

· 综述 ·

基于抗耐药性细菌感染的抗菌肽研究进展

李冰, 李博, 周长林*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 随着抗生素的发现及滥用, 耐药细菌感染已威胁到了人们的健康, 现有抗生素已不能满足临床治疗的需求。因此, 解决这一问题已迫在眉睫。本文针对耐药细菌的耐药机制及抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)这一新型广谱抗菌药物的研究进展进行了综述。

关键词 耐药细菌; 耐药机制; 抗菌肽

中图分类号 Q97; Q936 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)05-0580-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20140514

Progress on antimicrobial peptides against drug-resistant bacterial infection

LI Bing, LI Bo, ZHOU Changlin*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Drug-resistant bacteria from long term use of antibiotics have been threatened human health. The antibiotics now available cannot meet the needs for clinical treatment of drug-resistant bacteria, therefore, it has been a great challenge to find solutions to the problem. This article summarizes the resistance mechanisms of drug-resistant bacteria and reviews the development of a new broad-spectrum antibacterial agent named antimicrobial peptides (AMPs).

Key words drug-resistant bacteria; resistance mechanism; antimicrobial peptides

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. ZL2014SK0035); and the Priority Academic Program Development of Higher Education Institutions in Jiangsu (PAPD)

自 1928 年弗莱明发现青霉素以来, 人们逐渐进入控制、治疗细菌感染性疾病时代。但是, 大量广谱抗生素的使用, 加速了致病菌的进化, 使得近些年大量耐药细菌及多重耐药细菌不断的出现。细菌自发的耐药突变与抗生素的筛选及病原菌的环境适应能力, 是临床耐药细菌和多重耐药细菌产生的基础。

随着细菌耐药现象的日益严重, 新型抗菌药物的发现已迫在眉睫。抗菌肽(AMPs)有着传统抗生素无可比拟的优势, 其抗菌机制独特, 杀菌作用迅速且不易引发细菌的耐药性, 可单独或与抗生素联合使用杀伤病原体, 是一类极具潜力的抗菌药物。

1 临床细菌耐药的现状

近些年, 临床上出现了耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA)、耐万古霉素的肠球菌(vancomycin resistant *enterococci*, VRE)、超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)产生菌等多重耐药细菌株, 给临床上治疗由耐药细菌引起的感染增加了困难。特别是 2010 年英国医学期刊《柳叶刀》中提出的超级细菌(New Delhi metallo- β -lactamase-1, NDM-1), 其几乎对所有抗生素耐药, 并且可通过饮水等途径传染^[1], 这给临床治疗提出了挑战, 同

* 收稿日期 2014-06-11 * 通信作者 Tel: 025-83271323 E-mail: cl_zhou@cpu.edu.cn

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. ZL2014SK0035); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

时也对阐明细菌的耐药机制,发现新的抗菌药物,探索有效的治疗方法等方面提出了更高的要求。

2 细菌的耐药机制

由于抗生素的大量使用,出现了耐药细菌,通常表现为对一种或多种抗生素耐药。耐药细菌的出现给临床治疗增加了极大的难度,目前已引起了高度重视。如图1所示,细菌耐药机制主要分为:产生药物失活酶或钝化酶、药物作用靶点改变、细菌外排泵的主动外排作用和细菌细胞膜通透性的改变等。

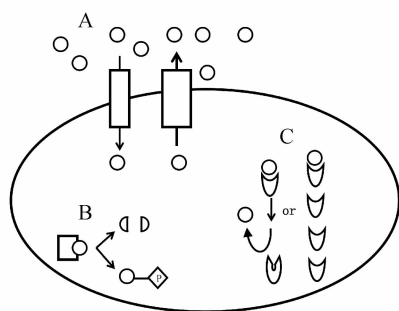


图1 抗生素耐药性机制^[2]

(A) 药物被细菌外排泵的主动外排作用或细菌细胞膜通透性的改变;(B) 药物失活酶或钝化酶作用;(C) 药物作用靶点改变

2.1 药物失活酶引起的耐药

药物失活酶的主要代表是 β -内酰胺酶, β -内酰胺酶的产生是细菌产生耐药性的主要原因。目前,其种类已达到400种之多,这种酶通过水解或者非水解的方式破坏 β -内酰胺类药物,从而使抗生素失活。表达这些酶的基因主要存在于细菌的染色体或者质粒上,其中由质粒介导的诱导表达是耐药性基因传播的主要途径。

β -内酰胺酶破坏 β -内酰胺类药物的机制主要有两种:一种是基于丝氨酸为活性位点的作用机制,其活性部位存在一个狭窄的沟状结构,在沟状结构的底部是一个氧阴离子袋。 β -内酰胺类药物具有 β -内酰胺环,当环上的羰基碳与 β -内酰胺酶活性部位的丝氨酸结合时发生不可逆反应,使 β -内酰胺环打开的同时 β -内酰胺酶也不可逆的失活。青霉素、头孢菌素及单内酰胺类抗生素均对携带此种 β -内酰胺酶的细菌无效。另一种是基于二价金属离子(多为 Zn^{2+})为活性位点的作用机制,称为金属 β -内酰胺酶。其可通过金属离子与组氨酸或半胱氨酸结合,或同时与两种氨基酸结合,从而与 β -内酰胺类药物羰基碳的酰胺键相互作用,使 β -内酰胺类药物失活。

青霉素、头孢菌素及碳青霉烯类抗生素均对携带金属 β -内酰胺酶的细菌无效,但单内酰胺类抗生素对此种细菌有效。具有代表性的含有金属 β -内酰胺酶的细菌为NDM-1,其表达的金属 β -内酰胺酶具有多重耐药性,除替加环素和多黏菌素外,几乎所有抗生素对其无效。同时其质粒中携带的NDM-1基因不但可垂直遗传给子代,也可横向转移给其他细菌。这种较强的抗性基因传播能力,给临床上由超级细菌引起的细菌性感染的治疗提出了难题^[3-4]。

2.2 药物钝化酶引起的耐药

药物钝化酶主要是耐药细菌针对氨基糖苷类抗生素所产生的氨基糖苷类钝化酶,多种革兰阴性细菌,金黄色葡萄球菌及肠球菌都可表达氨基糖苷钝化酶。其主要分3种:第1种是对羟基进行磷酸化修饰的氨基糖苷磷酸转移酶(aminoglycoside phosphotransferase, APH)^[5],以ATP为辅因子,将ATP上的 γ -磷酸转移到氨基糖苷类药物的特定羟基上,使药物磷酸化^[6];第2种是对氨基进行磷酸化修饰的氨基糖苷乙酰转移酶(aminoglycoside acetyltransferases, AAC),以coenzyme A (CoA)为辅因子,将CoA上的乙酰基转移到氨基糖苷的氨基上,使药物乙酰化^[7];第3种是对羟基进行核苷酸转移的氨基糖苷核苷酸转移酶(aminoglycoside nucleotidyltransferases, ANT)^[8],以ATP为辅因子,断裂ATP上 α - β 间的磷酸键,并将AMP转移到氨基糖苷特定的羟基上^[9]。这3种酶主要是对氨基糖苷类抗生素的氨基或羟基进行修饰,使氨基糖苷类抗生素钝化,钝化的氨基糖苷类抗生素成了未被钝化的氨基糖苷类抗生素的细菌转运系统的竞争底物,进而减少甚至阻止氨基糖苷类抗生素与细菌核糖体的结合,使细菌对氨基糖苷类产生耐药。不同的氨基糖苷类抗生素可被同一种氨基糖苷钝化酶钝化,同时,一种氨基糖苷类抗生素又可被多种氨基糖苷钝化酶钝化。例如:6种氨基糖苷钝化酶可使妥布霉素失活,5种氨基糖苷钝化酶可使庆大霉素失活等。细菌对氨基糖苷类存在不完全的交叉耐药,所以单一一种氨基糖苷钝化酶的抑制剂不足以克服细菌对氨基糖苷类抗生素的耐药。值得关注的是,氨基糖苷钝化酶可与ESBLs共同存在于细菌的染色体或质粒的转座子或整合子上,产生多重耐药。

2.3 药物外排引起的耐药

将抗菌药物主动泵出也是细菌产生耐药的原

因之一。目前,耐药泵的种类有20种之多,分为图2所示的5个家族^[10]:ATP结合盒超家族(ATP-binding cassette family, ABC)、主要易化子超家族(major facilitator superfamily, MFS)、小多重耐药家族(small multidrug resistance, SMR)、耐药节结化细胞分化(resistance nodulation division, RND)、多药及毒性化合物外排家族(multidrug and toxic-compound extrusion family, MATE)。其中革兰阳性耐药细菌中的耐药泵有ABC、MFS、SMR及MATE 4种类型,而革兰阴性耐药细菌中的耐药泵包括ABC、MFS、SMR、RND及MATE 5种类型。例如:MdfA蛋白属于MFS类,存在于大肠埃希菌中,由410个氨基酸组成,其中Glu26, Asp34和Asp132 3个氨基酸组成的空穴为其活性位点,可将药物泵出^[11]。由EmrD-3构成的耐药泵属于MATE和RND家族,主要表达于霍乱弧菌中,可将利福平、红霉素、氯霉素等主动泵出细菌菌体外^[12]。乳酸乳球菌中表达的Mdt(A)蛋白为MFS家族,由418个氨基酸组成,含有2个模块和一个ATP结合位点,以林可酰胺类抗生素、链阳霉素、四环素等抗生素为作用底物。NorA、NorB和NorC是表达于金黄色葡萄球菌中的蛋白,均属于TMS家族。NorA几乎存在于所有金黄色葡萄球菌的全基因组序列中,由388个氨基酸组成,对喹诺酮类抗生素、诺氟沙星和氯霉素等有外排作用。NorB和NorC由462个氨基酸组成,可主动泵出环丙沙星、诺氟沙星等^[13]。

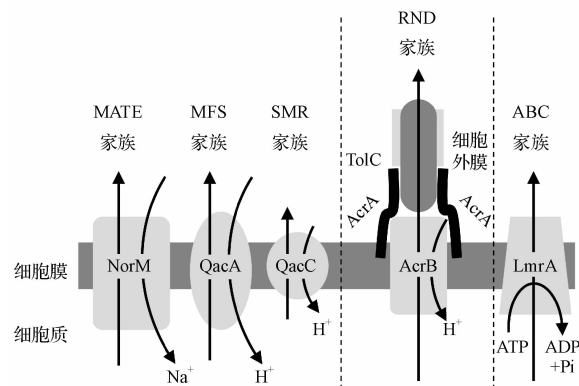


图2 耐药泵的5种模式^[10]

2.4 药物作用靶点突变引起的耐药

细菌对药物作用靶点的修饰也可导致细菌耐药。药物作用靶点的修饰有很多种。其中,对青霉素类产生耐药的原因除了产生 β -内酰胺酶外,还有革兰阳性菌对青霉素结合蛋白(PBPs)的修饰。

PBPs是广泛存在于细菌表面的膜蛋白,有PBP(1, 2, 3, 3'和4)5种,具有合成细菌细胞壁的功能。它们与 β -内酰胺类抗生素有很高的亲和力,能与 β -内酰胺类药物共价结合,导致细菌死亡。不同细菌所含的PBPs种类及含量均不相同。由PBPs改变引起的青霉素耐药主要体现在MRSA中。在侵入性感染中,每年由MRSA引起的菌血症的发生率从每10万人3.6例到6.0例不等^[14]。同时,MRSA感染常常还伴随着转移性感染引起的发热,心力衰竭及中枢神经系统混乱等^[15]。MRSA的PBP蛋白是其携带的MecA基因表达的PBP2a蛋白,其相对分子质量介于PBP2与PBP3之间,故称为PBP2a或PBP2'。因为PBP2a对 β -内酰胺类药物亲和力较低,导致MRSA对 β -内酰胺类药物耐药。由PBP蛋白的改变引起耐药的细菌还包括肺炎链球菌、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟球菌、肠球菌等。

细菌中核糖体的修饰也会造成耐药。其中核糖体50S亚基上的L4和L22蛋白与耐药相关,这些大亚基蛋白有一个细长的“触手”结构,可以延伸到大亚基的核心区域,形成多肽转运通道,L4蛋白的大环部位和L22蛋白高度保守区域被修饰后会阻止大环内酯类药物的结合^[16]。23S rRNA是一种低拷贝的rRNA,由Rv1988基因编码的甲基转移酶(ErmMT)和转录激活因子whiB7^[17]将23S rRNA的N6位置进行修饰,使核糖体与大环内酯类药物的亲和力下降。Nonaka等^[18]和Saito等^[19]指出,由腺嘌呤特异N-甲基转移酶催化核糖体50S亚基中23S rRNA的A2058T碱基甲基化,可使细菌对大环内酯类药物产生耐药。克拉霉素作为红霉素的一种,可与核糖体23S RNA结构域2中的发夹35相互作用,抑制氨基转移酶循环,将蛋白合成阻止在延伸步骤,当23S rRNA被修饰后,会对其产生抗性。而核糖体30S亚基的S12蛋白突变会对链霉素产生耐药。

除此之外,还有其他引起耐药的靶点的改变,例如:合成细菌细胞壁的五肽聚糖的改变^[20]、RNA聚合酶的改变、DNA回旋酶和拓扑异构酶的突变、二氢叶酸还原酶的修饰、脂多糖的改变等,均可造成抗生素作用靶点的改变,导致细菌耐药性的产生。

2.5 细菌细胞膜通透性改变引起的耐药

耐药细菌可通过基因调控来降低膜通道蛋白

的表达,从而降低细胞膜的通透性,减少抗生素进入细胞内的量。这种耐药机制是非特异性的,可对各种抗生素产生耐药,属于一种防御机制。该机制主要存在于有细胞外膜的革兰阴性菌,因其膜通透性变化较大。当抗生素与细菌相互作用时,由基因突变引起的非特异性膜孔蛋白 OprF 的缺陷及特异性通道 OprD 的改变和脂质双分子层改变等使细菌细胞外膜通透性降低,阻碍抗生素进入细胞与靶部位结合,从而产生耐药。

3 针对耐药细菌的抗生素的临床应用

3.1 β -内酰胺类抗生素

针对产生 β -内酰胺酶的细菌引起的感染, β -内酰胺类药物与酶抑制剂联合使用是较好的治疗方法。目前临床常用的酶抑制剂有克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦 3 种,但 β -内酰胺类药物与酶抑制剂联合使用并不能解决所有与 β -内酰胺酶有关的细菌耐药问题。 β -内酰胺酶种类繁多,越来越多的 β -内酰胺酶具有超广谱酶活性,不能被现有的酶抑制剂所抑制。第 4 代头孢菌素可对产生染色体介导的 β -内酰胺酶,特别是 AmpC (头孢菌素酶) 的细菌有效,临床应用较多的是头孢吡肟与头孢匹罗。但目前应用的第 3、4 代头孢菌素对产 ESBLs (超广谱 β -内酰胺酶) 的细菌无效。

3.2 大环内酯类抗生素

大环内酯类药物的细胞及组织穿透力强,组织中浓度高于血药浓度,细胞内浓度高于细胞外,主要应用于支原体、衣原体等在细胞内繁殖的病原体。阿奇霉素对导致社区获得性肺炎的流感嗜血杆菌有较好的抗菌活性,是治疗社区获得性肺炎首选药物。随着艾滋病等免疫能力低下疾病的增多,弓形体、隐孢子虫、非结核分支杆菌等条件致病菌引起的感染越来越多,大环内酯类药物亦可用来治疗上述条件致病菌引起的感染。临床应用较多的有阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素等。

3.3 喹诺酮类药物

第 3、4 代喹诺酮类药物对肺炎链球菌有较好的抗菌活性,可作为社区获得性肺炎的一线治疗药物。喹诺酮类的优点是口服吸收好,抗菌谱广,组织浓度高,过敏反应少,对某些特异性致病原有较好的疗效,临床应用较多的是莫西沙星、西他沙星等。但有些喹诺酮药物具有较严重的不良反应,表

现在神经系统、肝、心传导系统等。某些细菌对喹诺酮类药物的耐药发展较快,而细菌对喹诺酮类药物又有交叉耐药性。

4 抗菌肽及其抗耐药性细菌感染的作用

耐药细菌感染的普遍性与耐药基因传播的广泛性给临床治疗增加了极大的难度。虽然治疗的药物剂量在不断增大,用药时间在不断延长,但治疗效果并不理想。因此,寻求新的抗菌药物及新的治疗方法已迫在眉睫。

4.1 抗菌肽的发现

抗菌肽是一类由生物体产生的具有抗菌活性的小分子多肽的总称,通常由 10 ~ 50 个氨基酸组成,相对分子质量在 4 000 左右,带正电荷,具有较好的水溶性与热稳定性,等电点 (PI) 在 9 ~ 11 之间。目前,已相继从细菌、真菌、两栖类、哺乳动物和人体内发现抗菌肽。其最有可能替代传统抗生素,因其具有广谱抗菌活性,对革兰阳性细菌和革兰阴性细菌都有活性,且对耐药细菌同样有效,甚至包括携带 NDM-1 基因的大肠埃希菌^[21-22]。已有研究表明,抗菌肽不仅有广谱抗菌活性,还有其他生物学活性,例如某些抗菌肽对部分病毒、真菌、原虫和癌细胞等有杀灭作用,甚至能提高免疫力、加速伤口愈合过程等^[23-25]。因此,抗菌肽作为一种有潜力的新型抗菌药物来源,吸引了越来越多学者的关注。

4.2 抗菌肽的作用机制

作为一种新型抗菌药物,抗菌肽与传统抗生素有所不同,其抗菌机制较多,根据其作用机制可将抗菌肽分为膜破坏型及非膜破坏型两种^[26]。

膜破坏型抗菌肽主要是抗菌肽和微生物之间通过电荷相互作用,并在细胞膜积累,使细胞膜发生构象变化,进而破坏膜结构完整性,导致细胞内容物外流、细胞破裂。如图 3-D 所示,从电镜照片中可以看出,经金环蛇抗菌肽 BF-30 处理的细菌细胞膜破裂,内容物释放,导致细菌死亡^[28]。膜破坏型抗菌肽作用机制具体有栅桶模型、环形孔模型和毡毯模型 3 种 (图 3-A ~ C)。栅桶模型认为抗菌肽依靠两亲性静电作用吸附在细胞膜表面,疏水 C 端插入到细胞膜内的疏水区磷脂双分子层内,以与细胞膜表面垂直的方式排列,形成类似木桶状的多聚体管束,改变膜的

构象,从而形成横跨细胞膜的离子通道,破坏细胞膜完整性,引起细胞死亡。环形孔模型认为抗菌肽与磷脂双分子层表面结合后,抗菌肽的疏水性基团与双分子层的亲水性基团相互作用,使双分子层结构被破坏,膜表面弯曲,形成环形孔。毡毯模型认为大量带正电荷的抗菌肽和细胞膜

上带负电荷的头部聚合,平行排列在细胞壁表面形成类似毡毯的结构。其疏水侧朝向细胞膜磷脂,使脂质弯曲,破坏细胞膜脂质排列,在疏水作用和分子张力作用下改变细胞膜的流动性和厚度,导致细胞质外渗,细胞膜崩解,最终细胞死亡。代表抗菌肽主要有 cecropin 和 LL37^[29-30]。

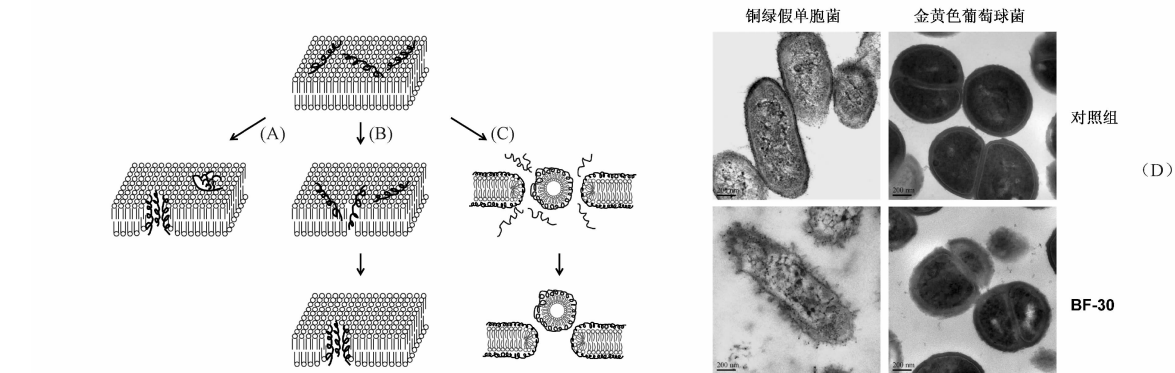


图 3 膜破坏型抗菌肽的作用机制^[27-28]
(A) 栅桶模型;(B) 环形孔模型;(C) 毡毯模型;(D) 经抗菌肽处理的细菌电镜照片

非膜破坏型抗菌肽在不引起细胞膜结构破坏的情况下快速穿膜,与细胞内靶分子相互作用,包括抑制核酸复制、干扰蛋白质合成、抑制酶活或信号转导等生理过程,从而发挥杀菌作用。图 4 列出了不同抗菌肽的胞内作用机制,如抗菌肽 pleurocidin 和 dermaseptin 等可抑制细菌 DNA 复制、转录与翻译等生物功能,histatins 和 pyrrocoricin 等可抑制细菌的酶活性,而 mersacidin 可影响细胞壁合成。

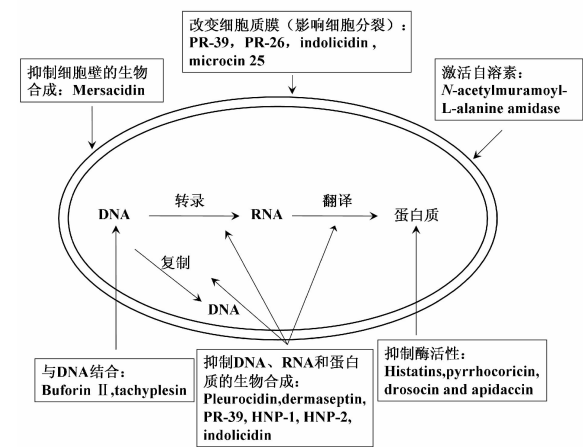


图 4 非膜破坏型抗菌肽的作用靶点^[31]

4.3 抗耐药性细菌感染的抗菌肽药物的研制

基于抗菌肽所具有的独特优势,可独立或与抗生素协同发挥抗菌作用^[32],目前已有许多抗菌肽进入临床研究,表 1 列出了近年来抗菌肽的商业发展。

4.4 基于抗耐药性细菌感染的抗菌肽联合用药新策略

研究表明,抗生素与抗菌肽之间存在协同作用,可通过两者的联合产生较好的抗菌效果。Mehta 等^[35]和 Werth 等^[36]研究了 β -内酰胺类药物与达托霉素的联合抗菌作用。两者具有协同作用的主要原因是,抗菌肽主要作用靶点是细菌的细胞膜,对于抗菌肽来说进攻细菌致密的细胞壁是比较困难的,而 β -内酰胺类药物主要作用靶点是细菌的细胞壁,经其处理的细菌会形成细胞壁不完整的细胞形态,这种形态的细菌更容易被抗菌肽所攻击。最新研究表明,抗菌肽与抑制细胞壁合成药物联合使用具有更强的杀菌作用^[37]。Schuch 等^[38]的研究表明,亚抑菌浓度的 CF-301 可增加万古霉素等抗生素的抗菌作用,对 MRSA 引起的感染,抗菌肽与万古霉素等抗生素联用比单独用药组有更好的治疗效果。MacCallum 等^[39]发现,卡泊芬净与 hMUC7-12, DsS3 (1-16) 或 hLF (1-11) 联用,无论在体内还是体外,都对白色念珠菌引起的感染有较好的治疗效果。Bozkurt-Guzel 等^[40]研究发现,由铜绿假单胞菌引起的囊胞性纤维症可通过 CSA-13 与妥布霉素和环丙沙星联合治疗。Desbois 等^[41]研究显示,溶葡萄球菌素可通过与乳铁蛋白、黏菌素或多黏菌素 B 联合用药治疗由耐药性葡萄球菌引起的感染。

表 1 临床前和临床试验阶段的抗菌肽^[33-34]

产品名	治疗领域与应用	研制公司	国 家	阶 段
Polymixin B	用于治疗革兰阴性菌引起的皮肤感染	RX Generic drugs	美国	已上市
Daptomycin	用于治疗革兰阳性菌引起的皮肤感染	Cubist Pharmaceuticals	美国	已上市
Pexiganan	用于治疗皮肤深部感染	Genaera PlymouthMeeting	美国	未通过 FDA 审核
Iseganan	用于治疗胃炎及肺炎	Intrabiotics Pharmaceuticals	美国	临床Ⅲ期研究失败
Omiganan	用于治疗血液感染	Migenix	加拿大	临床Ⅲ期研究失败
LTX serie	治疗细菌和真菌感染	Litix Biopharma	美国	临床 I 期、Ⅱ期研究
SB006	治疗革兰阴性细菌感染	SpiderBiotech	意大利	临床 I 期、Ⅱ期研究
Product- I serie	治疗细菌感染	Inimex	美国	临床 I 期、Ⅱ期研究
MX594AN	局部治疗痤疮	Migenix	加拿大	临床 I 期、Ⅱ期研究
Plectasin	治疗革兰阴性细菌感染	Novozyme	美国	临床 I 期、Ⅱ期研究
P113/P113D	治疗口腔真菌感染	Demegen/Pacgen	美国	临床 I 期、Ⅱ期研究
hLF1-11	治疗细菌和真菌感染	AM-Pharma	荷兰	临床 I 期、Ⅱ期研究
XMP. 629	局部治疗痤疮	Xoma	美国	临床Ⅱ期研究失败
Neuprex	局部治疗脑膜炎球菌血症	Xoma	美国	临床Ⅱ期研究失败
Mersacidin	治疗革兰阴性细菌感染	Pep Tx	美国	临床 I 期、Ⅱ期研究
HB Serie	治疗囊性纤维化	Helix-Biomedix	美国	临床 I 期、Ⅱ期研究

值得一提的是,抗生素与抗菌肽存在联合作用,联用后可使药物最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)降低,杀菌时间缩短,杀菌效果增强,同时不易产生耐药性。所以,联合用药是治疗耐药性感染较为可行的方法。

5 展 望

由耐药细菌引起的感染已成为临床上亟需解决的难题,随着抗生素的大量应用,特别是无指征用药、不恰当地选择备用抗菌药、过度治疗及频繁换药,导致耐药率越来越高,耐药程度越发严重和多重耐药细菌的出现。对于多重耐药细菌引起的感染,单一抗生素已不能达到治疗的目的,因此,对新型抗菌药物的发现提出了更高的要求。抗菌肽以其抗菌谱广、毒性小、相对分子质量小、热稳定性好、抗菌机制独特等优点,成为一类极具潜力的肽类抗生素,具有较好的应用前景。为了进一步减少耐药现象的发生,提高临床治疗效果,抗菌肽与不同抗菌机制的抗生素联合使用,将是临床治疗耐药细菌感染的重要发展方向。

参 考 文 献

[1] Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, *et al.* Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, **11**(5): 355 - 362.

[2] Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development [J] *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, **70**(5): 1 060 - 1 075.

[3] Baroud M, Dandache I, Araj GF, *et al.* Underlying mechanisms of

carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, **41** (1): 75 - 79.

[4] Sahai S. Dissemination of NDM-1 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, **12** (2): 100 - 101.

[5] Shi K, Berghuis AM. Structural basis for dual nucleotide selectivity of aminoglycoside 2"-phosphotransferase Iva provides insight on determinants of nucleotide specificity of aminoglycoside kinases [J]. *J Biol Chem*, 2012, **287** (16): 13 094 - 13 102.

[6] Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes [J]. *Drug Resist Update*, 2010, **13**(6): 151 - 171.

[7] Magalhaes ML, Vetting MW, Gao F, *et al.* Kinetic and structural analysis of bisubstrate inhibition of the *Salmonella enterica* aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase [J]. *Biochemistry*, 2008, **47** (2): 579 - 584.

[8] Wright E, Serpersu EH. Enzyme-substrate interactions with an antibiotic resistance enzyme: aminoglycoside nucleotidyltransferase (2")-Ia characterized by kinetic and thermodynamic methods [J]. *Biochemistry*, 2005, **44**(34): 11 581 - 11 591.

[9] Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes [J]. *Drug Resist Update*, 2010, **13**(6): 151 - 171.

[10] Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, **19**(2): 382 - 402.

[11] Sigal N, Cohen-Karni D, Siemion S, *et al.* MdfA from *Escherichia coli*, a model rotein for tudying secondary multidrug transport [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2006, **11**(6): 308 - 317.

[12] Kumar S, Varela MF. Biochemistry of bacterial multidrug efflux pumps [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, **13**(4): 4 484 - 4 495.

[13] Ding Y, Onodera Y, Lee JC, *et al.* NorB, an efflux pump in *Staphylococcus aureus* strain MW2, contributes to bacterial fitness in abscesses [J]. *J Bacteriol*, 2008, **190**(21): 7 123 - 7 129.

[14] Landrum ML, Neumann C, Cook C, *et al.* Epidemiology of Staphy-

- lococcus aureus* blood and skin and soft tissue infections in the US military health system, 2005-2010 [J]. *JAMA*, 2012, **308** (1): 50 - 59.
- [15] Sonnevile R, Mirabel M, Hajage D, *et al.* Neurologic complications and outcomes of infective endocarditis in critically ill patients: the ENDOcardite en REAnimation prospective multicenter study [J]. *Crit Care Med*, 2010, **39** (6): 1 474 - 1 481.
- [16] Hao HH, Yuan ZH, Shen ZQ, *et al.* Mutational and transcriptomic changes involved in the development of macrolide resistance in campylobacter jejuni [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, **3** (57): 1 369 - 1 378.
- [17] Andini N, Nash KA. Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, **50** (7): 2 560 - 2 562.
- [18] Nonaka S, Matsuzaki K, Kazama T, *et al.* Antimicrobial susceptibility and mechanisms of high-level macrolide resistance in clinical isolates of *Moraxella nonliquefaciens* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, **63** (Pt 2): 242 - 247.
- [19] Saito R, Nonaka S, Nishiyama H, *et al.* Molecular mechanism of macrolide-lincosamide resistance in *Moraxella catarrhalis* [J]. *J Med Microbiol*, 2012, **61** (Pt 10): 1 435 - 1 438.
- [20] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, **54** (1): 24 - 38.
- [21] Wang J, Li B, Li Y, *et al.* BF-30 effectively inhibits ciprofloxacin-resistant bacteria *in vitro* and in a rat model of vaginosis [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, doi:10. 1007/s12272-013-0248-6.
- [22] Hao QR, Wang H, Wang J, *et al.* Effective antimicrobial activity of Cbf-K₁₆ and Cbf-A₇A₁₃ against NDM-1-carrying *Escherichia coli* by DNA binding after penetrating the cytoplasmic membrane *in vitro* [J]. *J Pept Sci*, 2013, **19** (3): 173 - 180.
- [23] Di Nardo A, Yamasaki K, Dorschner RA, *et al.* Mast cell cathelicidin antimicrobial peptide prevents invasive group A *Streptococcus* infection of the skin [J]. *J Immunol*, 2008, **180** (11): 7 565 - 7 573.
- [24] Tian YW, Wang H, Li B, *et al.* The cathelicidin-BF Lys₁₆ mutant Cbf-K₁₆ selectively inhibits non-small cell lung cancer proliferation *in vitro* [J]. *Oncol Rep*, 2013, **30** (5): 2 502 - 2 510.
- [25] Wang H, Ke MY, Tian Y, *et al.* BF-30 selectively inhibits melanoma cell proliferation *via* cytoplasmic membrane permeabilization and DNA-binding *in vitro* and in B16F10-bearing mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, **707** (1/2/3): 1 - 10.
- [26] Engler AC, Wiradharma N, Zhan YO. Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections [J]. *Nano Today*, 2012, **7** (3): 201 - 222.
- [27] Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, **29** (9): 464 - 472.
- [28] Zhou HM, Dou J, Wang J, *et al.* The antibacterial activity of BF-30 *in vitro* and in infected burned rats is through interference with cytoplasmic membrane integrity [J]. *Peptides*, 2011, **32** (6): 1 131 - 1 138.
- [29] Ramos R, Domingues L, Gama M. *Escherichia coli* expression and purification of LL37 fused to a family III carbohydrate-binding module from *Clostridium thermocellum* [J]. *Protein Expr Purif*, 2010, **71** (1): 1 - 7.
- [30] Zakharchenko NS, Pigoleva SV, Iukhmanova AA *et al.* Use of the gene of antimicrobial peptide cecropin P1 for producing marker-free transgenic plants [J]. *Genetika*, 2009, **45** (8): 1 061 - 1 066.
- [31] Brogden KA. Antimicrobial peptides: poreformers or metabolic inhibitors in bacteria [J]? *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3** (3): 238 - 250.
- [32] Cassone M, Otvos L Jr. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics [J]. *Expert Rev Anti Ther*, 2010, **8** (6): 703 - 716.
- [33] Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics [J]. *Cent Eur J Biol*, 2007, **2** (1): 1 - 33.
- [34] Hou GB, Meng QX, Song YZ. The perspective of clinical application of antimicrobial peptides [J]. *Chin Bull Life Sci (生命科学)*, 2012, **24** (4): 390 - 397.
- [35] Mehta S, Singh C, Plata KB, *et al.* β -Lactams increase the antibacterial activity of daptomycin against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and prevent selection of daptomycin-resistant derivatives [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56** (12): 6 192 - 6 200.
- [36] Werth BJ, Sakoulas G, Rose WE *et al.* Ceftaroline increases membrane binding and enhances the activity of daptomycin against daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, **57** (1): 66 - 73.
- [37] Monahan LG, Turnbull L, Osvath SR, *et al.* Rapid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to a spherical cell morphotype facilitates tolerance to carbapenems and penicillins but increases susceptibility to antimicrobial peptides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, **58** (4): 1 956 - 1 962.
- [38] Schuch R, Lee HM, Schneider BC, *et al.* Combination therapy with Lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia [J]. *J Infect Dis*, 2014, **209** (9): 1 469 - 1 478.
- [39] MacCallum DM, Desbois AP, Coote PJ. Enhanced efficacy of synergistic combinations of antimicrobial peptides with caspofungin versus *Candida albicans* in insect and murine models of systemic infection [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013, **32** (8): 1 055 - 1 062.
- [40] Bozkurt-Guzel C, Savage PB, Gerceker AA. *In vitro* activities of the novel ceragenin CSA-13, alone or in combination with colistin, tobramycin, and ciprofloxacin, against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients [J]. *Chemotherapy*, 2011, **57** (6): 505 - 510.
- [41] Desbois AP, Coote PJ. Bactericidal synergy of lysostaphin in combination with antimicrobial peptides [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, **30** (8): 1 015 - 1 021.