

细菌对抗菌素的抗药性问题

由于抗菌素的广泛应用，细菌对抗菌素的抗药性日渐增加，已成为流行病学上及临床治疗上的重要问题。从一些事实可看到其严重性。

葡萄球菌对青霉素的敏感性差异很大，其最低抑菌浓度（MIC）可由0.002至250微克/毫升，上下相差达12万倍。1946年以前，在0.04微克/毫升或以下浓度能受抑制的菌株达82%，有抗药性的对5微克/毫升敏感菌株仅8%。1948、49年间对上述浓度敏感者仅21%。近年来抗药菌株一般达到70—80%，而耐受青霉素的浓度达200毫克/毫升。我国大城市大医院中往往可在80%以上。红霉素出现初期，1951—52年间500株葡萄球菌均对之敏感（0.4微克/毫升），但一个单位採用红霉素为主要药物后5个月，在住院病人分离的为70%菌株已对100微克/毫升抗药。同一医疗单位最初氯霉素抗药性发生率仅约10~20%；但连续应用6个月后，即升为55%，改用金霉素，6个月后，又发现金霉素抗药性达83%。而且发现一个单位内连续应用某药时，抗药性与时增减，停用后又可下降，因而可以改选有计划的交替。

发现R因子以来，大肠杆菌抗药性率也较高。1960年以来，医院检验室分离到的菌株约20~50%对一至多种药物有抗药性。1971年报告英国的大肠杆菌K12的81株中有抗药性转移因子者53（65%）株，其中多数都是对四环素类或兼对其他有抗药性的。

在日本，志贺痢疾杆菌流行始终未得控制，而其中抗药性也急剧增加。在1965~1969年间分离10462株，92%

的菌株对于四环素、氯霉素、链霉素及磺胺类四药中之一或几种有抗药性，其中四元抗药性佔75.5%，三元者3.6%，二元者2.5%及一元者18.4%。但目前所见对氨基苄青霉素、卡那霉素及萘啶酸的抗药率则较低。

表1 1969年日本菌株对几种抗菌素抗药性

抗药株 %	磺胺(Su)	链霉素(S)	四环素(T)	氯霉素(C)
奇异变形杆菌	28.4	26.3	16.8	18.9
大肠杆菌	68.6	52.2	52.5	43.3
肺炎杆菌属	84.5	79.4	71.1	68
绿脓杆菌	93.3	78.0	60.2	80.5

当然，也有些细菌对于抗菌素的敏感性始终无大改变。从1949年分离的菌株对7种抗菌素测定敏感性，以后几年直至1970年对23种抗菌素测定敏感性，其最低抑菌浓度始终变动于2—8倍的狭窄范围。例如万古霉素，临床上抗药性的发生率就很低。

由于细菌抗药性在临床治疗及流行病学上的重要意义，引起对于抗药性发生原理的深入研究，要求阐明其本质，制订合理的克服措施。过去曾将抗药性产生原理归结于“适应”与“选择”或“适应”与“基因突变”；这都未能完全阐明其本质。因为抗药性能传给下一代，或传给其他菌株，实际上必然涉及到控制遗传信息的DNA。基因突变固然与DNA结构的变化有直接关系；所谓“适应”常常反映为某些抗菌素灭活酶产生的缘故，或细胞通透性改变等，这些性质也受到DNA的控制，例如在抗菌素存在下，为灭活酶编码的基因解除抑制，然后可大量合成灭活酶酶为蛋白质。至于“选择”问题，则无论何种因素引起细菌都存在着敏感菌与抗药菌，而抗药菌生存的现象，形成抗药株比例

存，抗药株比率不断升高的情况。如基因突变后产生的抗药株，也必须在用药过程中，经逐渐选择，才可能发生有临床意义的抗药性现象。目前认为，抗药性主要由细菌染色体基因 DNA 及染色体外 DNA 来控制，这才可从抗药性的本质去理解。这两类 DNA 可能通过转化、转导或配子而将抗药性做水平或垂直传播，至于垂直传播则传给下一代，则更不言而喻了。

本文先介绍有关基础知识，然后讨论染色体 DNA 及染色体外 DNA 与抗药性关系，抗药性的传播方式，最后介绍抗药性的生化基础与耐药菌株的遗传。

周树勋 凌家驹 编

一、有关基因整合及基因功能的基础知识

(一) 蛋白质(酶)合成的基因调节

现在认为细胞生长、繁殖、分裂的各个过程，均受到染色体上一系列的基因所控制。这些基因在适当时候，或接到某些信号时，可指示其编码基因的 DNA 将密码转录给 mRNA，(或指导合成一定的蛋白质执行某种功能。例如：在 DNA 合成(复制)期之前，先合成 DNA 的聚合酶，以便催化 DNA 的复制。指导合成这种酶的密码始终存在于其基因的 DNA 中，即属于结构基因 (Structural genes)，它通过 mRNA 来决定蛋白质多肽链的氨基酸组成。但何时进行酶的合成，则由一组调节基因 (Regulatory genes) 所控制。抗药性可能与某种酶的合成有关，因此必先要了解基因与酶蛋白合成的关系。

关于基因调节的研究，先在微生物的酶合成上进行，Jacob & Monod (1961) 提出了大肠杆菌乳糖控制子的模型；从此发展起来的理论，现已用于解释无数的基因调节，并发展出负控制与正控制的理论，相仿动物细胞的繁殖，发展也大体上符合这种情况，现将细菌为酶合成的基因控制方式举例以供参考。

1. 乳糖操纵子与负控制

细菌对环境有很强的适应能力，能利用很复杂的有机物作为碳源。当周围环境中存在某种物质（如乳糖或葡萄糖）可供利用时，细菌便可大量合成利用这些物质所需的酶，这称为酶合成的诱导（Induction）过程。例如：对于乳糖产生诱导性的天竺酶也可能与此有关。例如：在乳糖存在下，大肠杆菌分解乳糖的酶达到细胞总蛋白量的2-3%，甚至7%。若无乳糖存在，则酶的合成停止。一般来说，分解食物所需的酶化酶，受诱导剂的诱导而合成；合成细胞成分所需的酶脂酶，受其底物的抑制，即负反馈作用。

乳糖操纵子的模式图！

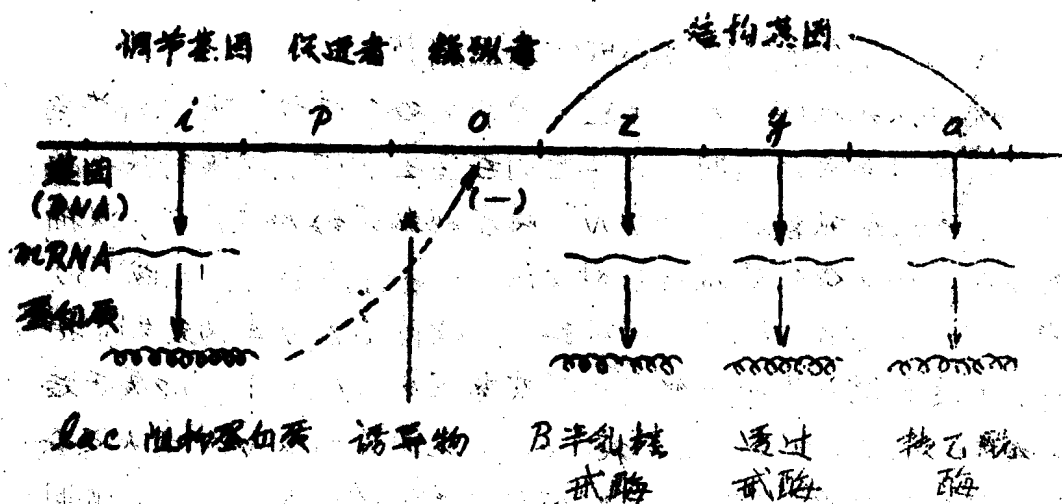


图1. 乳糖操纵子模式图

结构基因 *z*、*y*、*a* 分别为 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase), 透过性酶 (β -galactoside permease), 和 β -半乳糖转乙酰酶 (β -galactoside-trans-acetylase) 编码。但在乳糖 (或类似物如IPTG) 不存在时, 这些结构基因不表达。

表明出来，因它受处于 i 基因的负控制之下。 i 基因给 lac 阻抑蛋白质 (repressor) 编码；阻抑蛋白质又与操纵者 (operator) O 结合，从而阻断基因的表现。如有乳糖 (诱导物) 的存在下，诱导物与阻抑物分子作用，把它从操纵者上取下来，于是结构基因开始活动，酶就高速进行合成。

上述理论可从几种大肠杆菌突变体的诱导特性上表明见表 2：株 1 是具有 i^- 、 Z^+ 、 Y^+ 三种基因的，它的受控制很明显。加入诱导物时，解除抑制，酶合成速度可增加近 1000 倍。株 3 有结构基因，但无调节基因 i ，故不论有无诱导，均不断合成酶。株 4 是杂交成的双倍体，一株 i^- 一株 i^+ ，它仍可诱导，可以调节酶的合成，说明 i 基因是显性。即株 i 是在另一条染色体上时仍为显性。另一方面，正常操纵者 O^+ 可以接受阻抑分子，但突变成为 O^c 后，与阻抑分子的亲和力降低。 Z 基因不受阻抑，不论有无诱导物均可合成酶。相反地，突变株 O^c ，虽有结构基因，却长期处于封闭状态，不会合成酶。

表 2 基因类型与酶诱导的关系

菌株号	基因类型	半乳糖或酶		半乳糖或乙酰酶		含 义
		无诱导	诱导	无诱导	诱导	
1	$i^+Z^+Y^+$	0.1	100	1	100	i^+ 可控制酶的诱导
3	$i^-Z^+Y^+$	140	130	130	120	无调节基因只有结构基因，则经常合成酶
4	$i^+Z^-Y^+ / i^-Z^+Y^+$	1	240	1	270	i^+ 为显性，两株杂交，则酶的合成有诱导

现已分离出 lac 阻抑分子，是一个四聚体的蛋白质，分子量 15 万，能与 lac DNA 特异性结合。加入诱导物 IPTG 时，能使阻抑物释出，绝化的阻抑分子可抑制相应的 mRNA 合成，

故认为其作用在转录水平。

决定生物合成途径上各个有关的酶的基因常群集在一起，组成一个共同的调节单位，如上述三个酶是统一调节的。组氨酸生物合成的基因有10个，组成一个大的操纵子受一个操纵者的控制。决定合成色氨酸所需酶的一群互相连锁的基因组成一个色氨酸操纵子；在调节基因(*TryR*)控制之下，表现负控制作用，这操纵子受其最终产物色氨酸所阻抑。在绿脓杆菌属的*PS*、*Pntida*中，控制色氨酸生物合成的三个酶的基因也是紧密连锁的。但在绿脓杆菌属的其他细菌，同一合成途径的基因则分散在染色体的不同部分。

在大肠杆菌中，乳糖操纵子与嘌呤操纵子(*pur* oper-
ator)非常靠近。在一些突变株中，其调节部分(*i*、*P*、*O*)
缺失，可与嘌呤操纵子融合，置于嘌呤操纵子的控制之下，
受IPTG所诱导，却受嘌呤合成最终产物腺嘌呤所阻抑。

3

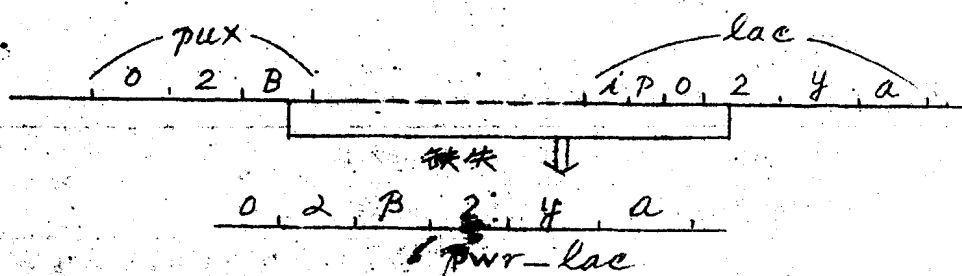


图2 乳糖操纵子与嘌呤操纵子融合模式图

2. 阿拉伯糖操纵子与正控制

大肠杆菌阿拉伯糖操纵子的结构基因及调节基因与乳糖的有相似之处。三个连锁的三个基因分别为激酶(*Kinase*)、同分异构酶(*Isomerase*)及差向异构酶(*Epimerase*)编码。调节基因*C*也能编码产生蛋白质，它与操纵者位点*O*结合，可阻抑转录，起着负控制作用。但不同之处是在阿拉伯

粉(诱导物)存在下, P_1 与诱导物结合可转变为激活分子 P_2 。
 P_2 与启动位点 I 结合, 则可激动酶的合成, 进行正控制, 见图 3-4。

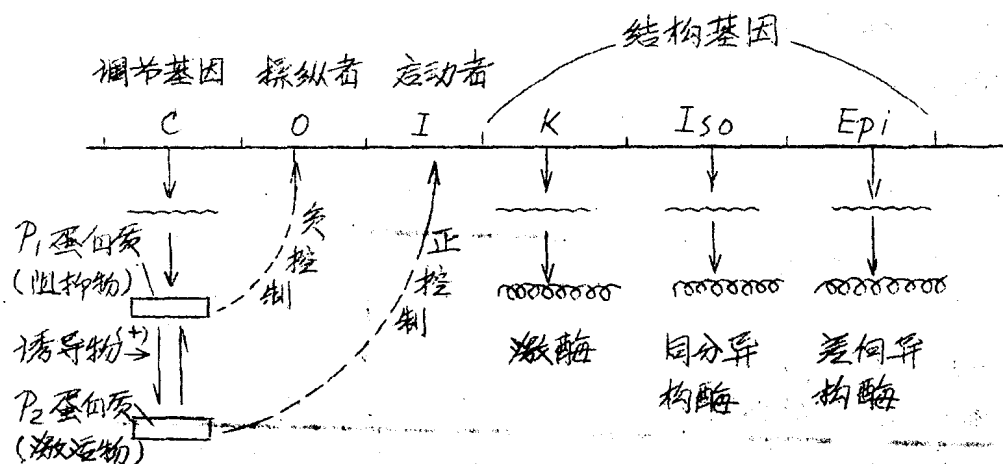


图 3 阿拉伯糖操纵子模式图

3. 环状腺武酸与正控制

在大肠杆菌培养基中加入诱导物 IPTG, 可促使分解乳糖的酶高速合成。但加入乳糖的一种分解产物——葡萄糖, 则可发生抑制, 称为分解代谢物的阻抑(负反馈), 此时加入环状腺武酸(CAMP), 可以解除葡萄糖对酶合成的阻抑。后来又发现细菌对 CAMP 有一种受体蛋白质(CRP)。在 CRP^+ 的细菌, CAMP 有促进作用; 对于 CRP^- 的受体, 则 CAMP 无效。现认为 CAMP 与 CRP 结合后, 可促使 RNA 聚合酶与促进者位点(P)更易于结合, 从而促进转录过程的启动。

阿拉伯糖操纵子也有类似的阻抑及 CAMP 解除阻抑的现象。

由上看来, 一个诱导酶合成过程可有负控制与正控制二方面:

1. 负控制: 由调节基因编码产生阻抑物, 抑制操纵者位

具(0)。有诱导物存在时，可将阻抑物从O移走，从而启动转录过程，合成所需酶。

2. 正控制：CRP 基因编码产生CRP蛋白质，它与CAMP结合，协助RNA聚合酶与P位结合，启动转录过程，合成酶蛋白。

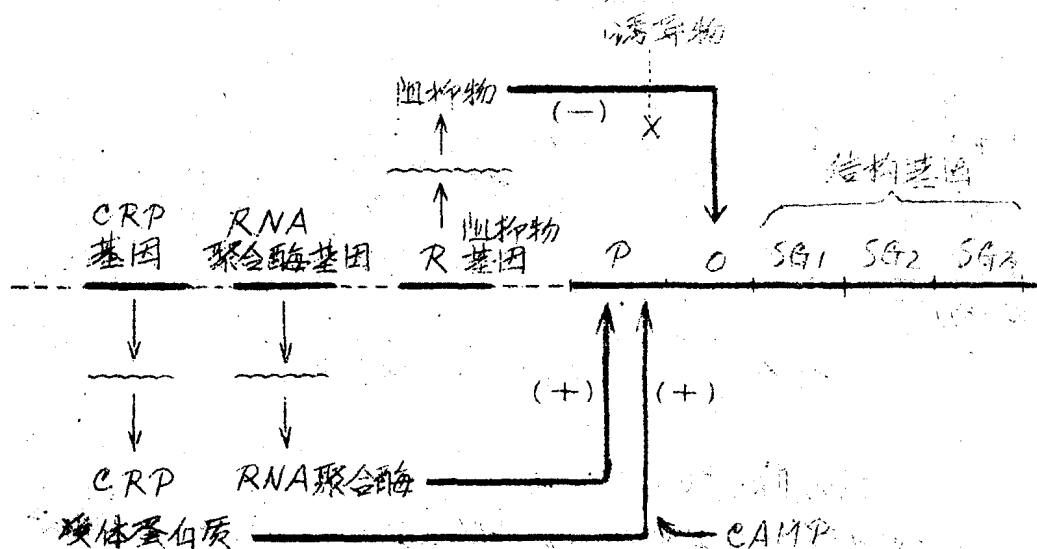


图4 正控制及负控制与CAMP关系模式图

(二) 外来遗传信息与染色体基因的整合

外源性遗传信息参加到细胞染色体基因的DNA上，引起后代细胞性质改变的过程。对于理解细菌对药物产生抗药性以及病毒致癌机理等有很重要意义，同时也说明了遗传基因并非永恒不可变的，在一定的条件下，它可受到外因的影响，通过内因的改变而起作用。

已经了解到，病毒(或细菌中的噬菌体)在细胞内生活时，能在宿主染色体内合成自己的染色体，以后形成原病毒(Virion)，细胞破坏后，又成为病毒释放出来。噬菌体(Bacteriophage)是细菌的病毒，特别浸所潮湿和性(或溶原性)

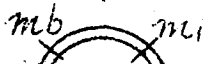
噬菌体，当感染细菌后，其遗传物质能以特殊的“前噬菌体”形式结合于菌体细胞的染色体上，共同生存，共同复制，并传递给以后几代为子细胞，直至遇到“诱导”的过程时，才产生大量的成熟噬菌体，将细菌裂解，释放出来。近来，关于外源基因与宿主基因整合（Integration）过程，在噬菌体方面研究得较深入。

根据在温和性噬菌体的研究上得出的一种遗传重组的模型，称为坎贝尔（Campbell）机理现已有较确实的证据。例如入噬菌体整合进入大肠杆菌染色体的过程如图5所示。入噬菌体的染色体先闭合成环（环化），~~然后同宿主菌染色体~~联结，图中粗线处表示二种染色体中核苷酸排列一致的区段，在此可以进行交换，结果噬菌体的染色体即整合入细菌染色体中，以后并可随大肠杆菌染色体进行合成。这种过程也称为基因的拾取（Pickup）过程。

这种机理认为遗传基因併合前呈环状排列，其次彼此相邻的标志基因要拉开，这种假设已证明，同时，在细菌接合时，细胞之间遗传物质的整合也按同样的机理进行。给体（雄性）菌株DNA的片段通过这种过程传递给受体细胞，併入比该片段大小平均为染色体的 $1/15$ 或 200×10^6 道尔顿（Dalton）是分子量的计量单位，~~相当于核的分子量的 $1/12$~~ 。至于遗传物质的剔除则是按上述机理的相反方向进行。在剔除过程中，可能呈现不等价交换，或把靠近整合的基因为一块其余遗传物质剥落下来的现象见图6。通过遗传物质片段的参入与脱落，可引起很大的变异可能性。抗药性通过噬菌体“转导”就是DNA的整合与脱落而形成的。



环化的噬菌体



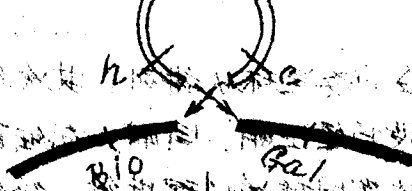
大肠杆菌染色体

Gal-控制点

Bio-控制点



两个染色体相互作用



噬菌体整合

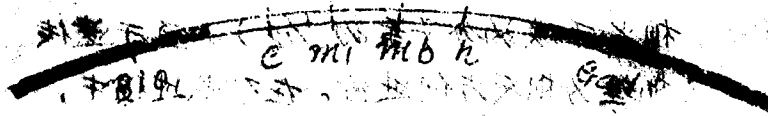


图5 噬菌体整合进染色体中的示意图
(Campbell 机理)

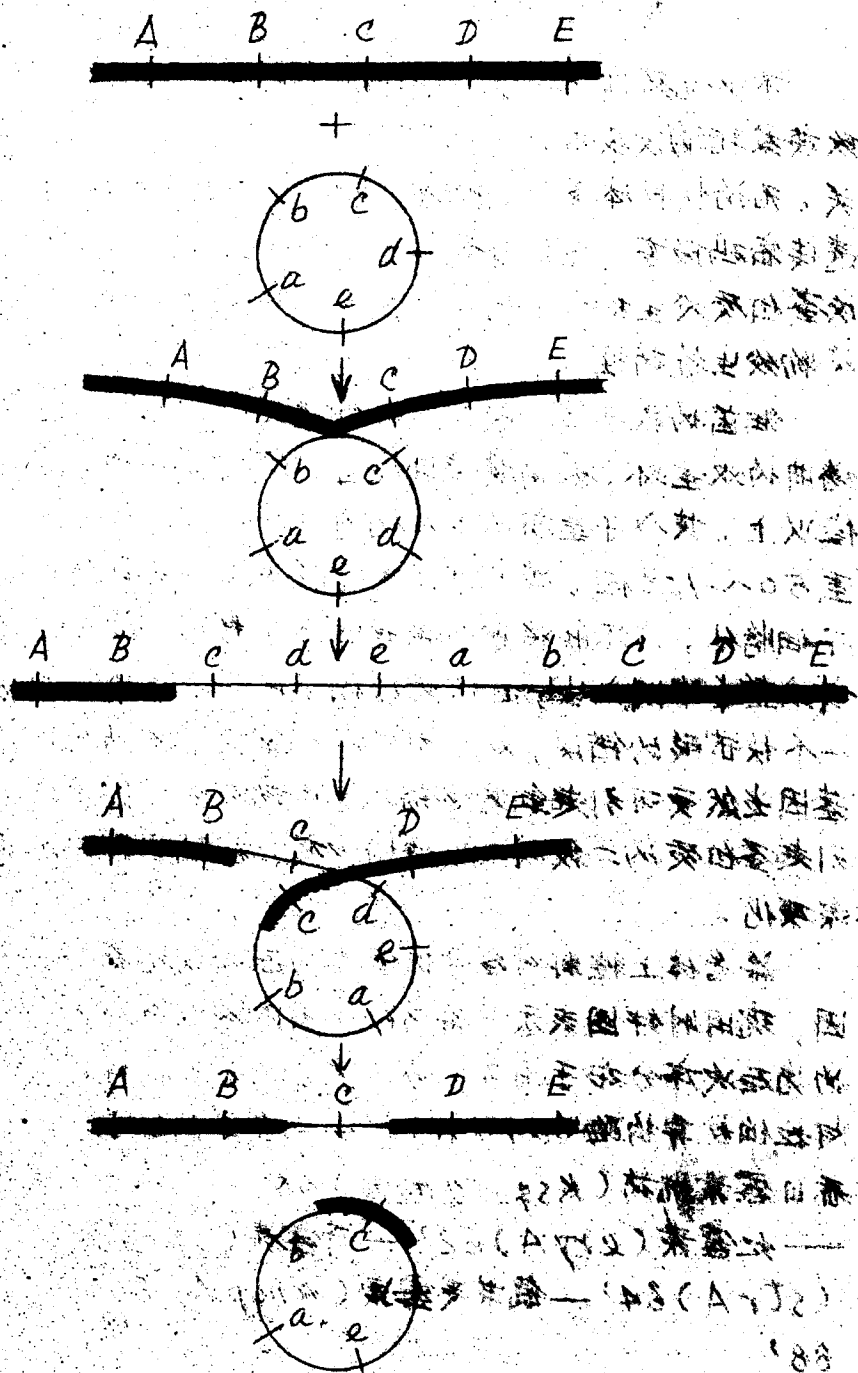


图6 基因交换示意图

二、染色体基因与抗药性关系

不少抗药性的产生是由细菌染色体上的药物靶位(靶点)改变或靶酶改变所致。这一类的改变与染色体基因变异有关。无论核糖体蛋白或酶蛋白都是由基因编码合成的,基因的遗传密码改变,必然可影响蛋白质的氨基酸组成或顺序,从而使蛋白质发生构象变化,失去了与药物结合的亲和力,从而对药物发生抗药性。

细菌的染色体一般在每个细胞内有一个分子的DNA,呈链状的环状,如将其卷曲拉直,则长度约为菌体长度的一千倍以上。其分子量高达25亿道尔顿,约比下述的胞质体DNA重50~100倍。染色体是不能脱失的,除可复制后分给两个子细胞外,亦不能将整个染色体分子转移,故其抗药性是由突变或重组产生,可传给后代。所谓点突变是DNA上偶然一个核苷酸的错误,从而引起一个氨基酸密码的错误。抗药性基因当然更可引起氨基酸错码,这就可使蛋白质的肽链变形,引起蛋白质的二级或三级结构改变,在药物作用的靶位上构象变化。

染色体上控制对各种抗菌素的敏感或抗药性的各个遗传基因,现用时钟图表示,将360°圆周图划分为90分,各基因的先后次序分布于此90分之中。例如大肠杆菌的遗传图谱是:阿拉伯糖利用酶(*araA*)1'——氨基糖苷敏感性(*azi*)2'——青霉素抗药(*Ksg Tan B*)30'——林可霉素(*LincA*)62'——红霉素(*EryA*)62'——奇霉素(*speA*)63'——链霉素(*StrA*)64'——氨基糖苷类(*ampA*)80'——纤毛的有无88'

染色体基因控制的抗药性的发生与下列情况有关:

1. 天然抗药株的存在: 天然菌群中可有极少数菌株原

来对某种抗菌素有抗药性。有人认为这些菌株是长期接土壤中微生物所产生的抗菌物质而选择出来的。

2. 突变与诱变：在细菌繁殖过程中，DNA 为复制可偶而发生缺失或错误，产生某种突变株。这种机会很罕见，如大肠杆菌经一个细胞周期发生突变的机会是一百亿分之一 (10^{-10})。接触诱变剂包括放射线、紫外线及药物等，突变机会就大为提高。突变常用以解释对单一抗菌素产生抗药性的突变 (Point Mutation)。

3. 嗜菌体的转导：详见下文，即由嗜菌体携带一段抗药性基因附加体，通过整合作用，插入受体菌的染色体 DNA 中，使敏感菌变成抗药菌。这种往往携带多重抗药性。

4. 接触抗菌素：以图 1-1 所述各点都为细菌产生抗药性创造基本条件，但接触抗菌素是选择因素，细菌通过接触抗菌素进行选择，使抗药菌株达到一定数量时才能分离。其中又分为两类：

(1) 麦德素型：要求以较小剂量，逐步增加剂量进行选择抗药株，如上次菌大剂量时结未受杀而未杀菌株产生抗药株，这时人将之称为“驯服”。

(2) 链霉素型：细菌中可能存在一些高耐菌株，故上次大剂量时，虽也杀去相当大部分菌株，却可能选育出些高抗药株，所以其抗药性呈“一步登天”式的。

三、染色体外(胞质体)基因的作用

在 1959~1960 年开格发现到某些对氨基甙类抗菌素等有抗药性的革兰阴性杆菌携带有一种抗药因子。将抗药菌株和敏感株混合培养数小时，敏感株亦可获得抗药性，故称此种因子为“传染性抗菌素抗药因子”，或“R 因子”。已证明 R 因子是由遗传物质 DNA 所组成。从奇异变形杆菌 R^+ 株提

取DNA，再用密度梯度离心法进行超速离心分离，就可发现除了为染色体所特有的DNA主带外，尚有一较小而密度较高的质带。当去除R因子，则从质带消失。所以从质带是染色体以外的R因子DNA，即称为质体(plasmid)DNA。质体R因子分子量为100万~1亿道尔顿，远比染色体的分子量为低，存在形式为环状或具缺口双链环或呈紧密盘曲的双链环。在菌体中它与染色体DNA的分子比例仍约为1:1，且细菌可能存在某种调节机构，使染色体DNA每复制一次时，R质体也复制一次。

已发现R因子传递的抗药性主要存在革兰阳性杆形杆菌、大肠杆菌、痢疾杆菌、产酸杆菌等等，尤其是肠杆菌类，它常可经配接而传递。在阴性细菌如葡萄球菌中，也有质体性抗药性，它不能通过配接而传递。抗药性主要针对氨基甙类抗菌素，如链霉素(S)、新霉素及卡那霉素(K)等，但亦可针对氯霉素(C)、四环素类(T)、氨基糖甙类(A)及磺胺类(Su)等。带有几种抗药基因为质体还可控制多元抗药性，例如至ASTSuN/K为五元或CSuATS等五元抗药性。

上述抗药性表现的方式主要是由R因子编码合成各种使抗菌素失活的酶，如乙酰化、磷酸化或腺苷酰化酶等。R因子亦可决定对麦迪霉素的抗药性，引起 β 内酰胺酶的产生。此外，可控制对粘菌素的抗药性，以及对重金属的、对紫外线的、甚至对宿主菌体的抵抗力。

看来，使药物失活的酶，可能是由细胞中原来对某些代谢底物发生乙酰化、磷酸化等的酶进化而来。质体就是为这些酶编码的基因。当某些有关的基因发生突变时，可使该酶结构改变，而对有关的抗菌素产生高度的特异性。

已证明抗几种抗菌素的质体基因可与决定质体转移的

基因(RTF),共同整合于单一结构中,形成胞质体的整合体或共聚体(Cointegrate),这就是一个完整的R因子。这种R因子的迅速演化说明它对细菌的正常调节控制有重要意义。因为细菌的基因决定着细菌在各种环境中生长繁殖的适应能力与运动性。在一定的条件下,仅须少量基因开放,编码合成功能蛋白质及若干种酶;大部分基因不必启用而处于“关闭”状态。如果细菌对某种功能仅偶或用到,在平时极少需要,那么每代中连续复制这种基因就很浪费,会引起进化上的困难,可能因废用而被代换掉。若果这种少用的基因由菌群中少数细胞的胞质体携带,则平时只在这些细胞中复制,而这些胞质体又与转移因子形成共聚体。当需要这种功能时,这些特殊基因可迅速复制交给子代细胞群,也可通过配接接转移到整个细胞群为多数细胞,通过^{分布}于菌群不同细胞所携带的多种胞质体来控制多种功能活动,就可极大地增加基因库的总量,从而增加该菌种的总的代谢适应性潜力达到分工合作的目的。已发现具有高度生长适应能力的类依杆菌属,有控制催化复杂有机分子的分解以用作碳源的酶为这些酶编码的基因就是位于胞质体中,同时也在这些菌中发现了R因子。

还发现胞质体具有细菌的病毒的各种特性,如在细菌体内自行复制等,可以说胞质体在演化的早期可能是细菌的共生体,正如线粒体或叶绿体可能是真核细胞的共生体一样。

四、基因信息转移与抗药性的传播

(一) 转化(Transformation):在研究DNA与遗传信息关系的早期,发现肺炎双球菌的平滑株(S)可转变为粗糙株(R)。此时即发现有一种DNA性质的转化因子。若是在实验上从一种菌株提取裸露的DNA与另一种菌株混合培养

而转导的。同样，抗药性菌株的DNA也可转给另一些敏感株。这种转导方式主要是在实验上进行，包括体外及体内实验，都证明其存在。但是给予敏感株的抗药标记，必须通过抗药株的溶菌作用后才能释放出来。因而认为，这种方式的转导对于临床上的抗药性传播意义不很大。

(二) 转导 (Transduction): 转导是通过噬菌体将抗药性基因转给敏感株的过程。它可发生于革兰阳性及阴性细菌中，抗药性基因的转导双方都要求是能被同一噬菌体感染的细菌。在溶原过程 (lysogeny) 中，感染入侵的噬菌体DNA插入到细菌的基因组中，它与细菌的DNA发生同步的复制。在某些条件下，噬菌体也可溶原地自行复制。后来生成了许多新的噬菌体分子，于是发生菌体细胞的溶解。在溶菌的诱导中，噬菌体的DNA可以“拾取”宿主的部分基因组。基因可来源于细菌的染色体或从游离的胞质体或附加体上拾取，然后拾取来的DNA将作为噬菌体的基因组的一部分而复制。这时就可能从抗药株中拾取到一段包含抗药性决定基因。当这一噬菌体再次感染另一个对药物敏感菌，而处于溶原状态时，就可使新受感染的细菌变成抗药性。如果噬菌体DNA带着抗药性标志一同整合于细菌的基因组中时，当细菌的DNA如常地复制，则可生成抗药细菌的集落，完成了抗药性的转导过程。

通过转导而传播抗药性的例子有金黄色葡萄球菌，这种细菌在其体内常可藏有抗各种药物的胞质体，例如可以产生 β -内酰胺酶以及洁来霉素；还有控制对氯霉素，四环素及红霉素等的抗药性，以及对抗某些有毒重金属如汞的抗药性的胞质体。在阳性球菌中胞质体性抗药基因一般无自动转导或传染能力，均赖噬菌体转导，实验上已证明在体外或动物体内金黄色葡萄球菌的胞质体抗药性由噬菌体转导的现象。而且看来，转导作用是金黄色葡萄球菌抗药性在临床上传播的重要途径。