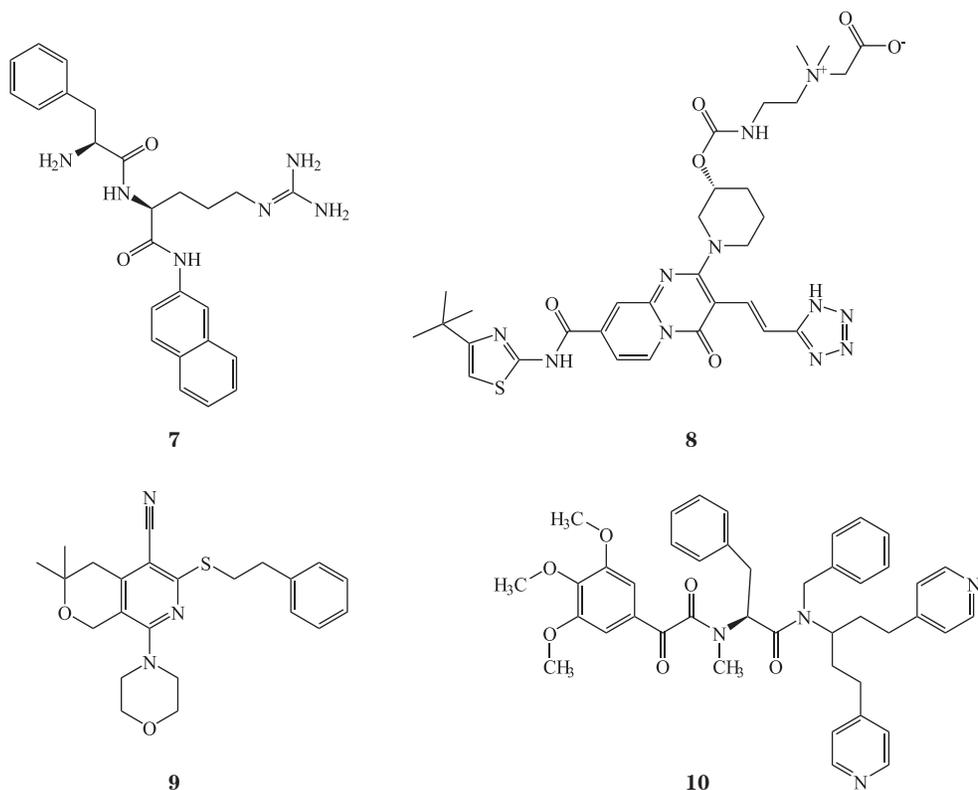
**2.1.3 质子导体** 作为外排泵抑制剂, 通常研究的质子载体为羰基氧化物间氯苯胺 (CCCP)、2,4-二硝基苯酚 (DNP) 和缬氨霉素 (valinomycin, VLM), 这些质子载体主要通过降低跨膜电位来抑制外排泵的活性。这些化合物可以很大程度地抑制 MFS 外排泵的活性, CCCP 和 DNP 通过修饰跨膜电化学电位来分散膜质子动力 (proton-motive force, PMF), 并且是氧化磷酸化的化学抑制剂, 可抑制 ATP 合酶的活性, 因此对 ABC

超家族外排泵有抑制作用<sup>[17]</sup>。此外, Milano 等<sup>[18]</sup>研究表明, CCCP 可通过抑制 RND 家族 MmpS5-MmpL5 外排泵而降低 BCG 菌株对喹类的耐药性; 而 VLM 则是钾特异性外排泵抑制剂, 从链霉菌中提取所得, 可促进 K<sup>+</sup> 通过脂质膜向低电位的梯度运动, 从而消耗 K<sup>+</sup> 产生的电化学梯度, 最终抑制依靠跨膜质子和电化学梯度作为能量来源的一系列外排泵如 P55, 并且对 MFS 和 ABC 超家族具有靶向性<sup>[19]</sup>。

**2.1.4 PA $\beta$ N** 迄今为止, 很多 EPI 的重要先导化合物包括 P-糖蛋白抑制剂 (如 VER) 被作为金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌的外排泵抑制剂而被广泛研究, 主要抑制革兰阳性菌 MFS 外排泵家族, 减少氟喹诺酮类及多种阳离子化合物 (如阿霉素、嘌呤霉素等) 的泵出。然而, MexB 和 AcrB 革兰阴性菌 RND 泵具有广泛的底物特异性, 除了上述底物, 还可以泵出中性化合物 (如氯霉素) 和酸性化合物 (如  $\beta$ -内酰胺类)。既往研究多认为几乎不可能找到革兰阴性菌外排泵的抑制剂。在这种情况下, PA $\beta$ N 的发现显得至关重要。PA $\beta$ N 可抑制铜绿假单胞菌中 MexAB-OprM、MexCD-OprJ 和 MexEF-OprN 这 3 种主要 RND 泵, 作为广谱抑制剂, PA $\beta$ N 能有效减少氟喹诺酮等的外排, 也可抑制大肠埃希菌的 AcrAB-TolC 泵及铜绿假单胞菌的 MexAB-OprM 泵。Lamers 等<sup>[20]</sup>认为 PA $\beta$ N 会使铜绿假单胞菌的细胞膜活化, 变得不稳定, 间接导致进入菌体内的抗生素增多, 从而降低抗生素的 MIC; 但 Misra 等<sup>[21]</sup>认为, PA $\beta$ N 的主要作用机制是抑制外排泵活性, 延长 PA $\beta$ N 温育时间, 进而体现膜去稳定作用。尽管研究人员对 PA $\beta$ N 结构进行修饰, 试图改善其活性、血清稳定性, 希望将其急性毒性降低至人体可耐受的水平, 然而针对 PA $\beta$ N 结构进行优化得到的一系列衍生物, 虽然确实提高了稳定性和抑制外排泵的活性, 但尚未有可以作为候选药物的化合物, 能进展到临床前研究<sup>[22-23]</sup>。

**2.1.5 吡喃并吡啶化合物 MBX2319 及其类似物 D13-9001** 最早的可用于临床的 RND 外排泵抑制剂是拟肽 EPI 家族 (包括被广泛报道的化合物 PA $\beta$ N), 该系列化合物是铜绿假单胞菌等革兰阴性菌 RND 外排泵的竞争性抑制剂; 另外还有一系列吡啶并嘧啶 EPIs, 其代表是 D13-9001 (**8**), 已作为先导化合物进入临床前开发阶段。吡啶并嘧啶 EPIs 对于铜绿假单胞菌的 MexAB 外排泵具有较强的特异性, 对 MexXY 泵没有活性, 这可能是导致其在 2007 年研发停滞的一个主要原因<sup>[24]</sup>。

近期, D13-9001 与 AcrB、MexB 结合的 3D 晶体结构研究显示, D13-9001 可结合到泵底物结合口袋附近的独特位点 [称为“疏水阱” (hydrophobic trap)]<sup>[25]</sup>。2014 年, Opperman 等<sup>[26]</sup>报道了结构类似的吡喃并吡啶 (pyranopyridine, Pypy) 化合物 MBX2319 (**9**), 其为大肠埃希菌 AcrAB 外排泵的抑制剂, 并认为 MBX2319 在大肠埃希菌中的主要靶标是完整的膜转运蛋白 AcrB; MBX2319 不具有膜破坏性或内在的抗菌活性, 但可增强包括氟喹诺酮类、 $\beta$ -内酰胺类、红霉素、氯霉素以及利奈唑胺等 AcrB 底物抗生素的活性。Vargiu 等<sup>[27]</sup>利用分子动力学 (molecular dynamic, MD) 模拟确定 MBX2319 在 AcrB 底物结合口袋中的结合位点, 认为 MBX2319 同 D13-9001 一样, 与 AcrB 结合在疏水阱。随后 Sjuts 等<sup>[28]</sup>获取了与 AcrBper (一种工程蛋白, 由可溶形式的 AcrB 周质“搬运工”结构域组成) 结合的 MBX2319 的晶体复合物结构, 发现 MBX2319 可与 T 原体<sup>[29]</sup>的疏水阱结合, 在疏水阱中, 其可与深层结合口袋和疏水阱内部的疏水残基相互作用。



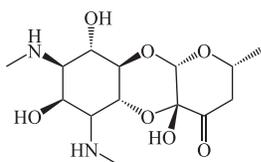
**2.1.7 壮观霉素** 壮观霉素 (spectinomycin, **11**) 是结构类似于氨基糖苷类的抗生素, 具有较强的细菌核糖体亲和力, 可选择性地结合细菌核糖体亚基, 从而抑制蛋白质的合成, 因此其与传统氨基糖苷类抗生素的活性

### 2.1.6 Timcodar

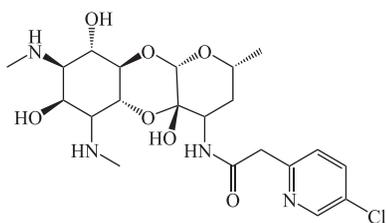
Grossman 等<sup>[30]</sup>关于 P-糖蛋白抑制剂 timcodar (VX-853, **10**) 的体外研究显示, 当 timcodar 单独使用时, 对肉汤培养的多药耐药 (MDR) Mtb 有着较弱的抑制作用 ( $MIC=19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 同样条件下, timcodar 与利福平 (RIF)、贝达喹啉 (bedaquiline) 和氯法齐明 (clofazimine) 合用则显示出良好的协同作用; 而以巨噬细胞为宿主培养结核杆菌时, timcodar 与 RIF、莫西沙星或 bedaquiline 联合使用对 MDR Mtb 的抑制活性更是提高了约 10 倍 ( $50\%$ 抑制浓度为  $1.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 动物实验研究显示, timcodar 可增强 RIF 和异烟肼 (INH) 的作用, 减少肺部 Mtb 负荷, 并降低慢性感染的复发率, 这种增强作用可能是由 timcodar 自身的抗菌活性和宿主靶向机制相结合的结果。然而, De Knecht 等<sup>[31]</sup>使用时间-杀菌动力学测定法试图找到能够增强莫西沙星 + 利奈唑胺的增效剂, 却发现 VER 和 timcodar 均不能提高莫西沙星 + 利奈唑胺的抗结核感染活性。

类似。然而, 壮观霉素抗 Mtb 的活性远不如氨基糖苷类, 这可能归因于外排泵 Rv1258c 对壮观霉素的大量外排。Lee 等<sup>[32]</sup>通过用各种酰胺羰基连接的官能团取代糖上的酮基, 设计了一系列壮观霉素类似物 (spectinamides),

试图避免细菌的主动外排, 其中吡咯和哌啶环, 特别是卤素取代的哌啶类似物表现出最好的抗分枝杆菌和抑制外排泵的活性。后续研究还获得了酰胺衍生物 1599 (spectinamide 1599, **12**), 其能够大幅降低各种抗分枝杆菌抗生素 (包括克拉霉素、多西环素和克林霉素) 的 MIC, 然而 spectinamide 1599 并不能增强壮观霉素的活性, 这表明其并不是通过抑制 Rv1258c 的外排功能来规避其介导的耐药性<sup>[33]</sup>。



11



12

**2.1.8 SILA-421** 类似上述外排泵抑制剂, SILA-421 也被认为是多重耐药和广泛耐药结核病的一种增效剂<sup>[34]</sup>: 体外单独使用时, SILA-421 的杀菌活性显示出浓度依赖性和时间依赖性, 能增强 INH 和 RIF 对耐多药结核病的疗效, 且与 INH 有良好的协同作用, 可防止出现 INH 暴露后的 INH 抵抗, 然而, SILA-421 并不能增强莫西沙星 (MXF) 或阿米卡星 (AMK) 的效果; 此外, SILA-421 还可增强 RIF 对抗 RIF 菌株的活性, 并能够完全清除抗 RIF 分枝杆菌。然而动物实验研究显示, 在基因型菌株诱导的结核病小鼠中, 异烟肼-利福平-吡嗪酰胺治疗方案中添加 SILA-421, 13 周后并没有观察到疗效增强<sup>[35]</sup>。

## 2.2 天然产物来源的外排泵抑制剂

**2.2.1 利血平** 利血平 (reserpine, RES, **13**) 是被广泛用于治疗轻度或中度高血压的吲哚生物碱, 且具有镇静作用。早期的研究表明, RES 可以抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的四环素外排泵 Tet (K), 并使四环素对 MRSA 的 MIC 从 128 mg·L<sup>-1</sup> 降低至 32 mg·L<sup>-1</sup>; 针对多药耐药性革兰阳性菌, 利血平显示的 EPI 活性涵盖了 ATP 结合盒 (ABC 多药外排) 超家族

和主要促进剂超家族 (MFS)<sup>[36]</sup>。一些学者认为其机制为: 通过抑制 MmpL7、IniA 和 P27-P55 外排泵, 从而逆转 Mtb 对 INH 和 EtBr 的耐药性<sup>[37]</sup>。Sun 等<sup>[38]</sup> 研究也证实, 除了 INH 和 EtBr, RES 能够降低甚至逆转广泛耐药 (XDR) Mtb、MDR Mtb 对氧氟沙星的耐药性。

**2.2.2 胡椒碱** 胡椒碱 (piperine, **14**) 是广泛存在于辣椒植物果实中的一种生物碱, 具有解毒、增强中药的吸收和生物利用度等功效, 以非竞争性方式抑制 P-糖蛋白活性, 通过影响药物的吸收、代谢, 从而提高药物及辅助药物的生物利用度<sup>[39]</sup>。针对 RIF 抗性的 Mtb (H37Rv 菌株) 和临床分离菌株的研究发现, 胡椒碱可以通过抑制外排泵 Rv1258c 的过表达来降低利福平的 MIC, 有效增强 RIF 在 Time-killing 实验中的杀菌活性, 并且还显著延长了 RIF 的抗生素后效应 (PAE)<sup>[40]</sup>。对于耻垢分枝杆菌, 32 mg·L<sup>-1</sup> 的胡椒碱可通过对外排泵的抑制, 使 EtBr 在细胞中的积聚增加, 并将 EtBr 的 MIC 降低 2 倍<sup>[41]</sup>。另外, 在感染 Mtb 的小鼠中, 胡椒碱可以促进 T 细胞和 B 细胞的生长, 提高 Th-1 细胞因子和巨噬细胞的活性, 还能诱导 Th-1 亚型 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞的分化并增加干扰素-γ (INFγ) 和白细胞介素-2 (IL-2) 的分泌<sup>[42]</sup>。

**2.2.3 小檗碱** 小檗碱 (berberine, **15**) 与胡椒碱结构有许多相似性, 具有微弱的抗微生物活性, 是广泛存在于小檗属植物中的两亲性异喹啉生物碱, 也是目前公认的外排泵底物。与抗生素共同使用时, 随着小檗碱的细胞内浓度增加, 其自身的抗菌效果会增强, 而类似地, 由于小檗碱竞争性抑制细菌细胞膜上的外排泵, 使得抗生素的抑菌效应也有所增强<sup>[43-44]</sup>。晶体学研究证实, 小檗碱可以通过结合 NorA 和 RamR 外排泵, 抑制多药耐药金黄色葡萄球菌甚至 Mtb 细菌的生长<sup>[45-46]</sup>。然而, 小檗碱的口服生物利用度较低, 口服给药后由于胃肠道内吸收差, 加之严重的首过代谢及 P-糖蛋白介导的外排作用, 而导致血浆药物浓度较低, 因此对小檗碱进行结构改造仍有待深入。

**2.2.4 粉防己碱** 粉防己碱 (tetrandrine, **16**) 是来源于植物粉防己块根中的双苄基异喹啉类生物碱, 主要用于治疗支气管哮喘。与 VER 类似, 粉防己碱是 L-型钙通道和 P-糖蛋白的抑制剂, 因此, 很可能与 VER 通过相似的机制来调节 Mtb 外排泵的活性。Zhang 等<sup>[47]</sup> 发现粉防己碱可降低 INH 和乙胺丁醇 (EMB) 对多重耐药 Mtb 的 MIC, 有效率高达 82%, 并且认为将 INH 或

EMB 与粉防己碱联合使用不仅可提高抗结核效果, 而且有助于减少药物剂量和副作用。

### 2.2.5 槲皮素

槲皮素 (quercetin, **17**) 属于类黄酮, 存在于许多蔬菜、水果、叶子和谷物中。Suriyanarayanan 等<sup>[48]</sup>关于蛋白质结合位点分子模型的研究表明, 槲皮素可与 Mtb 的 Mmr 和大肠埃希菌中 EmrE 外排泵稳定结合, 且槲皮素和外排泵之间的分子相互作用比 VER、RES 及氯丙嗪更加稳定。Dey 等<sup>[49]</sup>研究还进一步证实, 槲皮素对多种能产生  $\beta$ -内酰胺酶的 Mtb 和肺炎克雷伯菌均具有抗菌作用, 这意味着槲皮素可减少药物外排, 有望成为结核病辅助治疗中潜在的非抗生素类药物。

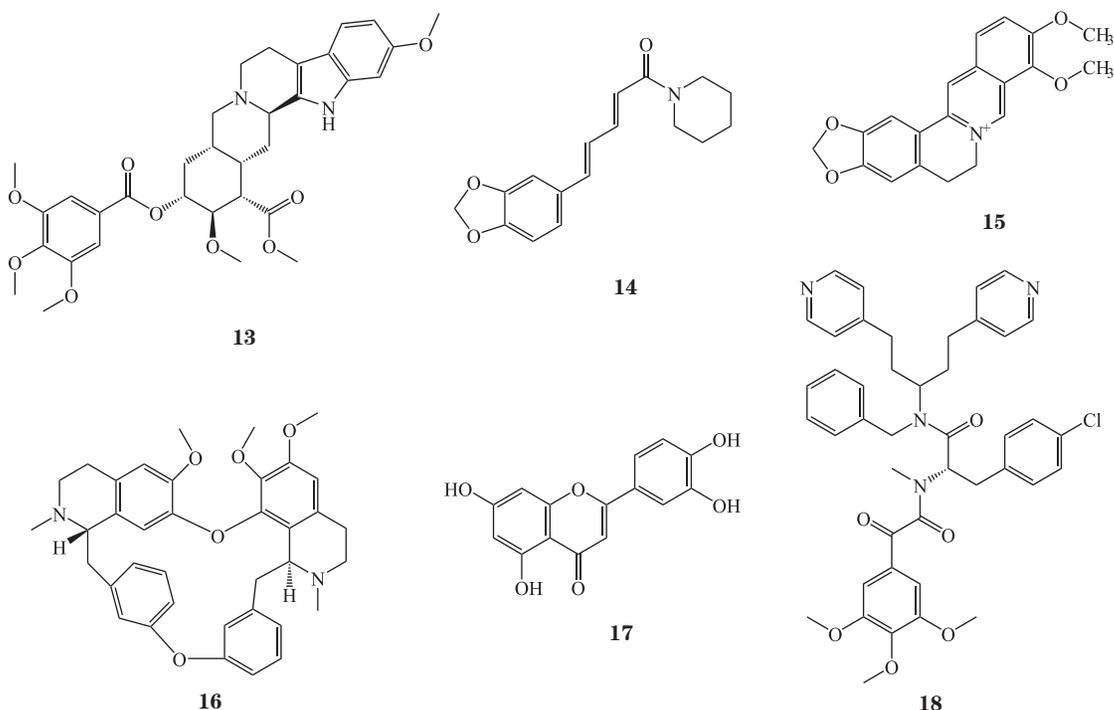
### 2.2.6 锥丝碱

止泻木 (*Holarrhena antidysenterica*) 是用作治疗痢疾、发热和细菌感染的传统中草药, 其主要活性成分均具有抗腹泻和抗疟原虫的作用。Siriyong 等<sup>[50]</sup>对止泻木的提取物锥丝碱 (conessine) 进行研究时发现, conessine 能够提高广泛耐药鲍曼不动杆菌对抗生素的敏感性, 且其作用是通过抑制 MexAB-OprM 外排泵来

实现。在 MexAB-OprM 过表达的菌株中, conessine 可使抗生素的 MIC 降低至原来的 1/8, 对头孢噻肟、左氧氟沙星和四环素的敏感性甚至达到野生型菌株的水平, 而在 MexB 缺陷型菌株中观察到的 conessine 与抗生素之间的协同作用则表明, conessine 很可能会抑制铜绿假单胞菌中存在的其他外排系统<sup>[50]</sup>。

### 2.2.7 法尼醇和苯丙酯类

法尼醇 (farnesol, **18**) 是一种广泛存在于柠檬草油和香茅油等精油中的天然植物代谢物, 可抑制氧化还原反应, 并通过引起细胞质中  $K^+$  渗漏而破坏膜的完整性。在耻垢分枝杆菌中进行的棋盘法实验显示, 法尼醇显著增加了 EtBr 的积累, 32  $mg \cdot L^{-1}$  时使 EtBr 的 MIC 降低至原来的 1/8<sup>[51]</sup>。此外, 法尼醇与利福平共用时可通过抑制 Mtb 外排泵从而产生协同作用, 发挥抗结核效应, 加之其对人体的低毒性, 法尼醇的潜在临床应用价值日渐受到人们的重视。另外, Roy 等<sup>[52]</sup>从高良姜根部提取得到的苯丙酯类 (phenylpropanoids) EPIs 研究显示, 其也可增加耻垢分枝杆菌中 EtBr 的积累、降低 EtBr 的 MIC。



## 3 外排泵抑制剂的研究方法及其对抗耐药菌药物研发的指导意义

### 3.1 化合物库虚拟筛选外排泵抑制剂

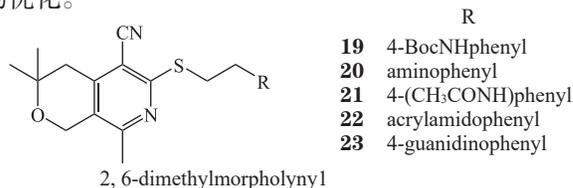
虚拟筛选是目前发现先导化合物最经济有效的方法, 多是从天然产物库中寻找具有潜在活性的分子结

构。很多文献也报道了源于植物的天然产物兼顾抗菌和外排泵抑制的双重活性。因此, 基于配体或高通量的虚拟筛选技术被不断用于从天然化合物库中筛选针对 RND 的 EPIs<sup>[53-54]</sup>。Aparna 等<sup>[53]</sup>使用高通量虚拟筛选技术, 基于其课题组内部创建的天然产物库, 利用

药效团模型筛选针对 AcrB 和 MexB 外排泵的抑制剂, 配合棋盘法实验, 最终确定 2 种对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌中 AcrB 和 MexB 蛋白有较好抑制活性的天然产物——毛花苷 C (lanatoside C) 和大豆苜蓿素 (diadzein)。Astolfi 等<sup>[53]</sup> 也通过开发 2 种新型 3D 药效团模型, 筛选出了 3 个可有效抑制金黄色葡萄球菌中 NorA 外排泵的化合物。Choudhury 等<sup>[54]</sup> 也利用分子对接方法, 从 328 个次生植物代谢产物中筛选出了针对铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 外排泵中细胞质输出蛋白 MexB 具有抑制活性的分子——对香豆酸 (*p*-coumaric acid), 计算机初步筛选后, 同样使用棋盘协同试验进行体外验证外排泵抑制活性, 并证实对香豆酸能够增强环丙沙星对 MexAB-OprM 过表达的铜绿假单胞菌的杀菌效应。尽管这些化合物的临床应用价值还有待确认, 但是不可否认的是, 不断从庞大的化合物库中寻找潜在的 EPIs 来应对随时可能爆发的耐药菌危机是有必要的。

### 3.2 基于 SAR 的计算机辅助药物设计

对先导化合物的结构进行改造是优化其活性的重要方法, 其中分子机制和构效关系 (structure-activity relationship, SAR) 的研究对于结构理性设计、合理修饰的指导意义重大。以造成革兰阴性菌严重耐药的 RND 外排泵为例, 最具临床研究价值的抑制剂是以 MBX2319 为代表的吡喃并吡啶化合物, 基于构效关系的研究, Nguyen 等<sup>[56]</sup> 合成了一系列 MBX2319 衍生物, 并证实其中的一些化合物 (19~23) 在增强左氧氟沙星和哌拉西林的抗大肠埃希菌活性方面比 MBX2319 更有效。随后该课题组绘制了 MBX2319 骨架结构的分子活性图谱, 鉴别出对外排泵抑制活性至关重要的结构中心, 以及可以被修饰以提高活性、代谢稳定性和溶解度结构域的几个衍生物, 在原有活性的基础上, 它们具有更优的药动学性质<sup>[57]</sup>。然而, 除了吡喃并吡啶类 EPIs, 由于毒性等因素停滞在临床前或者体外实验阶段的众多 EPIs 都需要进一步的结构改进, 以获得溶解度更好、清除机制较慢的新化合物以实现体内活性的优化。



### 3.3 规范外排泵抑制剂药敏实验

EPIs 的微生物药敏实验 (agent sensitivity test,

AST) 本身非常简单, 用完整细胞进行常规 AST 就可以直接观察 EPIs 对外排泵抑制的活性强弱, 目前用临床分离株进行 EPIs 的开发或验证是科研人员最常采用的手段。然而, 控制抑制剂的使用浓度及其他相关实验条件, 对于排除非外排泵抑制介导的抑菌因素是至关重要的, 因为即使 EPIs 的亚抑菌浓度也可能对细菌生长产生影响, 所以, 组合型 AST 研究应重视 EPI 本身的潜在抗菌活性或膜透化作用等。典型的案例是常被用作 RND 外排泵抑制剂的 PAβN, 除了固有的高水平外膜透化作用, 其对表达 RND 泵的不同大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 MIC 值变化范围为 32~512 mg·L<sup>-1</sup>, 这 2 个特点都使得 PAβN 可通过外排泵抑制作用之外的机制, 与联用的抗生素产生协同作用, 因此若完全忽略一些化合物本身的抗菌活性及其潜在的细胞膜渗透功能, 很可能导致错误地评估其作为 EPI 在临床分离株中的作用<sup>[20]</sup>。另一方面, 当前针对革兰阳性菌筛选出的潜在 EPIs 较革兰阴性菌更多, 而直接将阳性菌的典型 EPI (如利血平) 作用于阴性菌进行药敏实验的研究仍需进一步探讨, 因为实验条件, 抗生素种类、菌株种类及其外排泵类型均会影响实验结果。另外有研究认为, 不同的药物组合可能会产生不同的协同效应, 这也可能会诱导新的耐药性<sup>[33]</sup>。目前, 并没有确定的指南或标准去规范人们如何选择合适的 EPI, 如何选择适当的 EPI 浓度, 如何选择具有已知外排泵系统、培养基和质量可控的标准菌株, 也没有规范去指导这些标准化方法与其他方法的联合应用情况, 特别是表征临床分离菌株外排介导的药物抗性的 RT-qPCR 技术。

## 4 结语

目前, 病原菌的多药耐药性是临床感染中非常棘手的问题, 其中常见的原因之一是细菌的外排泵系统对多种药物均会有外排作用。以外排泵为作用靶点的药物开发研究已有很多报道, 由于其安全性、特异性和明确的机制等问题均有待于进一步解决, 外排泵抑制剂的临床应用还有漫长的路要走。目前, 大量针对 RND 型 AcrAB-TolC 和 Mex 泵的研究也揭开了 MDR 泵的耐药机制的结构与生化基础。尽管如此, 在开发能够规避 MDR 的新型抗生素或临床有效的 EPIs 时, 建立一套标准化的方法, 用于鉴别临床分离菌株耐药外排泵的基因型和表型对多药耐药性质的影响仍是十分必要的。

## 【参考文献】

- [1] Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon [J]. *Pathog Glob Health*, 2015, 109(7): 309-318.
- [2] D'costa V M, King C E, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient [J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 457-461.
- [3] Finley R L, Collignon P, Larsson D G, et al. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57(5): 704-710.
- [4] Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials [J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 28(9): 13-27.
- [5] Blair J M, Richmond G E, Piddock L J. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance [J]. *Fut Microbiol*, 2014, 9(10): 1165-1177.
- [6] Saier M H Jr, Reddy V S, Tsu B V, et al. The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D372-D379.
- [7] Beketskaia M S, Bay D C, Turner R J. Outer membrane protein Omp participates with small multidrug resistance protein member EmrE in quaternary cationic compound efflux [J]. *J Bacteriol*, 2014, 196(10): 1908-1914.
- [8] Nishima W, Mizukami W, Tanaka Y, et al. Mechanisms for two-step proton transfer reactions in the outward-facing form of MATE transporter [J]. *Biophys J*, 2016, 110(6): 1346-1354.
- [9] Jin X, Shao Y, Bai Q, et al. Insights into conformational regulation of PfMATE transporter from *Pyrococcus furiosus* induced by alternating protonation state of Asp41 residue: a molecular dynamics simulation study [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(6): 1173-1180.
- [10] Singh K, Kumar M, Pavadai E, et al. Synthesis of new verapamil analogues and their evaluation in combination with rifampicin against *Mycobacterium tuberculosis* and molecular docking studies in the binding site of efflux protein Rv1258c [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 24(14): 2985-2990.
- [11] Adams K N, Szumowski J D, Ramakrishnan L. Verapamil, and its metabolite norverapamil, inhibit macrophage-induced, bacterial efflux pump-mediated tolerance to multiple anti-tubercular drugs [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210(3): 456-466.
- [12] Gupta S, Tyagi S, Bishai W R. Verapamil increases the bactericidal activity of bedaquiline against *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(1): 673-676.
- [13] Chen C, Gardete S, Jansen R S, et al. Verapamil targets membrane energetics in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(5): e02107-17.
- [14] Jaszczyszyn A, Gasiorowski K, Swiatek P, et al. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity [J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(1): 16-23.
- [15] De Keijzer J, Mulder A, De Haas P E, et al. Thioridazine alters the cell-envelope permeability of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(6): 1776-1786.
- [16] Kern W V, Steinke P, Schumacher A, et al. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57(2): 339-343.
- [17] Ikonomidis A, Tsakris A, Kanellopoulou M, et al. Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development [J]. *Letters Appl Microbiol*, 2008, 47(4): 298-302.
- [18] Milano A, Pasca M R, Provvedi R, et al. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system [J]. *Tuberculosis*, 2009, 89(1): 84-90.
- [19] Ramon-Garcia S, Martin C, Thompson C J, et al. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(9): 3675-3682.
- [20] Lamers R P, Cavallari J F, Burrows L L. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAbetaN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60666.
- [21] Misra R, Morrison K D, Cho H J, et al. Importance of real-time assays to distinguish multidrug efflux pump-inhibiting and outer membrane-destabilizing activities in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(15): 2479-2488.
- [22] Opperman T J, Nguyen S T. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition [J]. *Frontiers Microbiol*, 2015, 6: 421.
- [23] Lomovskaya O, Bostian K A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(7): 910-918.
- [24] Yamaguchi A, Nakashima R, Sakurai K. Structural basis of RND-type multidrug exporters [J]. *Frontiers Microbiol*, 2015, 6: 327.
- [25] Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, et al. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters [J]. *Nature*, 2013, 500(7460): 102-106.
- [26] Opperman T J, Kwasny S M, Kim H S, et al. Characterization of a novel pyranopyridine inhibitor of the AcrAB efflux pump of *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(2): 722-733.
- [27] Vargiu A V, Ruggerone P, Opperman T J, et al. Molecular mechanism of MBX2319 inhibition of *Escherichia coli* AcrB multidrug efflux pump and comparison with other inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(10): 6224-6234.
- [28] Sjuts H, Vargiu A V, Kwasny S M, et al. Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2016, 113(13): 3509-3514.
- [29] Pos K M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(5): 782-793.
- [30] Grossman T H, Shoen C M, Jones S M, et al. The efflux pump inhibitor timcodar improves the potency of antimycobacterial agents [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(3): 1534-1541.
- [31] De Knecht G J, Van Der Meijden A, De Vogel C P, et al. Activity of moxifloxacin and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis* in combination with potentiator drugs verapamil, timcodar, colistin and

- SQ109 [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 49(3): 302-307.
- [32] Lee R E, Hurdle J G, Liu J, *et al.* Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux [J]. *Nat Med*, 2014, 20(2): 152-158.
- [33] Bruhn D F, Scherman M S, Liu J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of synergism between anti-tubercular spectinamides and non-classical tuberculosis antibiotics [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:13985.
- [34] Simons S O, Kristiansen J E, Hajos G, *et al.* Activity of the efflux pump inhibitor SILA 421 against drug-resistant tuberculosis [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41(5): 488-489.
- [35] De Knecht G J, Bakker-Woudenberg I A, Van Soolingen D, *et al.* SILA-421 activity *in vitro* against rifampicin-susceptible and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, and *in vivo* in a murine tuberculosis model [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 46(1): 66-72.
- [36] Pasca M R, Guglielame P, De Rossi E, *et al.* mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4775-4777.
- [37] Bianco M V, Blanco F C, Imperiale B, *et al.* Role of P27 -P55 operon from *Mycobacterium tuberculosis* in the resistance to toxic compounds [J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 195.
- [38] Sun Z, Xu Y, Sun Y, *et al.* Ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with efflux pump activity independent of resistance pattern and genotype [J]. *Microbial Drug Res*, 2014, 20(6): 525-532.
- [39] Meghwal M, Goswami T K. Piper nigrum and piperine: an update [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(8): 1121-1130.
- [40] Sharma S, Kumar M, Sharma S, *et al.* Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8): 1694-1701.
- [41] Jin J, Zhang J, Guo N, *et al.* The plant alkaloid piperine as a potential inhibitor of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(Pt 2): 223-229.
- [42] Sharma S, Kalia N P, Suden P, *et al.* Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2014, 94(4): 389-396.
- [43] Wojtyczka R D, Dziedzic A, Kepa M, *et al.* Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative *Staphylococcus* strains *in vitro* [J]. *Molecules*, 2014, 19(5): 6583-6596.
- [44] Zhou X Y, Ye X G, He L T, *et al.* *In vitro* characterization and inhibition of the interaction between ciprofloxacin and berberine against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Antibiot*, 2016, 69(10): 741-746.
- [45] Yamasaki S, Nikaido E, Nakashima R, *et al.* The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2078.
- [46] Thai K M, Ngo T D, Phan T V, *et al.* Virtual screening for novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors from natural products [J]. *Med Chem*, 2015, 11(2): 135-155.
- [47] Zhang Z, Yan J, Xu K, *et al.* Tetrandrine reverses drug resistance in isoniazid and ethambutol dual drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 153.
- [48] Suriyanarayanan B, Sarojini Santhosh R. Docking analysis insights quercetin can be a non-antibiotic adjuvant by inhibiting Mmr drug efflux pump in *Mycobacterium* sp. and its homologue EmrE in *Escherichia coli* [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2015, 33(8): 1819-1834.
- [49] Dey D, Ray R, Hazra B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(10): 1474-1480.
- [50] Siriyong T, Srimanote P, Chusri S, *et al.* Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 405.
- [51] Jin J, Zhang J Y, Guo N, *et al.* Farnesol, a potential efflux pump inhibitor in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 7750-7762.
- [52] Roy S K, Pahwa S, Nandanwar H, *et al.* Phenylpropanoids of *Alpinia galanga* as efflux pump inhibitors in *Mycobacterium smegmatis* mc(2) 155 [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(7): 1248-1255.
- [53] Aparna V, Dineshkumar K, Mohanalakshmi N, *et al.* Identification of natural compound inhibitors for multidrug efflux pumps of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using *in silico* high-throughput virtual screening and *in vitro* validation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101840.
- [54] Choudhury D, Talukdar A D, Chetia P, *et al.* Screening of natural products and derivatives for the identification of RND efflux pump inhibitors [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2016, 19(9): 705-713.
- [55] Astolfi A, Felicetti T, Iraci N, *et al.* Pharmacophore-based repositioning of approved drugs as novel *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(4): 1598-1604.
- [56] Nguyen S T, Kwasny S M, Ding X, *et al.* Structure-activity relationships of a novel pyranopyridine series of Gram-negative bacterial efflux pump inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(9): 2024-2034.
- [57] Aron Z, Opperman T J. Optimization of a novel series of pyranopyridine RND efflux pump inhibitors [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2016, 33: 1-6.



**[本期栏目主编介绍]** 顾觉奋: 中国药科大学教授、研究生导师。历年来, 在中国药科大学执教的同时, 从事抗生素及微生物药物领域的科研工作。主持研制并完成了微生物药物或抗生素有关的32项科研课题, 曾获得多次省级科技成果鉴定证书、优秀论文奖及优秀教科书奖, 在采用现代生物技术筛选抗生素高产菌的研究方面达到国际水平。80年代初筹建了中国药科大学抗生素研究室(现为微生物制药教研室), 并担任学科带头人, 具有较深的理论造诣和长期的科研实践经验。笔耕不倦, 前后在国内一级刊物上发表论文230余篇; 主编并出版了《药学问答》、《抗生素》、《微生物药品化学与分析》、《分离纯化工艺原理》、《抗生素的合理应用》、《微生物药品研发动态——新技术、新产品及市场信息》、《生物制药工艺学》、《离子交换与吸附在制药工业上的应用》、《国内外微生物药物生产状况及市场分析》、《中华医学百科全书—微生物药理学卷》等教科书和专著10本, 在国内同行中颇有声望。