

· 综述 ·

真菌多药耐药外排机制的研究进展

康 焯¹, 周 密², 阎 澜³ (1. 原沈阳军区总医院北陵临床部, 辽宁 沈阳 110031; 2. 解放军 152 医院, 河南 平顶山 467000; 3. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433)

[摘要] 真菌多药耐药性是指真菌细胞对结构不同、作用靶点不同的药物同时具有耐药性的现象, 是导致临床抗真菌治疗失败的重要原因之一。本文综述了酿酒酵母、条件致病真菌白假丝酵母、光滑假丝酵母和烟曲霉中多药耐药相关转运蛋白、药物外排机制以及基因表达调控网络的研究进展, 旨在为深入了解真菌多药耐药性的机制、探讨克服多药耐药性的策略和提高抗真菌药物的药效提供参考。

[关键词] 真菌; 多药耐药; 外转运蛋白

[中图分类号] R978.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)06-0485-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.06.002

Progress of the drug efflux mechanisms underlying fungi multidrug resistance

KANG Ye¹, ZHOU Mi², YAN Lan³ (1. Beiling Clinical Department, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110031, China; 2. No. 152 Hospital of PLA, Pingdingshan 467000, China; 3. New Drug Research and Development Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] The multidrug resistance (MDR), characterized by the simultaneous acquisition of resistance to chemically and structurally different drugs, has caused antifungal treatment failure. This review focused on recent progresses in understanding of the multidrug resistance associated drug efflux transporter superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*, the opportunistic fungal pathogens *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Aspergillus fumigates*, along with the mechanisms underlying efflux pump and the regulatory networks involved. Investigation of these mechanisms and their impact on drug resistance may lead to strategies to overcome fungal multidrug resistance and improvement of drug efficacy.

[Key words] fungus; multidrug resistance; multidrug efflux transporters

近年来,随着条件致病真菌感染人群不断增加,抗真菌药物在免疫低下患者(如放/化疗及 AIDS 患者)中的广泛使用^[1],真菌多药耐药性及其机制越来越引起人们的关注。真菌细胞主要通过 4 种机制应激药物作用:改变药物作用靶点、促使药物失活、减少药物摄取及增加主动外排^[2],其中,外排作用可以降低细胞内药物累积,是引起真菌多药耐药性的主要原因。目前已知的真菌外排功能是通过真菌细胞膜上 ATP 结合盒转运蛋白 ABC 超家族(ATP-binding cassette superfamily)和易化蛋白载体超家族 MFS(major facilitator superfamily)分别通过与 ATP 水解酶或质子电化学梯度来运输并清除真菌

胞内的毒性物质^[3]。因此,进一步研究真菌耐药相关转运蛋白及药物外排机制,有助于发现克服多药耐药性的新策略。

1 酿酒酵母

酿酒酵母多药耐药性的产生通常是由于一对转录因子发生改变,进而引起某些靶基因过表达导致外排增加引起^[4]。多向耐药性蛋白(pleiotropic drug resistance, PDR)亚家族是酿酒酵母 ABC 转运蛋白超家族中最大的亚家族, PDR1 获得性功能(gain of function, GOF)行为是由于中央区域的单个氨基酸替代突变引起,许多不同氨基酸替代突变最终激活 PDR1 转录因子,进而诱导靶基因表达上调;同时 *pdr1* GOF 可诱导 *pdr5* mRNA 表达水平升高 10 倍,进而增加对药物的外排^[5]。HSP70 家族 *ssz1*(*pdr13*),其过表达可以对 *pdr1* 产生正调控作用,由 *ssz1* 激活的 *pdr1* 发挥抑制内质网相关的退化缺陷的功能^[6]。蛋白 ZUO1 拥有一个 13 个残

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470158)

[作者简介] 康 焯, 硕士, 主管药师. 研究方向: 临床药学、抗真菌药物治疗. E-mail: kangye1011@163.com

[通讯作者] 阎 澜, 博士, 副教授. 研究方向: 药理学、抗真菌药物作用机制. E-mail: ylan20001228@sina.com

基的碳末端,可以诱导 *pdr1* 的转录激活^[7]。ZUO1/SSZ1 蛋白复合物可以独立激活 *pdr1*,并直接与该基因的目标启动子绑定^[8]。PDR1 是药物受体蛋白,PDR1/PDR3 的中心区域可直接与放射性氟康唑结合,并引起下游基因表达上调。目前研究表明,PDR 转录因子不仅可以调控 ABC 转运蛋白,且对参与鞘脂合成的酶,磷脂运输及 7 次跨膜蛋白(如 RSB1,RTA1)也有调节作用^[9]。YAP1 的基础区域含有亮氨酸链(bZip),是最早发现的可以对 PDR 转录因子产生调控作用的蛋白之一。*Yap1* 是从一个类似 *pdr4* 的高度复制质粒中分离得到的。缺失 *yap1* 可以使酿酒酵母对氧化压力的敏感性升高,但不影响其耐药性,*yap1* 对 MFS 超家族 *flr1* 及 *atr1* 基因的表达有重要的调节作用^[10]。一种参与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine,PE)生物合成的酶 PSD1(生产 PE 的两个酶之一,位于线粒体内膜空间)过表达,可以增加 PDR3 依赖的反式激活,催化不活跃的 PSD1 诱导 PDR5 表达,但不能完成 PE 的生物合成^[11]。

目前已知的酿酒酵母 MFS 转运蛋白共有 22 个,这些蛋白集簇成两个亚家族,Drug : H⁺ antiporter family1 (DHA1) 和 Drug : H⁺ antiporter family2(DHA2),分别含有 12 个和 14 个跨膜域。酿酒酵母含有 12 个 DHA1 和 10 个 DHA2 转运蛋白,其中大部分可以对一种以上生长抑制化合物产生作用,如 *ScTPO1-4* 及 *ScQDR3* 可以对抗多胺毒性环境,*ScQDR2* 涉及钾的体内平衡,*ScQDR1*、*ScAZR1* 可以对氟康唑及酮康唑的刺激产生应答,氟康唑、伊曲康唑可以诱导 *ScYHK8* 表达上调,*ScTPO1* 在卡泊芬净的作用下高表达,且被认为是拥有最广泛底物的 MFS 超家族蛋白之一^[12]。

2 白假丝酵母

近年来侵袭性真菌感染的发病率、致死率逐渐增加,念珠菌属的感染占真菌感染总数的 73.4%,其中白假丝酵母占 47.8%,居念珠菌感染的首位^[13]。白假丝酵母有 28 个 ABC 家族转运蛋白,其中有 12 个功能尚不明确。这 28 个转运蛋白主要可分为 5 个已知的亚族,CaCDR1 属于 PDR 亚族,是首个被报道的致病真菌中的多向耐药性 ABC 转运蛋白^[4]。锌指结构的转录因子 *TAC1* (Transcriptional activator of CDR) 是目前发现的、可以调控 CDR1/CDR2 介导的多向耐药性的转录因子,*cdr1* 和 *cdr2* 在它们启动子区域有着共同的 *TAC1* 结合序列,称为药物应答片段(drug responsive element,

DRE)。 *TAC1* 缺失菌株对许多抗真菌药物和代谢抑制剂都表现出敏感性,但由于菌株中 *CDR1* 基础表达的残留,所以其对许多抗真菌药物的敏感性并没有达到 *cdr1Δ* 突变菌株的程度^[14]。

白假丝酵母共有 95 个 MFS 转运蛋白,簇集成 17 个家族。CaMDR1 是白假丝酵母中发现的第一个 MFS 超家族多药耐药性相关蛋白,它主要对唑类药物特别是氟康唑、环己酰亚胺和甲氧喹啉等发挥外排作用。CaMDR1 含有 564 个氨基酸,属于 DHA1 亚家族,它是由胞质循环连接在一起的分别含有 6 个 TMS- α 螺旋片段的结构域组成,研究者对 MDR1 结构和功能的分析表明,位于 *TMS5* 的氨基酸残基对药/质子转运活性至关重要。含锌结构的转录因子 MRR1 可调控 MDR1 的表达,MRR1 缺失可导致 MDR1 表达抑制^[15]。白假丝酵母 MFS 蛋白结构功能尚未有详细分析,有报道提示其主要的子家族在 N 终端存在极大的相似性,进而推测其 C 端区域可能参与底物分子识别,而 N 端参与质子迁移。此外,有研究发现,缺失 CaQDR1、CaQDR2 和 CaQDR3 转运蛋白可导致白假丝酵母被膜结构形成缺陷,并且在鼠实验中表现出毒力下降^[16],CaFLU1 可以在白假丝酵母细胞中直接发挥外排作用,降低对人类唾液抑菌肽组胺素 5 的敏感性^[17]。

3 光滑假丝酵母

光滑假丝酵母是第二个最常见的导致血液和黏膜念珠菌病的假丝酵母,致死率可达 38%~53%。光滑假丝酵母对唑类药物的天然低敏性及唑类药物在临床上的广泛应用,使得其他抗真菌药物(如两性霉素 B 和棘白素类)大量应用于临床。棘白素类是治疗光滑假丝酵母的一线药物,但随着临床使用频率增加,其耐药性也进一步增高^[18]。与其他念珠菌相似,光滑假丝酵母对唑类药物的耐受可能是由于编码基因 *erg11* 过表达或突变导致靶酶改变,以及过表达 ABC 转运蛋白,如 CgCDR1、CgCDR2 (PDH1) 及 CgSNG2,增加药物外排所引起。CgCDR1 是光滑假丝酵母最主要的转运蛋白,在大多数临床耐药菌株中表现出持续的高表达,有时伴随 CgCDR2 和 CgSNG2 表达上调^[19]。CgCDR1、CgCDR2 和 CgSNG2 蛋白都由 *Cg pdr1* 编码的含有 Zn₂Cys₆ 的锌指结构的转录因子调控。光滑假丝酵母多药耐药性在转录水平的调控机制与酿酒酵母高度一致,即 ρ^0 诱导激活 PDR 通路^[20]。Brun^[21] 等对光滑假丝酵母给予溴乙啶及唑类药物体外刺激,诱导产生呼吸缺陷突变体 ρ^0 ,该突变菌初始表现为

生长缺陷和毒力下降,但随着靶基因 *Cg cdr1* 表达上调,激活转录因子 *Cg PDR1*, ρ^0 突变菌开始表现出明显的耐药性。与酿酒酵母 *Sc pdr3* 相同,光滑假丝酵母线粒体 DNA 缺失(ρ^0)及线粒体酶磷脂酰丝氨酸脱羧酶(*Sc PSD1*)过表达时,可激活 PDR 通路,进而诱导 *Cg PDR1* 产生应答。

在光滑假丝酵母 MFS 超家族中,Costa 等^[22]发现 DHA1 亚家族转运蛋白 *Cg QDR2*、*Cg AQR1* 及 *Cg TPO3* 参与多药耐药性,可以抵抗多种毒性化合物作用。其中 *Cg QDR2*、*Cg TPO3* 参与对克霉唑、咪康唑、酮康唑和噻康唑的耐药,*Cg TPO3* 还可对抗氟康唑及伊曲康唑;*Cg AQR1* 主要参与对氟胞嘧啶的耐受,但对克霉唑作用不显著。Costa^[23]等进一步研究表明,*Cg AQR1* 及 *Cg TPO3* 还可参与对抗醋酸及多胺环境,帮助光滑假丝酵母在阴道黏膜及泌尿生殖道发挥致病性。另一个 MFS 超家族 DHA 转运蛋白 *Cg FLR1* (与白假丝酵母菌 *Ca MDR1* 同源)在 *Cg CDR1* 和 *Cg CDR2* 缺失菌中表现出对苯菌灵的抵抗作用,提示该蛋白可能参与唑类药物以外的耐药作用。

4 烟曲霉

在过去的几十年中,侵袭性曲霉菌在免疫低下人群中的感染率急剧上升,其发病率和致死率可高达 50%,其中烟曲霉是最主要的致病病原体^[24]。临床中用于治疗曲霉菌的药物有限,卡泊芬净等棘白素类药物只在局部有抑菌作用,目前唯一口服且广泛使用的治疗曲霉菌的有效药物是三唑类,特别是伊曲康唑和伏立康唑^[25]。但持续使用三唑类药物会导致曲霉菌对不同唑类药物产生耐药性。烟曲霉对多种唑类药物耐受的一般机制是其 *cyp51A* 编码的固醇 14 α -脱甲基酶这一靶酶水平改变。Snelders 等^[26]在临床耐唑类烟曲霉中发现,*cyp51A* L98H 突变体可对多种唑类药物耐受,它的形成与 *cyp51A* 启动子中 34bp 的重复串联序列有关。目前,L98H 突变体已在世界范围传播^[27]。Bueid 等^[28]对 64 株耐唑类药物的烟曲霉进行研究,发现 43% 的耐药菌株没有发生 *cyp51A* 突变,这与 Escríbano 等^[29]的研究结果一致,这些不依赖于 *cyp51A* 突变的耐药菌株随后被发现是由过表达 *CDR1B* (ABC B) 蛋白所引起。

烟曲霉中存在 50 个 ABC 转运蛋白及近 300 个 MFS 转运蛋白^[30]。在对唑类耐受的烟曲霉中,*cdr1B* mRNA 转录水平是野生型的 5~30 倍,而 *cdr1B* 缺失可使烟曲霉对伊曲康唑的敏感性提高 4

倍。缺失与 ABC B 相似的 ABC G 类转运蛋白 ABC A 也可以提高烟曲霉对药物的敏感性^[31]。药物刺激可以激活 *abcA* 和 *abcB* 的启动子,就如光滑假丝酵母的 *Cg cdr1*。在烟曲霉 MFS 超家族蛋白中,DHA2 亚家族转运蛋白 MFS56 诱导对伊曲康唑、泊沙康唑、拉夫康唑的耐药,而另一转运蛋白 AFMDR3 在两性霉素 B 的作用下高表达^[32]。此外,烟曲霉中 *Sc YAP1* 同源蛋白 *Af YAP1* 突变可导致烟曲霉产生耐药性^[33]。

5 展望

致病真菌的多药耐药性是目前抗真菌药物在化学治疗中面临的一个严重问题,单个基因的改变就可能引起病原体对多种药物的敏感性降低。临床上应用的抗真菌药物种类有限,研究真菌多药耐药性机制不仅可以帮助维持现有药物的药效,也是新药研发的关键。在过去的几十年中,多药耐药性相关 ABC 转运蛋白的功能已被广泛认识,目前研究较为深入的 MFS 超家族转运蛋白仅有 5% 左右,研究者已经掌握了大量多药耐药性相关基因目录,但调控这些基因的机制尚不清楚。另外,DHA 家族蛋白可对真菌的耐药性及宿主一病原体间的相互作用产生影响,不同于 ABC 转运蛋白广泛存在于真菌和人类宿主中,DHA 家族只保守存在于细菌及真菌中,暗示 DHA 家族蛋白可能成为新的抗真菌药物的靶点。因此,深入研究 MFS 转运蛋白可以进一步明确真菌耐药的机制,为今后真菌感染的预防、诊断及治疗提供更有效的依据。

【参考文献】

- [1] Morschhauser J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi[J]. Fungal Genet Biol, 2010, 47(2):94-106.
- [2] Ernst R, Kueppers P, Stindt J, et al. Multidrug efflux pumps: substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps—first come, first served? [J]FEBS J, 2010, 277(3):540-549.
- [3] Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(2):291-321.
- [4] Prasad R, Goffeau A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance[J]. Annu Rev Microbiol, 2012, 66:39-63.
- [5] Simonics T, Kozovska Z, Michalkova-Papajova D, et al. Isolation and molecular characterization of the carboxy-terminal *pdr3* mutants in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Curr Genet, 2000, 38(5):248-255.
- [6] Bosis E, Salomon D, Ohayon O, et al. *Ssz1* restores endoplasmic reticulum-associated protein degradation in cells ex-

- pressing defective cdc48-ufd1-npl4 complex by upregulating cdc48[J]. *Genetics*, 2010, 184(3):695-706.
- [7] Ducett JK, Peterson FC, Hoover LA, *et al.* Unfolding of the C-terminal domain of the J-protein Zuo1 releases autoinhibition and activates Pdr1-dependent transcription[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(1):19-31.
- [8] Prunuske AJ, Waltner JK, Kuhn P, *et al.* Role for the molecular chaperones Zuo1 and Ssz1 in quorum sensing via activation of the transcription factor Pdr1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(2):472-477.
- [9] Kolaczowska A, Manente M, Kolaczowski M, *et al.* The regulatory inputs controlling pleiotropic drug resistance and hypoxic response in yeast converge at the promoter of the aminosterol resistance gene RTA1[J]. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(3):279-292.
- [10] Teixeira MC, Dias PJ, Simoes T, *et al.* Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(2):249-255.
- [11] Gulshan K, Schmidt JA, Shahi P, *et al.* Evidence for the bifunctional nature of mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase: role in Pdr3-dependent retrograde regulation of PDR5 expression[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(19):5851-5864.
- [12] Teixeira MC, Cabrito TR, Hanif ZM, *et al.* Yeast response and tolerance to polyamine toxicity involving the drug : H⁺ antiporter Qdr3 and the transcription factors Yap1 and Cn4[J]. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 4):945-956.
- [13] Azie N, Neofytos D, Pfaller M, *et al.* The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance[®] registry and invasive fungal infections: update 2012[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 73(4):293-300.
- [14] Coste A, Turner V, Ischer F, *et al.* A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*[J]. *Genetics*, 2006, 172(4):2139-2156.
- [15] Mandal A, Kumar A, Singh A, *et al.* A key structural domain of the *Candida albicans* Mdr1 protein[J]. *Biochem J*, 2012, 445(3):313-322.
- [16] Shah AH, Singh A, Dhamgaye S, *et al.* Novel role of a family of major facilitator transporters in biofilm development and virulence of *Candida albicans*[J]. *Biochem J*, 2014, 460(2):223-235.
- [17] Li R, Kumar R, Tati S, *et al.* *Candida albicans* flu1-mediated efflux of salivary histatin 5 reduces its cytosolic concentration and fungicidal activity[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(4):1832-1839.
- [18] Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(5):503-535.
- [19] Torelli R, Posteraro B, Ferrari S, *et al.* The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*[J]. *Mol Microbiol*, 2008, 68(1):186-201.
- [20] Paul S, Schmidt JA, Moye-Rowley WS. Regulation of the CgPdr1 transcription factor from the pathogen *Candida glabrata*[J]. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(2):187-197.
- [21] Brun S, Dalle F, Saulnier P, *et al.* Biological consequences of petite mutations in *Candida glabrata*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56(2):307-314.
- [22] Costa C, Pires C, Cabrito TR, *et al.* *Candida glabrata* drug : H⁺ antiporter CgQdr2 confers imidazole drug resistance, being activated by transcription factor CgPdr1[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(7):3159-3167.
- [23] Costa C, Nunes J, Henriques A, *et al.* *Candida glabrata* drug : H⁺ antiporter CgTpo3 (ORF CAGL0I10384g): role in azole drug resistance and polyamine homeostasis[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(7):1767-1776.
- [24] Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults[J]. *Med Mycol*, 2013, 51(4):361-370.
- [25] Pound MW, Townsend ML, Dimondi V, *et al.* Overview of treatment options for invasive fungal infections[J]. *Med Mycol*, 2011, 49(6):561-580.
- [26] Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, *et al.* Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism[J]. *PLoS Med*, 2008, 5(11):e219.
- [27] Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, *et al.* Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR(3)(4)/L98H mutations in the cyp51A gene in India[J]. *PLoS one*, 2012, 7(12):e52871.
- [28] Bueid A, Howard SJ, Moore CB, *et al.* Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(10):2116-2118.
- [29] Escribano P, Pelaez T, Munoz P, *et al.* Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? [J] *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(6):2815-2820.
- [30] Kovalchuk A, Driessen AJ. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters[J]. *BMC genomics*, 2010, 11:177.
- [31] Rajendran R, Mowat E, McCulloch E, *et al.* Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5):2092-2097.
- [32] Bowyer P, Mosquera J, Anderson M, *et al.* Identification of novel genes conferring altered azole susceptibility in *Aspergillus fumigatus*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 332(1):10-19.
- [33] Qiao J, Liu W, Li R. Truncated Afyap1 attenuates antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole and confers adaptation of the fungus to oxidative stress[J]. *Mycopathologia*, 2010, 170(3):155-160.

[收稿日期] 2015-06-29 [修回日期] 2016-04-28

[本文编辑] 陈 静