

微生物来源的抗 VRE 次生代谢产物及其作用机制研究进展

申晓春

大理大学药学院，贵州遵义，671000；

摘要：细菌生物膜的形成是病原菌耐药性发展的一个关键因素。耐万古霉素肠球菌（Vancomycin-resistant *Enterococci*, VRE）目前已成为临床病原菌感染较为严重的耐药菌，为应对这一难题，开发新型抗生物膜策略势在必行。

关键词：生物膜；VRE；作用机制

DOI:10.69979/3029-2808.25.01.038

引言

自 20 世纪 80 年代首次报道耐万古霉素肠球菌以来，流行病学研究已经证明了 VRE 相关感染和人类医学中持续定植对健康和经济的严重影响。因此肠球菌对糖肽类耐药和多药耐药值得关注 and 持续监测。

VRE 包括耐万古霉素粪肠球菌和屎肠球菌，是严重的多重耐药菌及持续定植病原菌，具重要医学和公共卫生意义^[1]。*E. faecalis* 作为机会致病菌，适应能力强，可进化传播抗生素耐药决定因素。其基因操纵子遗传变异性高且持续进化，兼具多种内在耐药机制与获得新耐药机制的能力。这种基因多样性为治疗带来挑战，也增加了临床管理难度。生物膜为 *E. faecalis* 持续感染提供环境稳定与保护，其通过自身及跨物种染色体外 DNA 交换，借供受体菌株接近增强遗传物质传递，使生

物膜成为感染部位持续定植的关键。

1 生物膜形成过程

生物膜是具有三维结构的细菌群落，附着于物体表面并被多糖、水合基质、蛋白质和 DNA 构成的网络包裹，通过抵御宿主免疫系统保护细菌。其形成需经历初始附着、不可逆附着、菌落聚集、成熟和脱落扩散等阶段^[2]。

浮游细菌通过菌毛、鞭毛等结构与表面发生物理吸附，形成弱附着。随后分泌胞外聚合物（EPS），通过化学键或强物理连接形成不可逆黏附。微生物利用营养生长繁殖，EPS 粘连促使微菌落融合，形成成熟三维结构，其间信号传递增强细菌抗侵袭能力。成熟生物膜因营养缺乏或细胞死亡脱落，扩散后在新位点循环形成生物膜，成为宿主体内持续性感染的重要原因。

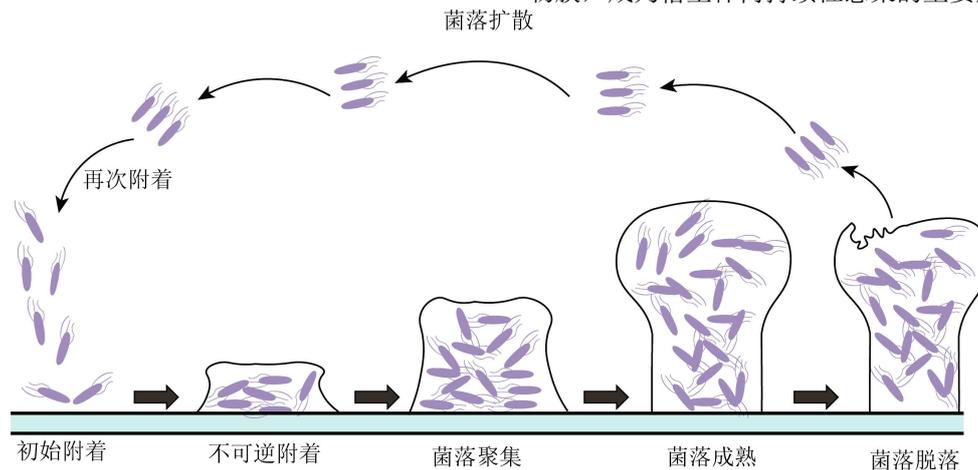


图 1 细菌生物膜的生长过程

2 生物膜相关感染

细菌生物膜（BBF）是附着于细菌表面的复杂群落，嵌入自身分泌的聚合物基质中。与浮游细菌相比，BBF 显著增强对抗菌药物的抗性和对宿主免疫系统的逃避

能力，引发顽固性、复发性感染。临床数据显示，BBF 相关感染是持续性难治疗感染的主要来源，占人体微生物感染的 80%，症状常缓慢出现且持续数年甚至终生。

BBF 相关感染分为留置医疗器械相关感染和天然生物膜感染。前者由细菌通过留置器械进入人体器官或

组织引发；后者为无菌部位受细菌侵袭形成的慢性感染。这类感染可由单一或多种菌种引起，菌种间相互作用增强感染持久性。常见病原体包括革兰氏阳性菌，氨基糖苷类抗生素可诱导 BBF 生成，其多种特异性机制导致生物膜高水平抗生素抗性，推动 MRSA、VRE 及铜绿假单胞菌等超级细菌的发展。

3 VRE 耐药机制

肠球菌对万古霉素的耐药机制主要涉及细胞壁合成中关键底物的修饰，耐药菌通过合成低亲和力粘肽前体（D-Ala-D-Lac 或 D-Ala-D-Ser）取代正常的 D-Ala-D-Ala 末端，减弱万古霉素与靶点的氢键作用。目前已鉴定出 8 种获得性糖肽类耐药基因型，VanA 和 VanB 型是临床最常见类型，分离率达 70%，表现出高水平耐药性；VanC 型基因则赋予鸪鸡肠球菌等菌株内在低水平耐药性，在临床分离株中较为常见。

VanA 基因簇位于转座子 Tn1546 上，通过协同感知万古霉素信号激活耐药基因表达，其中 VanY 蛋白破坏肽聚糖末端结合位点。VanB 型与 VanA 型功能结构相似，均编码 D-ala-D-Lac 连接酶，但 VanB 的组氨酸激酶仅对万古霉素响应^[4-5]，而 VanA 的 VanS 蛋白可被万古霉素和替考拉宁诱导。

VanC 型耐药基因为染色体固有成分，编码 D-Ala-D-Ser 削弱药物结合，且无法在菌株间传播。VanD、VanE 型因染色体定位限制传播，VanG 型具独特基因簇结构，VanM 型存在于含转座酶的遗传元件中。深入研究耐药机制是抵抗感染的关键。

4 VRE 毒力基因

4.1 fsr 双组分信号传导因子

在 *E. faecalis* 中，fsr 双组分信号传导系统是一个明确定义的群体感应系统，其通过明胶酶的产生调节生物膜的形成。明胶酶（gelE）和丝氨酸酶（SprE）两者均存在于 *E. faecalis* 表面蛋白释放酶^[6]，三个 Agr 样基因（fsrA, fsrB 和 fsrC,）作为 *E. faecalis* 双组分信号传导系统中的调节器被发现与金葡菌 Agr 位点辅助基因调节系统的反应调节因子同源。其中 fsrA 和 fsrC 分别类似于细菌双组分系统的响应调节剂和传感器，fsrC 与葡萄球菌的 AgrC 具有最大的相似性，fsrA 与其它应答调节剂的相似性高于 AgrA。fsr 基因是自我调节的，插入 fsrC 使得上游 fsrB 表达受阻，导致 fsrA 的中断也终止了 fsrB 和 fsrA 的表达。

明胶酶生物合成信息素通过激活细胞膜上的 FsrC，诱导其发生磷酸化，然后将磷酸基团转移到 fsrA，激活

后的 fsrA 和 fsrC 发生相同的变化诱导 gelE 特异性表达。fsrA、fsrC 和 gelE 基因受到 Fsr 群体感应系统的正调控，gelE 表达上调促进生物膜的形成。fsr 双组分信号传导系统中不管哪一个调节器发生突变，均会引起细菌表面调节因子的改变。

4.2 表面蛋白

胞外多糖相关的 esp 基因位于肠球菌染色体上，其编码的 ESP 蛋白是肠球菌表面分子量较大的独特蛋白。关于 esp 基因与 *E. faecalis* 生物膜形成的关系存在争议：早期研究认为 esp 参与生物膜形成，但生物膜对抗生素的耐药性与生物量无关，推测与高度耐药的存留菌有关；后续傅春燕等研究推翻这一结论，指出通过抑制氧化磷酸化、物质转运及 esp 基因表达，降低细菌表面蛋白合成和细胞疏水性，可在粘附初期有效抑制生物膜形成。单独抑制 esp 表达可能无法完全阻断生物膜初始形成，需与其他相关因子协同作用。Esp 的功能可能由 N - 末端部分介导，该区域表达足以形成野生型生物膜，且其可溶性 N - 末端可抑制野生型细胞粘附。

4.3 多糖

研究表明，与细胞多糖相关的肠球菌多糖抗原基因 epa，可能编码一个假定的糖基转移酶，参与细菌对聚苯乙烯的初始粘附过程。此外，生物膜成熟可能会受到干扰，因为相差显微镜显示细菌密度较低，聚苯乙烯上看不到小菌落。Epa 存在于肠球菌表面，参与肠球菌对宿主细胞的黏附过程，阻碍补体系统的激活和吞噬细胞的识别，使肠球菌在宿主体内更容易存活和繁殖。核苷酸糖是 epa 合成的前体物质，由相应的核苷酸糖合成酶催化生成，可以抑制 UDP-葡萄糖合成酶，减少 UDP-葡萄糖等核苷酸糖的生成，使 epa 合成缺乏原料达到抑制作用。糖基转移酶在 epa 合成中起着关键作用，抑制糖基转移酶活性可阻断 epa 合成。

4.4 细胞外

红细胞外作为 BBF 基质的关键组分，主要由环状常染色体或噬菌体 DNA 构成，在生物膜的结构和功能中扮演着不可或缺的角色。eDNA 的释放过程涉及多种机制，其中细胞自溶是主要途径之一，这一过程受到群体感应系统的精确调控，表明 eDNA 的产生与细菌群体行为密切相关。eDNA 在 BBF 形成的初始阶段发挥关键作用，应用 DNase 可显著抑制生物膜的形成。此外，eDNA 通过螯合阳离子的方式增强了生物膜的耐药性，这一特性使得 BBF 对多种抗生素的敏感性降低，进一步凸显了 eDNA 在

BBF 抗性机制中的重要性。这些发现表明, eDNA 在 BBF 的形成和耐药性机制中具有多重重要作用, 早期针对 eDNA 的干预措施可能成为更有效抑制 BBF 形成的新策略。

4.5 菌毛 (Pili)

菌毛作为重要的表面结构, 在病原菌的黏附过程和生物膜形成中发挥着关键作用。在肠球菌属中, *E. faecalis* 和 *E. faecium* 均携带特定的 Pili 基因簇, 这些基因簇编码着表面蛋白和转肽酶等重要功能蛋白。特别值得关注的是, *E. faecalis* 的 Pili 系统主要分为两类: 一类是与心内膜炎和生物膜形成相关的 Ebp 菌毛, 另一类则是肠球菌生物被膜增强因子 (biofilm enhancer in Enterococci, Bee Locus)。Ebp 菌毛不仅参与病原菌的初始黏附过程, 还在生物膜形成中发挥重要作用, 相比之下, Bee 菌毛虽然出现频率较低, 但其独特的基因组成仍值得关注。它由 3 个结构基因 (*bee-1*、*bee-2*、*bee-3*) 和 2 个分选酶基因 (*srt-1*、*srt-2*) 构成, 其中结构基因的 C 末端存在特征性的 LPXTG 基序, 这一结构特征暗示其可能参与细胞壁的锚定功能。

5 微生物来源的次生代谢产物抗 VRE 作用机制研究

在微生物的生命活动中, 复杂的生化反应生成多种具有生物活性的化合物。抗生素作为微生物重要的次生代谢物, 可来自细菌 (如放线菌、芽孢杆菌、假单胞菌) 或真菌, 能抑制特定微生物增殖, 破坏 VRE 细胞膜或细胞壁结构, 导致细胞死亡。

多种微生物来源的次生代谢产物展现出抗 VRE 活性: 细菌素 *ursoricin* 对肠球菌及 VRE 生物膜有清除作用, 其净电荷和色氨酸序列影响抗菌活性; 抗菌肽与氯霉素联合使用可增强对 VRE 的抑制效果; 达托霉素通过结合细胞膜引发去极化, 抑制细胞合成导致细菌死亡; 抗菌肽 YS12 能抑制约 80% 的生物膜形成; 萘醌类化合物 *sealutomicins A-D* 对耐多药革兰氏阳性菌 (包括 VRE) 有较强活性; 大环类抗生素对 VREF 的抗菌活性高于临床用药。

新型阳离子肽 *Brevinin2 HYba5* 通过靶向带负电荷的微生物膜, 破坏菌膜结构; 含硫次级代谢产物硫代马里醇 A-G 通过抑制异亮氨酰 - tRNA 合成酶发挥广谱抗菌作用; 共培养技术从真菌和海洋细菌中分离的 *pestalone* 对 VRE 有效, 显示跨物种诱导的潜力; 法霉素类聚酮化合物通过抑制 FabF 酶影响脂肪酸合成, 强效抑制 VRE。此外, *arsR* 和 *arsD* 基因对 VRE 生物膜

形成的调控机制, 为抑制生物膜提供了新靶点。

6 结论与展望

目前我们对革兰氏阳性菌万古霉素耐药性的分子过程和遗传学的理解取得了重大突破, 尽管如此, 仍然不知道抗性基因来自何处。产生糖肽的微生物的耐药性的潜在来源是在这些物种的次生代谢产物中存在编码 *vanA*、*vanH*、*vanR*、*vanS* 和 *vanX* 同源物的基因。

随着微生物资源勘探范围的扩大, 如对深海、极地、土壤深层等特殊环境微生物的研究, 以及采用新的分离培养技术和筛选方法, 有望发现更多具有抗 VRE 活性的新型次生代谢产物。此外, 对已知微生物进行基因组挖掘, 利用生物信息学技术预测和激活沉默的次生代谢基因簇, 也可能获得结构新颖、作用机制独特的抗 VRE 物质。同时借助蛋白质组学、转录组学和代谢组学等技术, 全面解析其作用网络和调控机制。

参考文献

- [1] Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health[J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(5): 590-606.
- [2] Dufour D, Leung V, Lévesque C. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance[J]. *Endod Topics*. 2010, 22(1): 2-16.
- [3] Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010, 59(3): 324-36.
- [4] 陈春辉, 徐晓刚. 肠球菌万古霉素耐药基因簇遗传特性[J]. *遗传*. 2015, 37(05): 452-457.
- [5] Sulaiman AM, Hussein SA, Husain VI. Detection of antibiotic resistance genes (CTX-M, Van A and Van B) of *Enterococcus faecalis* Isolated from children with bacteremia by RT-PCR[J]. *Arch Razi Inst*. 2023, 78(1): 73-77.
- [6] 卜倩倩, 伍勇. 粪肠球菌生物被膜相关因子的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*. 2012, 33(08): 947-951.

作者简介: 申晓春 (1997-1), 仡佬族, 女, 贵州遵义人, 大理大学药学院硕士在读, 研究方向: 微生物药理学。