

大环内酯类药物对绿脓杆菌作用的研究

朱尚峰, 金跃春(广西南宁市第一人民医院, 南宁 530022)

摘要: 目的 重新认识大环内酯类药物对绿脓杆菌作用的机理。方法 通过 CAJ 文献数据库检索; 从大环内酯类药物对绿脓杆菌的抗菌作用原理的角度来分析研究。结果 大环内酯类药物对绿脓杆菌感染的作用不是通过经典的核糖体途径(与细菌核糖体的 50S 亚基结合, 从而抑制细菌蛋白质合成), 而是通过免疫调节、抗炎作用和抑制细菌毒力的作用来抑制或杀灭绿脓杆菌。结论 大环内酯类药物用于治疗支气管炎、支气管囊性纤维化 (CF)、支气管扩张症、慢性副鼻窦炎、烧伤并发的绿脓杆菌等疾病的治疗, 疗效显著。

关键词: 大环内酯类药物; 免疫调节; 抗炎作用; 抑制细菌毒力

中图分类号: R978.15

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)08-0627-05

Study on the Effect of Macrolide on *Pseudomonas Aeruginosa*

ZHU Shangfeng, JIN Yuechun(*Guangxi Nanning First People's Hospital, Nanning 530022, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE The restudy of mechanism of macrolide drugs on *pseudomonas aeruginosa* (PA) is of high

作者简介: 朱尚峰, 男, 副主任药师

Tel: 13517664551

E-mail: zhushangfen@163.com

中国现代应用药学杂志 2009 年 8 月第 26 卷第 8 期

Chin JMAP, 2009 August, Vol.26 No.8

• 627 •

guidance for clinically treating PA infection and doing basic research. **METHODS** Retrieval through CAJ bibliographic database, analysis and research from the view of the antibacterial action mechanism of macrolide drugs on PA. **RESULTS** The action mechanism of macrolide drugs on PA infection is not through classic ribosomes (to combine with 50S subunits in bacterial ribosomes so to restrain the synthesis of bacterial protein) but to restrain or kill PA through immune regulation, anti-inflammation and inhibition of bacterial virulence. **CONCLUSION** Macrolide drugs are effective in treatment of bronchitis, cystic fibrosis (CF), bronchiectasis, chronic paranasal sinusitis (CPS), burn complications of PA.

KEY WORDS: macrolide drugs; immune regulation; anti-inflammatory; inhibition of bacterial virulence

绿脓杆菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)属假单胞菌属(*pseudomonas*), 是一种需氧革兰阴性杆菌, 广泛分布于自然界(空气、土壤、水)及正常人的皮肤、肠道和呼吸道, 是临床上较常见的条件致病菌之一。PA 的鞭毛、菌毛、生物膜、外毒素、蛋白酶、脂肪酶、细菌的群体反应性等均构成了它的毒力因素。PA 致病力极强且对多种抗生素(β 内酰胺类、喹诺酮类、四环素、氯霉素等)易产生耐药, 导致其感染的难治性。而理论上对 PA 不敏感的大环内酯类药物临床上对 PA 感染病例的有效性, 使人们对大环内酯类药物的作用得以重新认识。大量的研究表明, 大环内酯类药物对 PA 有效, 但是其作用机制仍不甚清楚。推测大环内酯类药物对 PA 感染的作用不是通过经典的核糖体途径(与细菌核糖体的 50S 亚基结合, 从而抑制细菌蛋白质合成), 而是通过免疫调节、抗炎作用^[1]和抑制细菌毒力^[2]的作用来抑制或杀灭 PA。而这方面的研究对于临床上治疗 PA 感染及其基础研究有较大的指导意义。

1 大环内酯类药物的免疫调节和抗炎活性

1.1 大环内酯类药物抗炎作用的发现和运用

大环内酯类药物的免疫调节、抗炎作用的发现始于 20 世纪 70 年代。当时 Itkin 等在临床实践中发现红霉素可明显改善无细菌感染的糖皮质激素依赖型哮喘的气道功能, 缓解咳嗽、咳痰、气促等临床症状, 并减少糖皮质激素依赖^[3]。之后, 关于大环内酯类药物抗炎活性的研究报道逐年增多。最有意义的是 1982 年红霉素开始用于弥漫性泛细支气管炎(DPB)的治疗^[4]。尽管红霉素治疗 DPB 确切机制仍不甚清楚, 但是有证据表明红霉素的治疗作用不是依赖其抗菌活性: ①未除病菌病情也改善; ②对红霉素不敏感的 PA 也有效; ③血清及痰中的药物浓度在其最低抑菌浓度(MIC)以下。此后红霉素等大环内酯类药物用于治疗慢性炎症性疾病越来越广泛。现已广泛用于 DPB、囊性纤维化(CF)、支气管扩张症、慢性副鼻窦炎

等疾病的治疗, 疗效显著^[4]。这类疾病中大多数较易合并 PA 感染。

1.2 大环内酯类药物的临床药理及分子机制的研究

调节机体的细胞免疫和体液免疫系统, 临床用药证实 14、15 元环大环内酯类药物(红霉素、罗红霉素、阿奇霉素等)对慢性炎症性疾病能起免疫调节作用, 而 16 元环大环内酯类药物(交沙霉素等)几乎无此类作用^[4]。目前大环内酯类药物临床药理研究已经涉及分子及基因方面。研究发现, 红霉素可抑制气道上皮分泌白细胞介素 8(IL-8), 抑制中性粒细胞释放白三烯 B (LTB)和弹性硬蛋白酶, 减少中性粒细胞在气道黏膜的聚集; 抑制外周血淋巴细胞的增殖和活化, 促进单核-巨噬细胞系统的成熟和分化等, 从而抑制下呼吸道内不适当的过度炎症; 抑制气道上皮分泌黏蛋白, 并阻断 cl -通道抑制水分的分泌, 使气道黏液分泌减少^[5]。Park 等^[6]的实验证明, DPB 患者小剂量长期使用红霉素后支气管肺泡灌洗液中诱导 Th1 生成的细胞因子 IL-2、 γ 干扰素(IFN- γ)明显减少, 而诱导 Th2 生成的细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 明显升高。说明红霉素治疗 DPB 后机体 T 细胞免疫由 Th1 向 Th2 方向发展, 从而起到免疫调节作用。Jaffé 等^[7]在 2001 年对 CF 患者治疗的探讨中提到, 在细胞膜离子转运过程中扮演重要角色的膜转导因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)的基因突变是导致 CF 发病的重要原因, 而大环内酯类药物可能在膜离子转运的干涉方面对 CF 有治疗作用。但 Barker 等^[8]2005 年的最新动物和人体体内研究表明。大环内酯类药物并不能改变用鼻电位差方法测量的膜离子通道的电位变化, 所以考虑大环内酯类药物对 CF 中的治疗作用不是由于改变了离子通道引起, 而是由其他机制所致。以上研究表明, 大环内酯类药物在治疗 PA 所致的慢性炎症过程中, 并非是直接抑制细菌生长, 而是调节机体免疫功能达到抗炎作用。同时还有研究显示大环内酯类药物通过抑制气道炎症反应, 在

气道黏膜的修复过程中发挥作用^[9],协助受损气道黏膜上皮的恢复。

2 大环内酯类药物对 PA 黏附、运动作用的抑制

PA 的移动主要依赖其单极鞭毛,低剂量红霉素可抑制细菌鞭毛的生成,且随着药物浓度的增加抑制作用逐渐增强,但对已经存在的 PA 鞭毛则没有抑制作用^[10]。提示大环内酯类药物可能是通过基因水平抑制细菌鞭毛的生成。研究发现 15 元环的阿奇霉素比 14 元环的红霉素、罗红霉素对 PA 鞭毛的抑制作用更明显,而 16 元环的大环内酯类药物基本无该作用。大环内酯类药物抑制细菌鞭毛的合成,从而抑制细菌游走,因此降低 PA 的致病能力。PA 的 IV 型菌毛是位于细菌细胞端部的纤毛,介导细菌吸附到宿主的上皮细胞,并通过菌毛的收缩和伸展而使细菌在上皮组织或固相表面产生位置移动,这种运动称为蹭行运动 (twitching motility)。蹭行运动是细菌在固体表面的运动,可有助于细菌黏附于宿主细胞并形成集落。体外实验进一步证实细菌通过蹭行运动将其黏附于气道上皮细胞的 aGM1 受体,介导早期的前炎症因子的释放,尤其是 IL-8, IL-6, 继而中性粒细胞聚集,超氧化物、弹性蛋白酶释放,所以蹭行运动是感染和炎症早期的关键环节^[11]。已有很多关于红霉素等大环内酯类抗生素抑制 PA 菌毛活性的报道。Wozniak 等^[12]用 4 组 PA 做实验,第 1 组未加抗生素,其余 3 组分别予 $0.003 \times \text{MIC}$, $0.03 \times \text{MIC}$ 及 $0.07 \times \text{MIC}$ 浓度的克拉霉素体外预处理,并将其分别接种于琼脂平皿的琼脂塑料平皿交界处,培养 24-48 h 后,未加药物组的平皿细菌聚集,并有显著的特有的光晕出现;而加克拉霉素处理的平皿细菌聚集及光晕明显减少,而且呈剂量依赖性,克拉霉素剂量最高的一组细菌聚集最少、光晕几乎没有。说明大环内酯类药物可明显减少 PA 的蹭行运动,尽管其机制还不清楚,但已知大环内酯类药物并不减少 IV 型菌毛的生成,只会显著减少细菌聚集和抑制其活性^[12]。

3 对 PA 生物膜形成的抑制

生物膜是细菌为了适应环境而采取的一种生存策略,可以帮助细菌逃避机体免疫和抗菌药物的杀伤作用。生物膜的主要成分是胞外黏多糖,黏多糖的主要成分是藻酸盐,鞭毛和 IV 型菌毛也是生物膜的构成成分。目前国外研究 PA 生物膜的功能及抗生素作用时多采取体外生物膜模型。国内这方面

的研究刚刚起步,有实验分别采用硅胶片和盐水一特氟隆系统建立生物被膜模型进行研究,取得了一定的结果^[13-14]。彭程等^[15]亦用体外实验证明大环内酯类药物的效果。他们采用聚碳酸酯过滤膜或聚丙烯酰胺膜制备 PA 生物膜,计数滤膜菌落并用扫描电镜观察,发现红霉素、阿奇霉素能抑制 PA 生物膜的形成。张杰等^[16]在体外培养 PA 菌膜时加入克拉霉素,发现并不影响对克拉霉素耐药的铜绿假单胞菌的数量增长,但电镜观察到细菌的菌膜出现了明显的抑制反应。由于体内生理环境的复杂性,体内实验研究的意义更为重要。有体内实验表明,红霉素治疗明确为 PA 感染的病例 10 d 后,取得患者痰中 PA 标本,用比色法测 PA 产生的藻酸盐量明显减少^[17]。李惠萍等^[18]在临床患者实验中亦发现用红霉素干预下呼吸道 PA 感染的患者后,用电镜观察患者痰中的 PA 变形明显,菌毛、鞭毛消失;同时用比色法发现藻酸盐含量亦较对照组有明显降低;并发现红霉素治疗组患者对其他抗生素的耐药性降低。Takeoka 等^[19]采用化学发光法进行的实验表明,大环内酯类抗生素(阿奇霉素、红霉素、罗红霉素)能有效地增强多形中性粒细胞(PMN)对 PA 生物膜的吞噬作用。目前,国内外的动物体内实验和体外培养 PA 的研究表明,红霉素等大环内酯类抗生素可以抑制藻酸盐生物合成途径中的二磷酸甘露糖脱氢酶(GMD)活性,从而破坏生物被膜的形成。以上体内、外实验都说明红霉素等大环内酯类药物对 PA 生物膜的直接或间接的抑制作用。大环内酯类药物通过抑制藻酸盐生成,减少藻酸盐复合物,并减少藻酸盐复合物引起的抗原抗体反应以及抑制鞭毛、菌毛的生成、活性等作用来抑制细菌生物膜生成,而且在抑制细菌生物膜形成的同时,也减少了 PA 对其他抗生素的耐药性,辅助用药时能帮助其他抗生素渗入到菌体,增强杀菌能力。但大环内酯类药物是否对已形成的细菌生物膜起作用还不清楚。

4 对 PA 毒素及其他代谢产物生成的抑制

PA 分泌的毒力因子主要有外毒素 A、内毒素蛋白-脂多糖复合物(OPE-LPS 复合物)、细胞外酶(包括弹性蛋白酶、蛋白酶、脂肪酶)、溶血素及黏液物等。Tamaoki 等^[20]用动物实验已经证明红霉素能抑制 LPS 诱发引起的气道炎症反应。Mizukane 等^[21]体外实验证明大环内酯类药物尤其是阿奇霉素能较明显的抑制 PA 产生外毒素、弹性蛋白酶、

蛋白酶、磷脂酶等物质。Hirakata 等^[22]亦用体外实验证实红霉素对 PA 的弹性蛋白酶产量有剂量依赖的抑制作用。外毒素是 PA 的重要物质,有 90% PA 菌株产生外毒素。目前对 PA 外毒素的研究已经深入到分子水平,已经确切知道 PA 外毒素的氨基酸顺序,明确区分出外毒素的结合区、转位区和催化区。PA 的重组免疫制剂在临床也已广泛应用。这些研究外毒素的分子机制将有利于对大环内酯类药物的作用机制的深入研究。PA 还产生绿脓菌素,是一种绿色荧光素,在抗生素存在时它的变异较多,绿脓菌素在 PA 致病过程中的作用及其大环内酯类药物是否对其有作用目前还不清楚。PA 还可通过宿主含铁细胞的铁摄入引起继发的毒素释放^[23],大环内酯类药物是否对 PA 的这个环节起作用也还不得而知。

5 对 PA 群体反应(quorum-sensing, QS)的调节

群体反应是指细菌间的沟通现象,细菌都有信号传导的能力,由细菌的自诱导物引起,从而选择聚集、增值和释放毒素。自诱导物在 PA 等革兰阴性杆菌中主要是指酰化高丝胺酸内酯(AHLs)。目前已知道群体反应的关键成分——自诱导物的合成基因为 LasI、RhlI,其活性调节基因分别为 LasR、RhlR,而产物分别为氧化癸酰基高丝胺酸内酯(OdDHL)和丁酰基高丝胺酸内酯(BHL)^[24](AHLs 的不同形式)。所以 Las 和 Rhl 两个群体感应系统激活可以生成 OdDHL 和 BHL,再诱导 PA 各种毒素和酶的释放。Dockery 等^[25]用已知的自诱导物成功地建立 PA 群体反应的精确模型。Lesprit 等^[26]亦用大鼠实验证明, LasR 基因存在的 PA 菌株产生自诱导物质,有明显的群体感应性;而 LasR 基因缺如的 PA 菌株则无群体感应性现象出现。阿奇霉素等大环内酯类药物可以在核糖体水平减少自诱导物的生成,从而减少 PA 的群体反应性^[27]。目前还有研究表明 Qs 对机体的免疫系统有影响,OdDH 具有免疫调节活性,抑制淋巴细胞增殖及受脂多糖刺激的巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 r (TNF- r),同时明显减少 IL-12(有助于 Th1 的细胞因子)的生成。OdDHL 也促进受 IL-4 刺激的人类外周血单核细胞产生 IgE。这些结果表明 OdDHL 可能影响受感染宿主的 Th1 / Th2 平衡,除了调节毒性因子的表达,其自身作为一个毒性因子在 PA 感染的发病中发挥作用^[28]。所以大环内酯类药物的免疫调节、抗炎作用对 Qs 的调节亦可能起

到作用。最新研究表明不同种类的细菌间也可能存在群体反应,这可能由一种称为自诱导物 2(AI-2)的物质实现^[29-30]。大环内酯类药物是否对这类信号物质起作用也是有待研究的问题。PA 是极易产生耐药性的顽固致病菌,用传统的思维方式来解决 PA 感染所遇到的问题越来越棘手,这也是目前医学界迫切期待解决的难题。美国已于 2001 年就完成了 PA 的基因组测序,从基因水平进一步研究 PA 的致病和耐药机制及大环内酯类药物的作用靶点是今后的发展方向,而且开发出一种能有效的阻断 PA 的感染途径而在长期应用中无其他不良反应的新型大环内酯类药物^[31-32]。

REFERENCES

- [1] PAMHAM M J. Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections [J]. Curr Opin Infect Dis, 2005, 18(6): 125-131.
- [2] MOLINARI G, GUZMAN C A, PESCE A, et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by subinhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 30(5): 581-588.
- [3] WU L, YU R H. Macrolide antibiotics, anti-inflammatory activity [J]. Foreign Med Sci(Respir Syst)(国外医学呼吸系统分册), 2002, 22(2): 108-110.
- [4] YU Y J. Attention to the identification panbronchiolitis [J]. Chin J Intern Med(中华内科杂志), 2000, 39(1): 8-9.
- [5] LI H P, HE G J. Panbronchiolitis research. Respiratory medicine abroad System into volumes [J]. Foreign Med Sci(Respir Syst)(国外医学 呼吸系统分册), 2004, 24(2): 101-102.
- [6] PARK S J, LEE Y C, RHEE Y K, et al. The effect of long term treatment with erythromycin on Th1 and Th2 cytokines in diffuse panbronchiolitis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(1): 114-117.
- [7] JAFFÉ A, BUSH A. Cystic fibrosis: review of the decade [J]. Monaldi Arch Chest Dis, 2001, 56(3): 240-247.
- [8] BARKER P M, GILLIE D J, SCHECHTER M S, et al. Effect of macrolides on *in vivo* ion transport across cystic fibrosis nasal epithelium [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(8): 868-871.
- [9] GAREY K W, ALWANI A, DANZIGER L H, et al. Tissue reparative effects of macrolide antibiotics in chronic inflammatory sinopulmonary disease [J]. Chest, 2003, 123(1): 261-265.
- [10] KAWAMURA-SATO K, IINUMA Y, HASEGAWA T, et al. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(10): 2869-2872.
- [11] KUBE D, SONTICH U, FLETCHER D, et al. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines [J]. Am J Physiol Lung

- Cell Mol Physiol, 2001, 280(3): L493-502.
- [12] WOZNIAK D J, KEYSER R. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chest, 2004, 125(2 Suppl): 62S-69S.
 - [13] CHEN Q, WANG R, FANG X Q, et al. Hydrochloric acid feroxacin of *Pseudomonas aeruginosa* by biological membrane [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 1997, 22(6): 435-441.
 - [14] FANG X Q, LIU Y N, CHEN Q, et al. Azithromycin for biofilm inhibition and fluoride feroxacin synergies [J]. Chin J Tuberc Respir Dis(中华结核和呼吸杂志), 1998, 21(9): 538-540.
 - [15] PENG C, XIAO Y H. A study of effects of macrolides on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2001, 26(4): 286-289.
 - [16] ZHANG J, XU L L, GUO W, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and clarithromycin [J]. Chin J Intern Med (中华内科杂志), 2002, 41(1):50-51.
 - [17] YU H, LI H P, ZHANG J, et al. Before and after erythromycin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lower respiratory tract changes in alginate content [J]. Shanghai Med J(上海医学), 2003, 26(3): 183-185.
 - [18] LI H P, YU H, HE G J, et al. Erythromycin for lower respiratory tract infection in strains of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [J]. Chin J Infect Chemother (中国抗感染化疗杂志), 2003, 3(4): 206-210.
 - [19] TAKEEKA K, LCHIMIYA T, YAMASAKI T, et al. The *in vitro* effect of macrolides on the interaction of human polymorphonuclear leukocytes with *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm [J]. Chemotherapy, 1998, 44(3): 190-197.
 - [20] TAMAOKI J. The effects of macrolides on inflammatory cells [J]. Chest, 2004, 125(2 Suppl): 41S-50S; quiz 51S.
 - [21] MIZUKANE R, HIRAKATA Y, ZAKU M, et al. Comparative *in vitro* exoenzyme-suppressing activities of azithromycin and other macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38(3): 528-533.
 - [22] HIRAKATA Y, KAKU M, MIZUKANE R, et al. Potential effects of erythromycin on host defense systems and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992, 36(9): 1922-1927.
 - [23] LAMONT I L, BEARE P A, OCHSNER U, et al. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(10): 7072-7077.
 - [24] FINCH R G, PRITCHARD D I, BYCROFT B W, et al. Quorum sensing: a novel target for anti-infective therapy [J]. J Antimicrob Chemother, 1998, 42(5): 569-571.
 - [25] DOCKERY J D, KEENER J P. A mathematical model for quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Bull Math Biol, 2001, 63(1): 95-116.
 - [26] LESPRIT P, FAURISSON F, JOIN-LAMBERT O, et al. Role of the quorum-sensing system in experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(11): 1478-1482.
 - [27] TATEDA K, COMTE R, PECHERE J C, et al. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(6): 1930-1933.
 - [28] TELFORD G, WHEELER D, WILLIAMS P, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity [J]. Infect Immun, 1998, 66(1): 36-42.
 - [29] DUAN K, DAMMEL C, STEIN J, et al. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication [J]. Mol Microbiol, 2003, 50(5): 1477-1491.
 - [30] FAN J X, CHAI W W, QI Z M. Effect of azithromycin on lung infection induced by *Pseudomonas aeruginosa* in an experimental murine model [J]. Med Recapit (医学综述), 2008, 14(7): 1110-1111.
 - [31] TANG Y P, CHEN P. Clinical study of roxithromycin combination with sensitive antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms disease [J]. West China Med J (华西医学), 2008, 23(4): 801-803.
 - [32] WAN Z Y, YU J L. Research progress in the mechanism of macrolides in the treatment [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2008, 33(5): 265-268.