

氨基糖苷类抗生素的现状与展望

张随楷(浙江康乐药业有限公司研究所,浙江 温州 325000)

氨基糖苷类抗生素的历史起源于1944年链霉素的发现,至今发展经历了半个多世纪,经各种途径得到的化合物更是多达300余种,其中有临床意义的70多种,已经临床应用的有50多种,还有一些品种应用于农业生产。该类抗生素具有(1)水溶性好;(2)属静止期杀菌剂,杀菌完全,与繁殖期杀菌剂如 β -内酰胺类联用具有协同作用,是处理严重感染、免疫缺陷者等感染联合用药常用品种;(3)吸收排泄良好;(4)不要作皮肤过敏实验,用药方便;(5)属药物浓度依赖性抗生素,对不少致病菌有抗生素后效应(PAE);(6)对耐药菌感染有效;(7)价格相对头孢菌素等低廉等特点,因此自问世以来一直是临床上重要的抗感染药物,尤其是治疗革兰氏阴性菌感染和结核病不可缺少的重要药物。但由于该类抗生素存在着不同程度的耳、肾毒性及长期、广泛地使用,菌类对其产生不同程度的耐药性,限制它们在临床上发挥更大的作用。因此研制安全性更高、不良反应小,尤其是耳毒性更小,并能控制严重耐药菌感染的有效药物是当前氨基糖苷类抗生素研究发展的方向。近年来人们对该类抗生素进行了广泛的基础与临床研究,特别是对其杀菌机制、耐药机制的研究,不仅使我们对这类抗生素有了更深入的了解,而且这些研究结果,为我们临床合理用药、设计新的抗耐药菌的氨基糖苷类抗生素提供了理论基础。

1 氨基糖苷类抗生素的作用机制

氨基糖苷类抗生素的共同特点是都含有一个由6种成份构成的苷配基环,在环上连接着许多含氨基与不含氨基的糖。有研究认为,它们对30s亚基的高亲和力最终导致了不可逆的结合,从而导致读码错误抑制细菌蛋白合成;也有研究认为该类抗生素与核糖体的结合会加快其细菌内的转运,从而导致膜完整性破裂、通透性丧失,最终死亡^[1]。

2 氨基糖苷类抗生素的耳毒性与肾毒性

所有的氨基糖苷类抗生素都会造成听力及前庭的损伤,导致听觉器官的毒性反应。耳毒性的表现包括耳鸣、各种程

度的听力损失、不可逆的耳聋。前庭的毒性包括恶性、呕吐、眩晕、头昏、步态不稳、眼球震颤。

所有的氨基糖苷类抗生素都有造成不可逆耳毒性的可能,这些抗生素先对毛细胞,然后对神经上皮的支持细胞和前庭的分泌组织以及耳蜗的结构,细胞的损伤与药物在内外淋巴积聚以及清除缓慢有关。

对氨基糖苷类抗生素耳毒性机制的研究,一度得到公认的有代谢抑制、钙离子紊乱、内淋巴药物蓄积、溶酶体破坏引起细胞自溶等学说。但最近又提出两种新的观点,一种观点提出的基础是氨基糖苷类抗生素的结合位点及耳中毒后引起毛细胞的形态学变化。基于对这两方面的研究,认为这类抗生素是与内耳感觉细胞的磷脂类结合而发挥不良反应,破坏感觉细胞表面的多糖蛋白复合物,从而影响毛细胞换能。氨基糖苷类抗生素对耳离子通道的阻断是电压依赖性的,是急性的、可逆的、但当被代谢后便会不可逆地阻断细胞内的信号传导途径(PIP_2),导致外毛细胞的死亡。另一种观点是基于分子遗传学的研究,认为氨基糖苷类抗生素导致内耳毛细胞线粒体功能失常,使线粒体受氧化损伤出现ATP减少,而ATP的减少使细胞内出现能源危机,并同时也导致耳蜗内离子浓度失衡,这些变化发展到一定程度均可导致毛细胞死亡^[2]。分子遗传学观点还提出,线粒体基因组突变与氨基糖苷类抗生素的耳毒性有密切关系。无论是家族性的氨基糖苷类抗生素高敏感特性所出现的耳聋毒性,还是散发的氨基糖苷类抗生素耳毒性患者,均在12s rRNA1555位点上的A $\rightarrow$ G点突变(1555G突变)。而氨基糖苷类致聋患者(AAID)具有家族聚集现象,且多发生于氨基糖苷类抗生素易感患者,因而检出mtDNA1555G突变者(AASI)加以干预,使临床医师在一定程度上预知哪些患者在应用氨基糖苷类抗生素时有更大的耳聋危险^[3,4,5]。

氨基糖苷类抗生素在午夜至清早7:30(休息时间)的血药浓度明显高于其它时间段,休息时间给药时肾毒性的发生

率更为显著,因为此间具有较低的肌酐清除率和较高的谷浓度。这可能是在此期间肾脏吸收增加导致服药后较高的AUC而使肾毒性发生率增加^[6]。每天静脉使用一次氨基糖苷类抗生素可大大减少潜在的肾毒性反应。氨基糖苷类抗生素诱发的肾小管功能不全,可发生于每日多次静脉给药的2周左右。使用该类药物治疗不超过2周,且每日用药1次,潜在的肾不良反应就会降至最低^[7]。

3 氨基糖苷类抗生素的耐药机制

细菌耐药性可分为特异性耐药和非特异性耐药,特异性耐药的主要机制有:(1)酶对抗生素的修饰与灭活;(2)药物作用靶点发生突变,产生新的靶点和作用靶点的过度表达。而非特异性耐药的机制常与细菌细胞膜的结构和功能的改变有关^[8]:(1)膜对抗生素的通透性下降,药物摄入减少;(2)膜对抗生素的主动外排,药物排出增加;(3)细菌形成生物被膜(biofilm)。

氨基糖苷类抗生素的主要耐药机制为:(1)核糖体结合点的变化;(2)细菌对药物的摄入及积累的减少;(3)细菌产生使抗生素失活的钝化酶。

3.1 核糖体结合点的变化

尽管氨基糖苷类抗生素的结合点在核糖体RNA(rRNA)上,一般来说,这一靶位的改变并不会导致耐药性,这主要是由于rRNA是蛋白质合成的功能中枢,这一功能是经过周密保护的。但rRNA特定的突变却是造成链霉素耐药性的一个原因^[9,10]。

3.2 细菌对药物的摄入及积累的减少

药物摄入与积累的降低常见于非发酵革兰氏阴性杆菌,可能是由于细胞膜的不渗透作用造成的。一般的好氧革兰氏阴性菌也具有适应性耐药现象,在氨基糖苷类抗生素作用下,细菌厌氧呼吸途径的基因调节膜蛋白的变化可能是这一现象的原因^[11],因其为细菌固有特性,影响到所有氨基糖苷类抗生素,导致中度耐药性,这在临床上非常重要。

3.3 细菌产生使抗生素失活的钝化酶^[12]

氨基糖苷类抗生素钝化酶作用于特定的氨基或羟基,从而使氨基糖苷类抗生素发生钝化,导致被钝化的抗生素很难与核糖体结合,使加速药物摄入的能量依赖阶段二(EDP-II)不能进行,从而导致高度耐药。这些酶分为3类:氨基糖苷磷酸转移酶(APH);氨基糖苷核苷转移酶(ANT);氨基糖苷乙酰转移酶(AAC)。

3.3.1 氨基糖苷磷酸转移酶(APH)

是催化特定氨基糖苷羟基基团的ATP-依赖型磷酸催化酶,作用于典型的氨基糖苷类抗生素的3-,2-,及6-,位,大多数APH催化卡那霉素3-,羟基的修饰,大多有关这一领域的研究集中于这类酶,APH(3-)可使卡那霉素、阿米卡星、异帕米星等具有3-,羟基的抗生素失活。

3.3.2 氨基糖苷核苷转移酶(ANT)

是催化氨基糖苷类抗生素上特定羟基的核苷转移酶,作用于氨基糖苷类抗生素的4'-和2"-位。

3.3.3 氨基糖苷乙酰转移酶(AAC)

是一类乙酰辅酶A依赖型乙酰转移酶,作用于氨基糖苷类抗生素的3'-和2"-位,主要修饰氨基糖苷的氨基基团,但其双功能酶AAC(1')-APH(2")也催化O-乙酰转移。

在过去的20年中,革兰氏阴性菌中的氨基糖苷修饰酶的流行趋势发生了很多变化,在肠道细菌中,1983-1985年最常见的为庆大霉素修饰酶[AAC(3)-I, AAC(3)-II]及氨基糖苷转移酶[ANT(2")],最近阿米卡星修饰酶AAC(6,)-I则变得更为常见,其有时单独出现,有时与以上3种酶复合出现,而异帕米星是常规临床上唯一能抑制该复合酶活性的氨基糖苷类抗生素。近期大量调查结果表明,对于肠道细菌,氨基糖苷类抗生素的用药模式与耐药率无关,耐药率与氨基糖苷类抗生素的应用总量相关,而耐药机制与氨基糖苷类抗生素的应用种类相关。

4 降低氨基糖苷类抗生素毒性及控制其耐药性的策略

随着对氨基糖苷类抗生素的毒性及耐药性,特别是对其钝化酶的持续、深入研究,不仅使我们清楚地了解其作用机制、生理生化特点,而且给我们合理用药、减少耐药菌提供了坚实的理论基础,使抑制耐药酶、开发新的氨基糖苷类抗生素及其新制剂成为可能。

4.1 新菌种、新抗生素组分的筛选

氨基糖苷类抗生素的早期筛选系立足于从土壤微生物代谢物中寻找,以后又以它们为母核进行化学结构改造、生物转化及突变生物合成以得到新化合物。随着抗生素生物合成的遗传学和生物化学知识的积累及方法学的发展,寻找新抗的思维方式进行拓展。除突变生物合成,通过杂交向抗生素产生菌导入新的遗传信息和DNA片段改变抗生素产生菌的遗传结构等方法外,采用诱变方法诱导抗生素生物合成途径中某些酶的基因发生突变,以获得代谢途径中某些更有效的抗生素。特别对那些生物合成代谢途径已研究的较清楚的抗生素,可以利用筛选阻断型突变株,使其抗生素代谢途径中某一步发生阻断或原来未表达的某些与抗生素合成途径有关的基因获得表达(也即控制这步生物合成的酶被激活了)。由此可获得与生物合成途径有关的新抗生素。也有学者提出采用对核糖体的定向改变[核糖体工程(ribosome engineering)]的方法,建立一种推理性的筛选模型,这可能是继DNA重组技术后又一具有潜力的分子育种技术^[10]。我国学者通过这些思路和方法筛选获得了多个新抗生素产生菌,,特别是成功地筛选得到产生庆大霉素C_{1a}单组分的阻断株,然后以该单组分抗生素为母核进行化学修饰开发成功依替米星^[13]。

4.2 对氨基糖苷类抗生素进行结构改造^[12]

通过结构改造获得对已知耐药菌具有活性、不良反应较低的新半合成氨基糖苷类抗生素。它运用传统的构效关系,抗生素的作用原理,耐药菌的作用机制、位点,及药理学方面已有的知识,对现有化合物进行结构改造,使一种或几种耐药酶失活,这是到目前为止获得对氨基糖苷修饰酶产生菌具有抑制活性的氨基糖苷衍生物最成功的手段。

4.2.1 1-N-取代衍生物

其基础确立于 20 世纪 60 年代,自然产生的 burirosins 由于在 1-N-位具有 1 个氨酰链,不仅能耐受许多钝化酶,而且保持了未取代分子对敏感菌的体内活性,于是引导半合成获得了阿米卡星[[1-N-(S)-4-氨基-2-羟丁酰]-卡那霉素 A]、异帕米星[[1-N-(S)-4-氨基-2-羟丙酰]-庆大霉素 B]及阿贝卡星[1-N-(S)-4-氨基-2-羟丁酰-3,,4,-2 脱氧卡那霉素 B],成功地应用于临床。在这些化合物中,1-N-位上不再为离子化的原子,其氨基功能团位于侧链末端,不仅能通过空间位阻防止作用于 2"-位的 ANT(2")-I,而且能防止作用于 3'-位的 AAC(3)。特别地,阿米卡星及异帕米星还可以防止一些作用于 3'-位的钝化酶,它们即获得了对敏感菌的活性,同时又获得了比预期更广泛的防护作用。

4.2.2 1-N-烷基衍生物

在 1-N-位上引入烷基取代物,使氨基糖苷类抗生素免受 ANT(2")及 AAC(3)钝化酶的作用,同时在 1-N 基团上保留第 2 个离子化氨基,这类化合物比 1-N-酰化衍生物更全面地保留了体内抗菌活性,如奈替米星(1-N-乙基-西索米星)、依替米星(1-N-乙基-庆大霉素 C_{1a})。由于它们在 3'-及 4'-位没有羟基基团,所以耐受 APH(3')及 ANT(4')。

4.2.3 3'4'-2 脱氧衍生物

如地贝卡星(3'4'-2 脱氧卡那霉素 B),可耐受 APH(3')及 ANT(4')。

4.2.4 手性衍生物

通过获得化合物的对映体,使其立体结构发生颠倒,从而使作为酶靶位的功能团对相应酶不敏感。如 5-表西索米星,可耐受 ANT(2")、AAC(2,)及大多数 AAC(3)。

4.3 钝化酶抑制剂及主动外排耐药系统的抑制剂^[12]

钝化酶抑制剂是一种有效防止耐药菌的方法。其策略主要有以下几种:(1)改造作用底物,使酶的催化常数大大降低,从而抑制酶活性;(2)开发自杀性底物,可很强烈地与钝化酶结合,从而竞争性抑制钝化酶对抗生素的作用;(3)根据一些钝化酶与原核生物蛋白激酶相近,可利用蛋白激酶抑制剂筛选氨基糖苷钝化酶抑制剂;(4)根据钝化酶的作用位点来研究特异性抑制剂。

主动外排耐药系统广泛存在于病原微生物中,而且常介导多重耐药性,因此,该方面抑制剂的研究也是解决抗生素多重耐药性的有力措施之一。如利血平能对抗淋病奈瑟球菌对阿米卡星等抗生素的多重耐药性。

4.4 氨基糖苷类抗生素新剂型的开发

通过对氨基糖苷类新剂型、新载体的研究,改变用药方式,以提高药物浓度的靶向性,减少药物的不良反应。如用脂质体、纳米球、微球等作为抗生素载体,可使药物靶向性增强,选择性分布于感染病灶,降低药物全身不良反应。利用脂质体与生物膜亲合的特性,将水溶性抗生素包封成脂质体,改善其对生物膜的同透性,提高体内药物浓度,因而可减少用药剂量,也相应降低了毒性;同时因药物包封在脂质体内,有可能使一些钝化酶不能渗入而使抗生素免受钝化。如阿米卡星脂质体经小鼠体内分布实验表明其在靶部位——

肺部的药物浓度明显提高,而在毒性部位——肾脏的药物浓度明显降低,这是因为脾、肝、肺等单核巨噬细胞含量丰富易摄取脂质体,而脂质体不能通过肾小球超滤膜,不能达到肾小管、集合管等部位,故可提高疗效,降低不良反应。链霉素微球(MS)给予昆明种小鼠,用 γ 闪烁计数器测放射性显示,药物在肺组织中分布最多,浓度最高,占体内组织分布百分率的 81.39%,而心、脾、肝、肾浓度低,这与硫酸链霉素比较差异显著,说明微球的肺靶向性很好。这是因为粒径 7~12 μ m 的颗粒可机械性滤阻于肺部,从而达到局部靶向作用。阿米卡星纳米球用于新西兰白兔的眼部,与对照组相比角膜中药物浓度明显增加,且前房液中浓度是对照组的 3 倍以上^[14]。在国内已由中国沈阳药科大学开发成功庆大霉素脂质体、阿米卡星脂质体等。

4.5 提高氨基糖苷类抗生素分析方法及有效控制杂质含量

氨基糖苷类抗生素的含量测定方法大多采用微生物法。由于微生物法测定的是各种活性组分的总活性,并不能准确地反映其内在的质量,所以国内外药典对某些单一组分氨基糖苷类抗生素采用 HPLC 法和 GC 法进行主成分的含量测定,由于该类抗生素的结构中不含紫外吸收基团,因此多国药典都采用柱前衍生化的 HPLC 法测定含量,如用 2,4,6,-三硝基苯磺酸(TNBS)、2,4-二硝基氟苯(DNFB)、邻苯二甲醛等^[15]。但由于衍生化反应受反应温度、反应时间及衍生化试剂的质量等因素的影响,因此柱前衍生化 HPLC 法很难对该类抗生素的质量进行全面准确的评价。

近年来出现的蒸发光散射检测器(ELSD)由于其响应值不依赖被测物质的光学性质,任何挥发性低于流动相的样品均能被检测,而且物理性质相似的物质其响应因之基本一致,灵敏度是示差折光检测器的 2~10 倍,现已逐渐成为目前常用的通用型检测器。最近国内采用 HPLC-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)^[16,17]对单组分的小诺霉素、阿米卡星、奈替米星、依替米星和多组分的庆大霉素等及其它它们的制剂进行了质量研究,发现了不少未知杂质,取得了一定的成果。由此,蒸发光散射检测器的应用已为全面分析无紫外吸收的氨基糖苷类抗生素的质量提供了一种新的手段。通过严格的质量控制方法来防止因杂质存在而引起的不良反应,从而保证药物的安全有效。

4.6 合理的临床用药

如前所述,氨基糖苷耐药菌与抗生素用量、种类、用药方法有着密切的因果关系,因此,合理的临床用药也是减少细菌耐药、提高氨基糖苷类抗生素使用效率的重要因素。如(1)建立对临床上感染分离菌的鉴别方法,用计算机辅助或数据法则,选择合适的抗生素进行治疗;(2)根据细菌耐药机制,进行合理用药,严格控制医院处方。如在连续用药时,使用高剂量、长间隔、血药浓度监测和联合用药;(3)合理的给药时间^[6];(4)避免临床用药配伍禁忌。

4.7 杜绝用抗生素作为动物饲料添加剂的做法^[18]

人们常用抗生素喂养家禽家畜以防止感染发生,然而几乎没有证据证明用抗生素喂养家禽家畜能减少禽畜感染的

发生率,但却已证明这种做法可造成对抗生素药物的严重耐药性。正是由于这一原因,由动物产品引发的抗生素耐药性最终可酿成全球性抗生素耐药性问题。因此,杜绝用抗生素作为动物饲料添加剂的做法,以铲除外源性抗生素耐药性发生和传播的潜在危险。

5 氨基糖苷类抗生素的市场分析

近年来,世界抗生素市场的平均年增长率约为8%,1998年世界抗感染药物市场销售额为400亿美元,约占全球治疗性药物市场额的10%。虽然氨基糖苷类抗生素的产量和用量不如 β -内酰胺类、氟喹诺酮类等那么大,但由于其独特的化学性质和药理特点,仍是临床上治疗感染不可取代的药物,故其用量比较稳定。且近几年来,我国氨基糖苷类抗生素新产品有了长足的发展,出口市场也不断地启动。如核糖霉素产量的大幅上升;奈替米星从无到列入2000年版中国药典;依替米星的开发等。如前所述,种种寻求新品种的趋势表达了人们对氨基糖苷类抗生素功效的一种期待。加入WTO后,以仿制国外药物为主的国内医药产业面临着严峻的挑战。加快医药产业的技术创新,开发具有自主知识产权的创新药物,中药,非专利重点品种和药物新制剂已是当务之急。加快开发一种高效、低毒、抗耐药菌的氨基糖苷类抗生素新品种,填补国内外空白,为该类药物创造更为广阔的应用前景,成为当今世界同类药物的换代品种,那么其社会效益将是深远的,市场前景将是十分广阔的。

随着国家医疗体制改革和医疗社会保险制度的实施,以及加入WTO后,国家加大对医药产业的投入,制定相关政策来保护和促进国产新药的开发。国家对新药政策方面的倾斜将是可预期的。1997年我国自行研究开发成功的新药依替米星已列入国家基本药物,相信今后有更多的国产新药会尽快地进入到公费用药范围,这必将对氨基糖苷类抗生素进一步开发及上市带来勃勃的生机。

6 结束语

在过去几十年中,随着对氨基糖苷类抗生素耐药机制、钝化酶作用机制的研究以及分析方法的不断提高,使我们具备了许多知识,从而成为我们合理用药、有效地设计钝化酶抑制剂、获得新的高效、低毒、抗耐药菌的氨基糖苷类抗生素新衍生物的基础,从而使氨基糖苷类抗生素在临床应用中发挥出更大的作用,氨基糖苷类抗生素仍将具有强大的生命力。

参考文献

[1] Ambre J *et al.* American Medical Association, 1993.

- [2] Ernst A *et al.* Brain Research 636:153, 1994.
- [3] 张丽珊,陆明华,黄鹰等. 线粒体 DNA 突变与氨基糖苷类抗生素致聋的关系[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(3):138.
- [4] 傅四清,陈观明. 线粒体 DNA 突变与氨基糖苷类抗生素致聋[J]. 遗传, 2000, 122(1).
- [5] 袁慧军,姜泗长,杨伟炎,等. 氨基糖苷类抗生素致聋患者线粒体 DNA1555G 点突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(3):138.
- [6] Jon M, *et al.* Clin Pharmacol Ther, 1997, 62:106.
- [7] 胡发明. 抗生素的不良反应[J]. 国外医药合成药·生化药·制剂分册, 2002, (23)5:312.
- [8] 王鲁燕,陈代杰. 细菌耐药性机制的研究与新药开发[J]. 国外医药合成药·生化药·制剂分册, 2001, (22)5:266.
- [9] Honore N, Marchal G, Cole ST. Novel mutation in 16SRNA associated with streptomycin dependence in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39: 769.
- [10] 李继安,陈代杰. 细菌耐药性机制的研究与新药开发[J]. 国外医药合成药·生化药·制剂分册, 2001, (22)3:132.
- [11] Karlowsky JA, Hoban DJ, Zelenitsky SA, *et al.* Altered denA and anr gene expression in aminoglycoside adaptive resistance in Pseudomonas aeruginosa[J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 40:371.
- [12] 沈依群,赵敏,等. 氨基糖苷类抗生素的耐药机制及控制耐药性的策略[J]. 国外医药抗生素分册, 2002, (23)3:118.
- [13] 赵敏,范瑾. 氨基糖苷类抗生素的筛选思路与依替米星的开发[J]. 中国抗生素杂志, 2000, (25)3:229.
- [14] 清华紫光医药网-医药快讯-抗菌药物新剂型研究开发概况.
- [15] 中国药典 2000 年版二部, 硫酸庆大霉素.
- [16] 王明娟,胡昌勤,金少红. 采用 HPLC-ELSD 法分析小诺霉素中的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2002, 23(3):205.
- [17] 王明娟,胡昌勤,金少鸿. 氨基糖苷类抗生素在蒸发光散射检测器中响应因子的一致性考察[J]. 药学报, 2002, 37(3): 204.
- [18] 钱秀萍,陈代杰. 细菌耐药性机制的研究与新药开发[J]. 国外医药合成药·生化药·制剂分册, 2001, (22)6:326.

收稿日期:2003-05-30