

- [6] 房殿春,许国铭,赵晶京. Barrett 食管诊治共识(草案, 2005,重庆)[J]. 中华消化杂志,2006,11(1):46.
- [7] Takubo K,Aida J,Sawabe M,et al. The normal anatomy around the oesophagogastric junction: A histopathologic view and its correlation with endoscopy[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol,2008,22(4):569.
- [8] Ormeci N,Savas B,Coban S,et al. The usefulness of chromoendoscopy with methylene blue in Barrett's metaplasia and early esophageal carcinoma[J]. Surg Endosc,2008,22(3):693.
- [9] Ngamruengphong S,Sharma VK,Das A. Diagnostic yield of methylene blue chromoendoscopy for detecting specialized intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus:a meta-analysis[J]. Gastrointest Endosc,2009,69(6):1021.
- [10] Pohl J,May A,Rabenstein T,et al. Comparison of computed virtual chromoendoscopy and conventional chromoendoscopy with acetic acid for detection of neoplasia in Barrett's esophagus[J]. Endoscopy,2007,39(7):594.
- [11] Toyoda H,Rubio C,Befrits R,et al. Detection of intestinal metaplasia in distal esophagus and esophagogastric junction by enhanced-magnification endoscopy[J]. Gastrointest Endosc,2004,59(1):15.
- [12] Nguyen NQ,Leong RW. Current application of confocal endomicroscopy in gastrointestinal disorders[J]. J Gastroenterol Hepatol,2008,23(10):1483.
- [13] Becker V,Vieth M,Bajbouj M,et al. Confocal laser scanning fluorescence microscopy for in vivo determination of microvessel density in Barrett's esophagus[J]. Endoscopy,2008,40(11):888.
- [14] Zagaynova E,Gladkova N,Shakhova N,et al. Endoscopic OCT with forward-looking probe:clinical studies in urology and gastroenterology[J]. J Biophotonics,2008,31(2):114.
- [15] Falk GW. Autofluorescence endoscopy[J]. Gastrointest Endosc Clin N Am,2009,19(2):209.
- [16] Curvers WL,Singh R,Song LM,et al. Endoscopic tri-modal imaging for detection of early neoplasia in Barrett's esophagus:a multi-centre feasibility study using high-resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow band imaging incorporated in one endoscopy system[J]. Gut,2008,57(2):167.
- [17] Curvers WL, Van den Broek FJ,Reitsma JB,et al. Systematic review of narrow-band imaging for the detection and differentiation of abnormalities in the esophagus and stomach(with video)[J]. Gastrointest Endosc,2009,69(2):307.
- [18] Fock KM,Teo EK,Ang TL,et al. The utility of narrow band imaging in improving the endoscopic diagnosis of gastroesophageal reflux disease[J]. Clin Gastroenterol Hepatol,2009,7(1):54.
- [19] Herrero LA,Curvers WL,Bansal A,et al. Zooming in on Barrett oesophagus using narrow-band imaging:an international observer agreement study[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2009,21(9):1068.
- [20] Ramirez FC,Akins R,Shaukat M. Screening of Barrett's esophagus with string-capsule endoscopy:a prospective blinded study of 100 consecutive patients using histology as the criterion standard[J]. Gastrointest Endosc,2008,68(1):25.
- [21] Bhardwaj A,Hollenbeak CS,Pooran N,et al. A meta-analysis of the diagnostic accuracy of esophageal capsule endoscopy for Barrett's esophagus in patients with gastroesophageal reflux disease[J]. Am J Gastroenterol,2009,104(6):1533.
- [22] Boeriu AM,Dobru DE,Mocan S. Magnifying endoscopy and chromoendoscopy of the upper gastrointestinal tract[J]. J Gastrointest Liver Dis,2009,18(1):109.
- [23] Kato M,Kaise M,Yonezawa J,et al. Trimodal imaging endoscopy may improve diagnostic accuracy of early gastric neoplasia:a feasibility study[J]. Gastrointest Endosc,2009,70(5):899.

(收稿日期:2010-04-12 修回日期:2010-05-24)

· 综 述 ·

## 大肠埃希菌外排泵 AcrAB-TolC 研究相关进展

王 旭 综述,黄永茂 审校

(泸州医学院附属医院感染科,四川泸州 646000)

关键词:大肠埃希菌;耐药;外排泵

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.057

中图分类号:R378.21;R969.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2670-04

细菌的外排系统是一种非特异性耐药机制,是通过细菌外排泵将进入菌体内的药物或其他底物排出膜外,它可以泵出多种对其自身有害的物质,包括喹诺酮类、氯霉素、红霉素、四环素、青霉素、利福平等多种抗菌药物、染料和去污剂等,从而加强细菌在药物选择压力下的生存能力。目前,已在不同细菌上发现几十种外排泵,依据氨基酸序列的同源性,将与抗菌药物

相关的膜外排泵分子分为 5 个主要超家族<sup>[1]</sup>,包括主要易化子超家族(major facilitator superfamily,MFS)、ATP 结合盒(ATP binding cassette,ABC)超家族、耐药节结化细胞分化(resistance nodulation division,RND)超家族、小多重耐药性(small multidrug resistance,SMR)家族、多药和有毒化合物排出(multidrug and toxic compound extrusion,MATE)家族。按

能量来源不同可分为两大类:ABC 型多药外排系统和次级多药外排系统。大多数抗菌药物的外排系统都属于次级外排系统,多数细菌通过质子驱动力来表达对不同结构化合物的耐药。

1980 年 Bah 和 McMurry 在研究大肠埃希菌对四环素的耐药性时发现了主动外排耐药机制,此后人们对细菌特别是大肠埃希菌的外排耐药系统有了进一步的认识。大肠埃希菌是已发现的主动外排泵最多的一种细菌,存在 Bcr、EmrE、EmrAB、EmrD、QacE、AcrAB-TolC、AcrEF、AcrD、YdhV、MdfA 等多种外排泵。RND 中的 AcrAB-TolC 蛋白是大肠埃希菌多药耐药外排系统中目前研究比较清楚的一种细菌外排泵。用基因敲除技术人工去除 AcrAB 或 TolC 基因后,大肠埃希菌对上述药物的敏感性明显增加<sup>[2]</sup>。

## 1 外排泵 AcrAB-TolC 的结构和功能

AcrAB-TolC 系统主要有 3 个部分:膜融合蛋白(AcrA)、外排转运蛋白(AcrB)和外膜通道蛋白(TolC)。AcrA、AcrB、TolC 以三聚体形式存在于大肠埃希菌细胞膜上,其中 AcrA 位于周质间隙中,两端连接着 AcrB 和 TolC;AcrB 和 TolC 分别位于细胞内膜和外膜上。迄今所知,AcrAB-TolC 系统可以提供 2 种途径对药物实现外排,一种是捕获胞质内的药物,直接穿越双层膜将药物排出,比如该系统介导对氯霉素和四环素等膜渗透性药物的耐药;另一种是捕获周质间隙中的药物分子,通过 TolC 将药物转运到外界<sup>[2]</sup>。

**1.1 AcrA 蛋白** AcrA 是一个由 398 个氨基酸残基组成的蛋白质,相对分子质量为 41 kD,属膜融合蛋白(membranefusion protein,MFP)超家族成员,其脂质化的 N 端锚钉在内膜上,C 端伸展到周质<sup>[3]</sup>。在周质中,AcrA 呈高度不对称,蛋白质的 N 端和 C 端不相互接触,而是分别位于两端,从而连接 AcrB 和 TolC 形成复合物<sup>[4]</sup>。AcrA 和 AcrB 位于同一操纵子,两基因之间无终止信号。在大肠埃希菌中除 AcrB 外,AcrA 可以与 AcrD、AcrF 和 YhiV 等多个 RND 家族蛋白作用。AcrA 的 C 端区域 290~357 的氨基酸残基对于它和 AcrB 间作用是必须的,这段区域的局部序列特征对决定 AcrA 与 AcrB 的作用非常重要<sup>[4]</sup>。AcrA 除了作为桥梁连接 AcrB 和 TolC 外,也可以有效激活 AcrB。Lobedanz 等<sup>[4]</sup>发现,取代 AcrA 的 357~397 氨基酸残基的编码序列,仍然能够产生一种功能性蛋白,但不能使外排功能完全丧失,从而证实 AcrA 的 290~357 残基区域在 AcrB 的激活。

**1.2 AcrB 蛋白** AcrB 由 1 048 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 110 kD,属 RND 家族。AcrB 包括 12 个亲脂区和 2 个亲水片段;2 个亲水片段是 AcrB 转运子所特有。射线衍射分析显示,AcrB 以同三聚体形式横跨细胞内膜,在内膜的外侧形成漏斗形结构,开口于细胞周质,能直接摄取细胞周质间隙中的药物,在内膜的内侧形成一个直径为 30Å 的中央腔,开口向细胞质,漏斗形结构和中央腔相连的部分是个狭窄或关闭的孔道<sup>[5]</sup>。在对 AcrB 氨基酸残基的分析中,研究人员发现了与底物结合以及质子转移供能相关的位点。在 T(tight)状态时,AcrB 2 个周质结构域上的 F136、178、610、615、617 和 628;V139、612;I277、626 和位于孔洞结构域的 Y327 构成的疏水区域,一些化学性质不同的物质如罗丹明 6G 和溴化乙锭(ethidium bromide)等可以进入结合洞穴,通过疏水键与中央洞穴结合<sup>[6]</sup>。

**1.3 TolC 蛋白** TolC 由 495 个氨基酸组成的三聚体,上端为开放结构,以便给外排底物提供泵出宽阔通道;下端为封闭结构,其中包括一个 10 nm 的位于细胞周质的一个螺旋孔道和

一个 4 nm 跨越外膜的筒状结构。它是一个由 TolC 基因编码的多功能的 TolC,可以与多种不同的转运蛋白相耦合,在转运过程中几乎不决定转运的特异性和方向<sup>[7]</sup>。TolC 为三聚体,蛋白质一部分以螺旋结构进入周质与 AcrA 连接,当内膜 AcrB 捕获到细胞内的有害物质并与其结合时,TolC 与 AcrAB 复合体连接,打开内在通道,将有害物质排出。基因研究证实,TolC 是 AcrAB 实现其功能不可或缺的部分,TolC 的作用主要是为药物分子通过细菌外膜提供途径(图 1)。

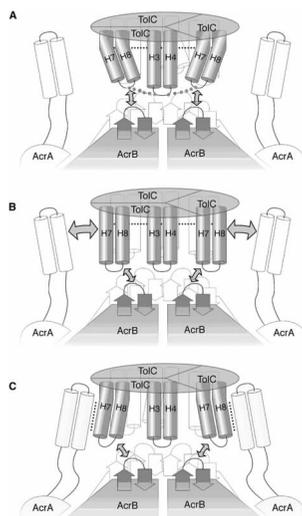


图 A:通道关闭。正常情况下 AcrB 和 TolC 相对,导致 AcrB 的冠状结构和 TolC 螺旋状的突出部分如(H3、H4、H7、H8)相重叠,可移动的 H7、H8 单环柱状结构围绕在中间的一个静态螺旋对 H3、H4。2 个盐桥(图 A 虚线部分)支持关闭状态。在 TolC 通道上面的虚线部分代表第二选择过滤器。双向箭头代表 TolC 的单环柱状结构与 AcrB 之间能够相互作用。图 B:桥梁开放。捕获药物分子后,AcrB 的冠状结构和 TolC 的柱状结构相互作用后打破了分子内的盐桥,释放出 H7、H8 的单环柱状结构,打开了 TolC 通道外部周质入口的部分膜结构并且使能与 AcrA 衔接的凹槽表面加深(双相箭头所表示)。然而这次 AcrB 的相互作用没有影响到第二选择过滤器。图 C: AcrA 束缚到 TolC 凹槽表面,使第二个选择过滤器破坏,并且把 TolC 通道开放到最大程度。现在这个泵已经装备完全并开始积极的运输药物。

图 1 大肠埃希菌外排泵 AcrAB-TolC 结构和功能示意图

## 2 AcrAB-TolC 的基因调控

AcrAB 的表达受多种调控因子的调节,包括局部和全局两个层次调控。局部调控常常是在紧邻其基因的位置上表达出转录抑制或激活蛋白,以调控该泵蛋白的表达。大肠埃希菌多药外排泵 AcrAB-TolC 系统中,AcrA 和 AcrB 蛋白的基因位于同一个操纵子上,AcrA 上游存在着一个调控基因,AcrA 属于局部调控基因<sup>[8-10]</sup>。全局性的调控则往往是由细胞内一些整体性调控因子参加的与细胞整体代谢变化相关联的调控机制。

**2.1 局部调控因子** 局部调控因子 AcrR 位于转运子基因上游,其编码产物为 N 末端含有超螺旋结构阻遏调控蛋白。AcrR 为负调控蛋白,AcrR 作用可以阻遏 AcrAB 的外排作用,其基因突变可以使 AcrAB 表达增强,同时 AcrR 也可以抑制自身的启动子而调控自己的表达,从而使耐药性增强<sup>[11]</sup>。Webber 等<sup>[10]</sup>对于不同来源的抗氟喹诺(nuoroquinolone)大肠埃希菌突变型进行分析发现,它们的 AcrB 过量表达并且 AcrR 第 45 位氨基酸有突变,利用野生型 AcrR 对此种突变型进行互补实验发现,互补会导致菌株对环丙沙星(ciprofloxacin)和溴化乙锭敏感性增加。在人工突变研究中,Ma 将大肠埃希菌 Ac-

rR 插入失活后, AcrAB 的转录水平随之提高; 将 AcrR 连接到 pACYC177 上让其过量表达, 会抑制 AcrAB 的转录。

**2.2 整体调控因子** 整体调控因子负责诱导这个外排泵系统, 增加 AcrAB 和 TolC 的转录, 属于正调控。目前发现, 参与正调控的因子有 MarA、Rob、SoxS 和 Fis 等<sup>[12]</sup>。

**2.2.1 全局性调控蛋白(MarA)** MarA 是多重抗菌药物耐药性(multiple antibiotic resistance, Mar)操纵子的转录激活蛋白, 由 125 个氨基酸组成的正调控因子。它可结合到 AcrAB 启动子附近, 增强 RNA 聚合酶与该启动子的亲合力, 促进 AcrAB 的转录, 它也能以同样的方式提高 TolC 的表达。MarA 亦可提高自身的转录水平, MarA 作为一个单体可与 MarRAB 启动子上方 MarO 连结, 激活 MarRAB 的转录, 提高 MarA 在细胞内的表达量, 随后与 MarA 调节基因启动子邻近的 AcrAB 和 TolC 结合, 促进其转录<sup>[13]</sup>。

**2.2.2 其他正调控蛋白(SoxS)** SoxS 是整体超氧化反应(superoxide response, SOX)调控元 SoxRS 的效应蛋白, 是由 107 个氨基酸组成的小分子蛋白质。蛋白组学和遗传学常规分析结果显示 SoxS 可激活 17 个基因或操纵子的表达, 过氧化物( $O_2^-$ )可以使 SoxR 效应蛋白转变成它的活化形式(SoxR $*$ ), 活化的 SoxR 进而会促进 SoxS 的产生<sup>[13]</sup>; Rob 是由 289 个氨基酸组成的能结合低分子量效应基因单独区域的较大蛋白质, 大肠埃希菌中 Rob 的无意义突变可增加其对有机溶剂的敏感性, 过量表达则增加其耐受性<sup>[14]</sup>。辅助激活蛋白 Fis 参与重组和 DNA 修复过程, 稳定某些启动子的局部 DNA 结构, 对应不同的生长条件而改变其转录活性, 它也可以促进 AcrAB 转录。

### 3 大肠埃希菌外排泵抑制剂的探索

随着抗菌药物的大量使用, 大肠埃希菌在选择性压力下不断发展其耐药机制, 造成日益严重的耐药问题。探索解决其耐药方法已经刻不容缓, 根据对大肠埃希菌外排系统的了解和研究, 可以从以下 2 个方面着手。

**3.1 干扰外排泵组装的抑制剂** Globomycin 是一种链霉菌来源的环肽结构的抗菌药物, 它是脂蛋白信号肽酶 LspA 的抑制剂, 通过抑制 LspA 从而抑制含有 LspA 剪接位点的膜融合脂蛋白前体的加工。大肠埃希菌和产气肠杆菌组成表达 RND 型外排泵 AcrAB-TolC 的组件 AcrA 前体且含有 LspA 的剪接位点, 在 Globomycin 的作用下不能形成成熟的 AcrA, 也不能和外排泵的其他组分结合形成外排泵, 抑制了外排泵的作用。文献报道 75  $\mu\text{mol/L}$  Globomycin 能够使表达 AcrAB-TolC 的产气肠杆菌的氯霉素最低抑菌浓度(MIC)降低至原值的 1/4, 其外排泵抑制能力与羰基氰间氯苯胺(carbonyl cyanidm-chlorophenylhydrazone, CCCP)(100  $\mu\text{mol/L}$ )相同, 低于 PA $\beta$ N(100  $\mu\text{mol/L}$ , MIC 降低至原值的 1/8)。

**3.2 阻断外排泵能量来源的抑制剂** 大肠埃希菌的外排泵主要由质子动力势驱动。对细菌多重耐药外排泵抑制剂的研究发现, 以阻断外排泵能量来源为机制的外排泵抑制剂主要针对质子动力势<sup>[15]</sup>。例如 CCCP 其分子在解离状态下, 导致转运蛋白失去能量供应, 破坏外排系统的主动外排作用, 使药物在细菌体内的累积量增加, 恢复细菌对药物的敏感性, 因此, 它是很强的解耦联剂。CCCP 作为外排泵抑制剂对大肠埃希菌 AcrAB 和 AcrEF、产气肠杆菌 AcrAB-TolC、空肠弯曲杆菌 CmeABC 等均有抑制作用。例如, 100  $\mu\text{mol/L}$  的 CCCP 可以使表达 AcrAB-TolC 的产气肠杆菌的氯霉素 MIC 降低至原值的 1/4<sup>[16]</sup>。

### 4 展 望

目前, 对大肠埃希菌的外排泵的结构、调控方式及如何抑制它的外排泵有了一定的认识和了解, 但是研究仅限于体外实验, 并且这些抑制剂大多对人体有不良反应。许多在体外活性良好的外排泵抑制剂由于安全性、特异性、机制明确性等诸多问题未能用于临床治疗。外排泵抑制剂不仅可以提高具有外排泵介导耐药性的病原细菌的药物敏感性, 恢复抗菌药物的抗菌活性, 还有利于减少由外排作用促进的耐药突变株的产生。除了对外排泵抑制剂的研究还需要临床工作者注意合理使用抗菌药物。(1)根据体外检测药敏结果使用抗菌药物, 对患者实行个体化用药;(2)抗菌药物的剂量要适当, 注意由于剂量不足而造成耐药性的产生, 疗程应尽量短;(3)根据细菌耐药和发展趋势, 有计划地将抗菌药物分批分期交替使用可能是一项重要措施;(4)在医院内严格执行消毒隔离制度, 以防耐药菌的交叉感染<sup>[17]</sup>。因此, 寻找有应用前景的外排泵抑制剂并合理使用抗菌药物对于细菌性感染的治疗有着深远的意义。

### 参考文献:

- [1] Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(1): 20.
- [2] Touze T, Eswaran J, Bokma E, et al. Interactions underlying assembly of the escherichia coli AcrAB-TolC multidrug efflux system[J]. J Mol Microbiol, 2004, 53(2): 697.
- [3] Mikolosko J, Bobyk K, Zgurskaya HI, et al. Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA[J]. Structure, 2006, 14(3): 577.
- [4] Lobedanz S, Bokma E, Symmons MF, et al. A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 4612.
- [5] Deniaud A, Goulielmakis A, Covès J, et al. Differences between CusA and AcrB crystallisation highlighted by protein flexibility[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6214.
- [6] Seeger MA, Schiefner A, Eicher T, et al. Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism[J]. Science, 2006, 313: 1295.
- [7] Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters[J]. Nature, 2007, 446: 749.
- [8] Ramos JL, Martnez, Bueno M, Molina-Herases AJ, et al. The TetR family of transcriptional repressors[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(2): 326.
- [9] Li M, Gu R, Su CC, et al. Crystal structure of the transcriptional regulator AcrR from Escherichia coli[J]. J Mol Biol, 2007, 373: 591.
- [10] Webber MA, Talukder A, Piddock LJV. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to AcrB expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary Escherichia coli isolates [J]. Antimicrob Agents Chem, 2005, 49(10): 4390.
- [11] Herve N, Vincent P, Stuart B, Levy, increased genome instability in escherichia coli ion mutants; relation to emergence of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants caused by insertion sequence elements and large tandem [J]. Antimicrob Agents Chem, 2007, 51(4): 1293.
- [12] Eiji Nikaido, Akihito Y, Kunihiko N. AcrAB multidrug efflux pump regulation in salmonella enterica serovar ty-

- phimurium by RamA in response to environmental signals[J]. *J Bio Chem*, 2008, 283(35): 24245.
- [13] David K, Alexey R. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*[J]. *J Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61: 46.
- [14] Taketo K, Kameino L, Fujisawa I. High hydrostatic pressure treatment impairs AcrAB-TolC pump resulting in differential loss of deoxycholate Tolerance in *Escherichia coli*[J]. *J Bio Bioeng*, 2005, 100: 6.
- [15] Paixão L, Rodrigues L, Couto I, et al. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*[J]. *J Biol Eng*, 2009, 3: 18.
- [16] Mallea M, Chevalier J, Eyraud A, et al. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293(5): 1370.
- [17] 周安宇. 746 例痰标本中的病原菌分布及耐药性分析[J]. *重庆医学*, 2008, 37(11): 1327.

(收稿日期: 2010-04-10 修回日期: 2010-05-28)

• 综 述 •

## 抗菌肽抗结核作用的研究进展

岳俊伊 综述, 张 健 审校

(重庆医科大学附属第一医院骨科 400016)

**关键词:** 抗菌肽; 防御素; 结核; 耐药

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2010. 19. 058

**中图分类号:** R52. 05

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2010)19-2673-03

抗菌肽(antibacterial peptide)是生物体产生的一种阳离子多肽,广泛存在于从原虫到人类的各种生物体内<sup>[1]</sup>,对革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌甚至某些真菌、原生动物都有杀灭作用,其对结核杆菌亦是有效的,且没有传统抗结核药的耐药性、严重不良反应等一系列弊端,有可能成为结核治疗的一个新途径。

作为一种生物抗菌药物,抗菌肽具有一系列优势:存在广泛、抗菌谱广、杀菌快速、无蓄积中毒作用、作用专一的特点,并且由于它与传统抗菌药物有不同的作用机制,从而使其成为对付耐药菌的一个重要候选对象。

研究证明内源性抗微生物多肽(PG-1)、人 $\alpha$ 、 $\beta$ -防御素-1和PR-39等抗菌肽对结核杆菌是有效的<sup>[2-4]</sup>,并且没有结核化疗药物的肝功能损害、胃肠道症状、过敏反应<sup>[5]</sup>等一系列不良反应,这激发了我们用抗菌肽对抗结核的兴趣。本文综述抗菌肽对结核分支杆菌的作用的进展情况。

### 1 直接对结核菌的作用

Miyakawa等<sup>[6]</sup>报道在体外人、兔防御素和猪内源性抗微生物多肽对H37Rv结核分支杆菌菌株有效。同时对3个临床分离的结核菌株进行作用,发现结核菌的减少亦达到86.3%~99%。扫描电子显微镜发现防御素在结核分支杆菌表面有作用位点,通过此位点可导致H37Rv菌株表面损伤,证实抗菌肽是机体对结核防御机制的重要组成部分,提示结核治疗的一个新的途径。

Rivas等<sup>[7]</sup>用免疫染色显示人肺泡上皮细胞系——A549细胞系在感染结核杆菌后细胞内抗菌肽——人 $\beta$ 防御素-2(HBD-2)的存在且在结核菌集落附近染色更强烈,不仅证明A549细胞系内可产生HBD-2,而且提示HBD-2与胞内结核菌有相互作用。说明肺泡上皮细胞也可以通过产生HBD-2来对胞内结核发挥作用。低倍镜下HBD-2免疫染色提示HBD-2产物被胞内结核菌诱导。免疫电镜显示HBD-2标记到结核杆菌的胞浆和胞壁。且直接接触A549的胞外结核菌也显示HBD-2标记,提示不仅胞内结核菌,胞外结核菌也可以成为HBD-2的目标。并且HBD-2标记胞内断裂的结核菌可推测HBD-2参与杀死胞内结核菌。另外,HBD-2也有趋化因子样

作用,表现为对未成熟树突状细胞和记忆淋巴细胞的趋化作用,这可能激发获得性免疫,从而加强抗结核作用。

在人体内结核菌的真正宿主是巨噬细胞,但是巨噬细胞内缺少足够量的抗菌介质。尤其是在人巨噬细胞内不表达防御素<sup>[8]</sup>。Rivas等<sup>[7]</sup>证实通过逆转录PCR的方法发现结核分支杆菌H37Rv感染血单核细胞均不表达HBD-2基因。说明在生理条件下单核、巨噬细胞基本不表达HBD-2基因。而通过免疫细胞化学和电子显微镜亦未在单核、巨噬细胞内探测到HBD-2胞内产物。故让巨噬细胞表达抗菌肽成为一条抗结核的新途径并且已有很多成果。Kisich等<sup>[9]</sup>证明HBD-2转染血单核细胞控制结核生长的效果比天然单核细胞好。故在治疗结核方面抗菌肽转染单核巨噬细胞可能是一个很有希望的途径。

### 2 抗菌肽对结核杆菌的作用靶点

Sharma等<sup>[10]</sup>证明结核杆菌细胞壁、细胞膜是HNP-1(human neutrophil peptide)的主要作用靶点。因为生长在HNP-1环境中的结核菌显示出表面改变,电镜分析显示出明显的细胞壁、细胞膜改变。该学者还报道证明HNP-1浓度依赖性的对M. tuberculosis H37Rv生长的抑制。用HNP-1处理胞外生长的和被吞噬的结核杆菌都广泛地抑制大分子生物合成,尤其是DNA和类脂。这提示抗菌肽的作用靶点除结核菌细胞膜外还可能包括DNA在内的胞内成分<sup>[11]</sup>。

用放射性标记的HNP-1作用于结核杆菌后最大的放射活性在胞膜(43.5%),其次在胞壁(21.34%),但是仍有12%在胞浆内。这些结果进一步证明细胞膜、细胞质是防御素主要作用靶点,DNA可能是第2位的胞内作用靶点<sup>[11]</sup>。

### 3 抗菌肽与抗结核药物的协同作用

多个实验证实,PG-1在体外抑制结核并且显示异烟肼的活性可以被PG-1和HBD-1激活<sup>[12]</sup>。表达于猪的中性粒细胞的protegrins(PG)杀菌的机制不完全清楚,但其破坏细胞膜的能力被认为是至关重要的。PG-1在细胞膜上形成阳离子选择通道,异烟肼是亲水小分子,可以通过被动扩散进入结核菌。因此,二者联合的作用可能是PG-1使细胞膜的变化促进异烟肼(INH)进入细胞。该研究显示尽管抗菌肽自身在生理浓度