

抗生素药物面临的挑战与机遇

石炳兴, 李景川, 元英进, 胡宗定

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要: 抗生素药物为人类健康做出了突出贡献, 而病原微生物抗药性的蔓延、新疾病的涌现等问题向抗生素药物提出了新的挑战。现代生物及相关科学技术的发展, 如基因组学、蛋白质组学、生物信息学、生物大分子结晶技术、药物设计学等, 为抗生素药物的研制和开发提供了新的方法与思路。

关键词: 抗生素; 传染性疾病; 抗药性; 基因组; 蛋白质组; 靶点

中图分类号: R37; R978.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2002)05-0470-06

1 前言

20世纪医药界的最大成就之一是抗生素的发现, 使传染病得到了有效控制, 近一个世纪以来, 抗生素挽救了无数人的生命。1900年, 传染病中的肺结核、肺炎、腹泻分别占了死亡率的前3位, 而到1997年, 除肺炎和疟疾排在死亡率的前6位外, 其它传染性疾病的不再出现在死亡率的前10位^[1]。1900~1997年间, 人均寿命由52岁增加到76岁^[2], 这主要归功于抗生素的广泛应用。1929年Fleming发现青霉素以来, 链霉素、氯霉素、红霉素、利福霉素、万古霉素等不同化学结构类型和不同生物活性的抗生素相继问世。据统计, 世界医药市场中, 25种销售量最大的药物中, 42%是天然药物或其衍生物, 其中抗生素份额最大, 占销售额的67%^[3]。

抗生素药物经历了辉煌的发展历程。在其蓬勃发展的同时, 新的问题不断涌现, 抗生素药物面临着病原微生物抗药性和新疾病的严峻挑战。然而, 现代科学技术的发展给抗生素的研究提供了各种新的方法与思路。

2 抗生素药物面临的新问题

早在1969年, Stewart^[4]乐观地认为“ It is time to close the book on infectious diseases”, 以至于到了20世纪80年代, 许多大的制药公司错误地认为, 已有的抗生素足以对付各种传染性疾病^[5], 从而减少、甚至不再从事抗生素的研究与开发, 集中转向非传染性疾病如心血管疾病、肿瘤等药物的开发^[1]。

然而, 人们当时过于乐观地估计了抗生素的效能。据统计, 1998年有超过1300万人死于传染病, 接近该年总死亡人数的1/4, 在世界范围内, 仅肺炎球菌感染引起的肺炎、脑膜炎、败血症每年导致120万人死亡^[2]。即使是发达国家, 传染病的死亡率也在不断增加, 仅美国, 每年就有3000例肺炎球菌引起的脑膜炎、50万例败血症、10万例肺炎、700万例中耳炎, 4万人死亡; 因细菌和真菌引起的感染性疾病的负担每年达到200多亿美元^[6]。传染病严重威胁人类健康的同时给各国

收稿日期: 2001-12-12, 修回日期: 2002-05-27

基金项目: 国家“863”计划(新型抗生素及抗肿瘤药的研究资助项目(编号: 2001AA2141081); 天津市自然科学基金重点资助项目(编号: 013801221)。

作者简介: 石炳兴(1967-), 男, 安徽宿松县人, 博士, 生物制药工程专业。

带来了沉重的经济负担。

耐药致病菌株的出现、已消灭疾病(如肺结核、疟疾、黄热病、淋病等)的死灰复燃、新的流行病的发现,导致传染病的死亡率开始回升,人们不得不重新认识传染病对人类健康的严重威胁。

2.1 病原微生物的抗药性

2.1.1 抗药性的蔓延

病原菌抗药性是感染性疾病引起死亡的主要原因之一。在抗生素临床应用不久,细菌便对其产生了耐药性。1979~1994年,沙门氏菌(*Salmonella*)多药物抗性菌株从17%增加到31%^[7]。据世界卫生组织统计,1999年世界范围内有95%以上的金黄色葡萄球菌抗青霉素,60%以上抗甲氧霉素;更为严峻的是出现了同时耐多种药物的菌株,从血液中分离的沙门氏菌有50%以上的菌株抗4种以上的抗生素^[8]。一些从医院获得的金黄色葡萄球菌多药物抗性(multi-drug resistance)菌株同时对 β -内酰胺类、大环内酯类、氨基糖苷类等以肽聚糖、核糖体为靶点的抗生素都有抗性。因此,临床上不得不使用毒副作用较大的万古霉素,但抗万古霉素的抗药菌株也在迅速蔓延,1989~1999年间,美国从病人中分离到的抗万古霉素病原菌从0.4%上升到25.9%^[9]。

由此可见,不同的病原微生物都对各种抗生素具有不同程度的抗药性,抗药性在不同病原微生物间迅速蔓延。

2.1.2 抗药性蔓延的主要原因

抗药菌株出现的主要原因在于滥用抗生素。1992年美国门诊开出的1.1亿例抗生素处方中,有18%是针对上呼吸道感染,但这其中有很大一部分是因病毒引起的,抗生素没有明显效果或效果甚微^[10]。用量数倍于人用抗生素的兽用抗生素的滥用是造成抗药性蔓延的另一重要原因^[11]。

大多数葡萄球菌的抗生素抗性基因存在于质粒上,该基因可以通过质粒转移和交换使得球菌、杆菌等其它致病菌获得抗药性;另一些抗性基因存在于转座子。环境压力起到了促进抗药性基因转移和基因突变的作用^[12]。例如,四环素抗性基因,在不同微生物如金黄葡萄球菌、乳酸菌、粪肠球菌等的同源性高达98%以上,由此可见抗药性基因在微生物之间的传播现象的广泛性^[4]。

抗药性不仅存在于病原细菌,同样存在于真菌(如 *Candida albicans* 等)^[13]、病毒(如 HIV)、原虫(如疟疾等)。

2.2 新疾病的出现需要新的抗生素

除了抗药性,一些已消灭疾病的死灰复燃和新流行病(如 Lyme disease, HIV, Nipah virus, hantavirus, *E. coli* O157:H7, *Vibrio vulnificus* 等)的出现对抗菌药物的研究与开发提出了新的挑战。

生活方式和生活条件的改变是促进某些非常罕见或新的病原微生物滋生的重要原因。1997年,Avian flu virus 在香港由鸟类传染给人类,导致6人死亡,引起了人们对该传染病的恐慌。O157:H7 在美国每年要引起73000例食物源疾病,其中有2%~7%的患者导致了血尿综合症,对儿童将导致肾功能衰竭。

病原菌抗药性和不断发现的新疾病将是21世纪医药界面临的严重问题,然而,新技术的进展也为新药设计和开发开辟了新的途径。

3 抗生素药物研究面临的新机遇

生物技术的新进展,尤其是基因组技术、蛋白质组技术、生物信息技术等对阐明病原微生物的致病机制、代谢途径、药物作用机理、解析生物大分子的高级结构,为识别和开发药物新的作用靶点和针对新靶点的药物设计等带来了新的机遇。同时,对合成抗生素的微生物的深入认识,为

提高已有抗生素的产率、理性设计生物合成新的抗生素提供了依据。

3.1 微生物基因组学与抗生素新药设计

病原微生物基因组学的研究为微生物研究和抗生素等药物筛选提供了新的手段。它将在发现新药的作用靶点、开发高通量新药筛选系统以及先导物优化、毒性研究和临床研究中起着重要作用。至 2000 年底已完成基因全序列测定的病原微生物有 24 种,正在进行的有 40 余种。大量基因组数据储存在公共数据库。

肺结核经长达半年的组合治疗可使治愈率达到 95%,但目前死于结核病的人数每年仍然达到 300 万^[14]。由于 AIDS 的流行,形势还在进一步恶化。结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的基因序列于 1997 年底全部完成,目前面临的任务是从约 4500 个开放阅读框架中寻找其生存必须的特异框架。

Stover 等^[15]测定了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的基因组序列,试图从中找到新的药物靶点。研究发现,该病原微生物之所以临床难以对付,是因为其具有较其它病原微生物更多的调节因子和内源固有抗药因子,其中 RND 泵出系统(the resistance-nodulation-cell division efflux system)是其内源固有抗药性的机制之一,该菌含有多达 10 个以上该类系统编码基因。这些新基因的发现为新药设计提供了新的靶标。

Backer 等^[16]利用基于反义 RNA 技术的功能基因组方法,对临床常见病原真菌白色念珠酵母(*Candida albicans*)的基因功能进行了深入研究,识别了 86 个对该微生物生长的关键基因,这些基因将成为设计抗真菌药物的新靶点,采用高通量筛选和组合化学方法,将可得到高活性、低毒性的新抗真菌药物。

微生物基因组计划及相关生物技术的进展不仅对认识病原微生物的生理特征和致病机制、促进新药开发有重要作用,还促进了对抗生素的生物合成途径的认识,有利于提高抗生素的产率和设计新抗生素的生物合成。例如,1997 年,Sanger 和 Hopwood 课题组共同启动了天蓝链霉菌(*S. coelicolor*)基因组计划,这使人们对链霉菌的抗生素合成相关基因和酶有了更深的认识。聚酮合成酶(polyketide synthases)是多种抗生素生物合成的关键酶之一,Bisang 等^[17]对其脱羧活性和聚酮合成活性及作用机制进行了系统研究,这使得通过调节该酶的活性,提高多酮类抗生素的产率成为可能。Roach 等^[18]解析了异青霉素 N 合成酶与底物复合物的晶体结构,深入阐明了青霉素的生物合成机制,有利于设计生物合成新的抗生素。

3.2 蛋白质和蛋白质组学与新抗生素设计

蛋白质及蛋白质组功能信息将对阐明微生物生理代谢途径、寻找新的药物靶点、设计新的药物发挥重要作用。

蛋白质组技术已初现成效。80%的胃溃疡和 90%的十二指肠溃疡是由幽门螺旋杆菌引起的。Rain 等^[19]采用酵母双杂交系统方法研究了该病原菌蛋白质组中的 1200 个相互作用,连接了其蛋白质总数的 46.6%,初步构建了其蛋白质-蛋白质相互作用图谱(protein-protein interaction map)。

病原微生物的抗药机制相关蛋白同样是新药设计的靶标。如金黄色葡萄球菌抗 β -内酰胺类抗生素的机制之一是该菌株存在高活性的水解青霉素的 β -内酰胺酶,调节 β -内酰胺酶的信号途径已研究了 30 余年。ZHANG 等^[20]发现,*blaZ* 基因的表达、 β -内酰胺酶的产生依赖于多个信号元的一系列蛋白(信号转导子 BlaR1、阻遏因子 BlaI)的裂解。青霉素结合蛋白 PBP2a 的产生与调节途径与前者类似,MecR2 和 MecI 的裂解是 *mecA* 基因表达、产生 PBP2a 必需的。同时, β -内酰胺酶和青霉素结合蛋白 PBP2a 调节途径的各个组元成为开发抗 β -内酰胺类抗生素菌株新药的靶点^[21]。

李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是常见的食物来源病原菌, Lecuit 等^[22]通过建立转基因动物模型, 阐明了蛋白 Internalin 在该微生物穿透肠道屏障过程中所起的作用. Internalin 将成为新药物设计的靶标.

采用蛋白质工程方法融合抗生素合成途径中的多个关键酶, 使抗生素的体外酶促合成成为可能^[23, 24]. 组合生物催化合成方法是组合化学合成方法的重要补充.

3.3 生物大分子结晶技术与抗生素新药设计

与基因组学和蛋白质组学密切相关的生物大分子结晶技术、多维核磁共振技术、X 射线衍射技术使对小分子药物配基与生物大分子受体的相互作用深入到分子水平. 例如, Weiberly 等^[25]解析了核糖体蛋白 30S 亚基与链霉素、paromomycin 和 spectinomycin 复合物的晶体结构; Carter 等^[26]在此基础上进一步阐明了其间的相互作用及该类抗生素干扰蛋白质合成的机制; Orth 等^[27]借助解析的四环素阻遏子(TetR)的晶体结构从分子机制深入阐明了革兰氏阴性菌的四环素抗性; Wurtele 等^[28]解析了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)致病毒素 ExoS 的晶体结构, 对其致病机制进行了研究. 对药物与受体间分子相互作用的认识, 结合分子力学与分子动力学的分析, 有助于在短时间内理性设计出更高活性和低毒性的新化合物.

3.4 生物信息学与抗生素的开发

蛋白质结构数据库(PDB)目前已收集了数千个蛋白质及其与小分子配基结合的复合物的高级结构, 为新的药物设计和筛选奠定了基础. 美国 Trega Bioscience 公司与 Duke 大学合作建立了新的微生物天然产物数据库(Available Pathways Database, APD), 收集了迄今为止美国专利及 ATCC 有关微生物代谢产物、次生代谢途径、基因工程等资料^[29]. 日本、欧洲等也建立了相应数据库. 各种代谢数据库提供了大量天然产物、病原微生物、工业微生物、模式生物等初生、次生及致病机制等相关代谢途径, 尤其是对特异途径的认识和了解, 将对药物新靶点的开发、药物合成途径的调控、乃至药物设计的新思想等都起着难以估量的作用.

此外, 由于基因组学、蛋白质组学和大分子结晶技术使人们对代谢途径中的相互作用有了立体和系统的认识, 天然产物和化学物质数据库提供了大量化合物以供高通量筛选, 组合化学的方法将在定向合成新化合物中发挥重要作用. 近年兴起的生物芯片技术将在新抗生素的高通量筛选和生物分子间的相互作用研究中发挥重要作用.

4 展望

面对不断出现的新问题, 人们呼吁短期内应采取以下应对措施: 一是减少抗生素的滥用, 尤其是在动物饲料添加剂等非人药方面的应用; 二是做好传染病的防治工作, 尽可能减少传染病的传播, 提高诊断技术水平, 有效诊断, 加强控制, 全球范围监测和轮换用药, 合理设计药物配方; 三是加强对病原微生物和其致病机制的基础研究, 加强新药开发, 这包括现有抗生素的联合治疗、新抗生素的发现、预防性疫苗的开发等^[30].

从新药开发的角度来说, 最可行的短期见效的解决方法可能是开发新的窄谱抗生素, 将抗生素开发与应用方向从广谱抗生素如青霉素转向窄谱抗生素, 这是考虑到广谱抗生素的应用不仅诱发了所治疗疾病临床致病菌的抗药性, 同样诱发了其它微生物的抗药性, 从而增加了新的抗药机制的演化和不同抗药细菌群之间交换传播的机会^[31].

近年来, 抗菌肽的研究倍受关注, 因为微生物细胞膜是该类抗菌剂的作用靶点, 而人的细胞膜通常与微生物不同^[33]. 微生物基因组的进展促进了反义核酸的开发, 特别是针对病原微生物特

异 DNA 或 RNA 的反义核酸将是新的核酸类抗生素的发展方向. 肽核酸(PNAs)因在反义核酸的一端连接特异肽段的 8~15 mer 的核酸序列不仅具有很强的活性, 而且具有较强的选择性^[32].

我国医药工业的发展经历了长期的仿制阶段, 加快开发拥有自主知识产权的新药是当务之急. 生物技术的迅速发展, 尤其是人类基因组计划的实施、多种微生物基因组计划的完成、蛋白质组学、生物信息学等的发展, 为致病机理的研究、新药的开发提供了新的手段. 新技术的应用为我国制药工业的奋起提供了难得的机会.

参考文献:

- [1] Cohen M L. Changing Patterns of Infectious Disease [J]. *Nature*, 2000, 406: 762–767.
- [2] Armstrong, G L, Conn L A, Pinner Y. Trends in Infectious Disease Mortality in the United State during the 20th Century [J]. *Journal of American Medicine Association*, 1999, 281: 61–66.
- [3] Kate K, Laird S A. The Commercial Use of Biodiversity [M]. London, U K: Earthscan Publications Ltd., 1999. 333–335.
- [4] Mann J M. AIDS in the World [M]. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1992. 825–839.
- [5] Bax R P. Antibiotics Resistance: A View from the Pharmaceutical Industry [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, 24 (Suppl.): 5151–5153.
- [6] Perreten V, Cresta L, Teuber M, et al. Antibiotic Resistance Spread in Food [J]. *Nature*, 1997, 389: 801–802.
- [7] Lee L A. Increase in Antimicrobial-resistance *Salmonella* Infections in the United States, 1989–1990 [J]. *Journal Infectious Diseases*, 1994, 170: 18–34.
- [8] McCormick J B. Epidemiology of Emerging/Pre-emerging Antimicrobial Resistant Bacterial Pathogens [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1998, 1: 125–129.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria: 1998 Annual Report [R]. Atalanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1999. 150–151.
- [10] McCraig L F, Hughes J M. Trends in Antimicrobial Drug Prescribing among Office-based Physicians in the United States [J]. *Journal of American Medicine Association*, 1995, 273: 214–219.
- [11] Harvey J, Mason L. The Use and Misuse of Antibiotics in Agriculture: Part 1. Current Usage [M]. Bristol, UK: Soil Association, 1998. 36–38.
- [12] Walsh C. Molecular Mechanism that Confer Antibacterial Drug Resistance [J]. *Nature*, 2000, 406(17): 775–781.
- [13] Cowen L E, Sanglard D, Calabrese D, et al. Evolution of Drug Resistance in Experimental Populations of *Candida albicans* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(6): 1515–1522.
- [14] Abdulla S. Tuberculosis: Milking the Genome for Drug Targets and Vaccines [J]. *Molecular Medicine Today*, 1998, 3: 104–105.
- [15] Stover C K, Pham X Q, Erwin A L, et al. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01: An Opportunistic Pathogen [J]. *Nature*, 2000, 406: 959–964.
- [16] Backer M D D, Nelissen B, Logghe M, et al. An Antisense-based Functional Genomics Approach for Identification of Genes Critical for Groth of *Candida albicans* [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(3): 235–241.
- [17] Bisang C, Long P F, Cortes J, et al. A Chain Initiation Factor Common to Modular and Aromatic Polyketide Synthases [J]. *Nature*, 2001, 401: 502–505.
- [18] Roach P L, Clifton I J, Hensgens C M H, et al. Structure of Isopenicillin N Synthase Complexed with Substrate and the Mechanism of Penicillin Formation [J]. *Nature*, 1997, 387: 827–830.
- [19] Rain J C, Luc S, Hilde D R, et al. The Protein–Protein Interaction Map of *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 2001, 409: 211–215.
- [20] ZHANG H Z, Hackbarth C J, Chansky K M, et al. A Proteolytic Transmembrane Signaling Pathway and Resistance to β -lactams in *Staphylococci* [J]. *Science*, 2001, 291(9): 1962–1964.
- [21] Gorgon L Archer, Joseph M B. Signaling Antibiotic Resistance in *Staphylococci* [J]. *Science*, 2001, 291(9): 1915–1916.
- [22] Lecuit M, Vandomael-Pourmin S, Lefort J, et al. A Transgenic Model for *Listeriosis*: Role of Internalin in Crossing the Intestinal Barrier [J]. *Science*, 2001, 292: 1722–1725.
- [23] Gokhale R S, Tsuji S Y, Cane D E, et al. Dissecting and Exploiting Intermodular Communication in Polyketide Synthases [J]. *Science*, 1999, 284: 482–485.
- [24] Bornscheuer U T, Pohl Martina. Improved Biocatalysts by Directed Evolution and Rational Protein Design [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5: 137–143.

- [25] Weiberly B T, Broadsen D E, Clemons W M, et al. Structure of 30S Ribosomal Subunit [J]. *Nature*, 2000, 407: 327–339.
- [26] Carter A P, Clemons W M, Brodersen D E, et al. Function Insights from the Structure of the 30S Ribosomal Subunit and Its Interactions with Antibiotics [J]. *Nature*, 2000, 407: 340–348.
- [27] Orth P, Schnappinger D, Hillen W, et al. Structural Basis of Gene Regulation by the Tetracycline Inducible Tet Repressor–Operator System [J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7: 215–219.
- [28] Wurtele M, Wolf E, Pederson K J, et al. How the *Pseudomonas aeruginosa* ExoS Toxin Downregulates Rac [J]. *Nature Structural Biology*, 2001, 8: 23–26.
- [29] Pirrung M C, Silva C M, Jaeger J. Available Pathways Database (APD) : An Essential Resource for Combinatorial Biology [J]. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 1400–1405.
- [30] Neely A N, Holder I A. Antimicrobial Resistance [J]. *Burns*, 1999, 25(1): 17–24.
- [31] Moellering R C J. Past, Present, and Future of Antimicrobial Agents [J]. *The American Journal of Medicine*, 1995, 99(12) (Suppl. 6A): 6A–11S.
- [32] Good L, Awashthi S K, Dryselius R, et al. Bactericidal Antisense Effects of Peptide-PNA Conjugates [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 360–364.
- [33] Breithaupt H. The New Antibiotics [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(12): 1165–1169.

Challenges and Opportunities to Antibiotics

SHI Bing-xing, LI Jing-chuan, YUAN Ying-jin, HU Zong-ding

(*Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China*)

Abstract: Challenges and opportunities to antibiotics are reviewed. Antibiotics, which have greatly enhanced human health, now are facing the issue of drug resistance of pathogen microbes and newly found diseases. However, modern biotechnology, including genomics, proteomics, bioinformatics and bio-macromolecular crystallization, is providing new ideas and methodology for the research and development of new pharmaceuticals.

Key words: antibiotics; infectious disease; drug resistance; genome; proteome; drug target