

文章编号：1001-8689(2017)05-0321-07

细菌耐药性及新型抗菌疗法研究进展

姚文晔 曾洁 薛云新 王岱*

(分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 厦门大学, 厦门 361102)

摘要：传统抗生素能够阻断细菌中共有的信号通路或新陈代谢途径，往往无法区分杀菌对象，长期使用会导致菌群失调及耐药性的产生，因此需要找出一种新型抗菌药物能特异针对病原菌或耐药菌。本文参阅近年来国内外研究进展，介绍了传统抗生素及细菌产生耐药性的主要机制。并且针对日益严重的细菌耐药性现象而出现的一系列新型抗菌疗法进行总结，特别介绍了近年来比较热门的基因编辑工具CRISPR-Cas9系统作为基因特异性杀菌药物的应用。

关键词：抗生素；细菌耐药性；新型抗菌疗法；CRISPR-Cas9

中图分类号：R978.1 文献标志码：A

DOI:10.13461/j.cnki.cja.005877

Advances in bacterial drug resistance and new antimicrobial therapy

Yao Wen-ye, Zeng Jie, Xue Yun-xin and Wang Dai

(State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, Xiamen University, Xiamen 361102)

Abstract Traditional antibiotics can block conserved bacterial signaling pathway or metabolic pathway, and therefore it is unable to distinguish bacteria. Long-termed usage will lead to dysbacteriosis and drug resistance. We need to find a new antibacterial drug which can target pathogens and drug-resistant bacteria specifically. By reviewing current research progress, this paper mainly discussed the mechanisms of traditional antibiotics and bacterial drug-resistance. We summarized a series of traditional and new antimicrobial therapies for solving bacterial drug-resistance, including the application of CRISPR-Cas9 system, a popular gene editing tool, as a gene-specific bactericidal drug.

Key words Antibiotics; Bacterial drug-resistance; New antimicrobial therapy; CRISPR-Cas9

1928年，Fleming发现青霉素，被誉为人类医学史上一个重大的里程碑。人类从此步入了利用抗生素治疗感染性疾病的时代。1944年，Waksman发现了链霉素，它抗结核菌的疗效，开创了结核病治疗的新纪元，进一步加强了人们研究抗生素的信心。自此以后抗生素的研究得到了飞速的发展。随着抗生素的使用，大部分由细菌感染所引起的疾病得以治疗，在外科手术中因受感染死亡的病例也大幅减少，但是一些问题也接踵而至。比如，抗生素的滥

用不仅杀死体内的病原菌，也会消灭人体肠道中的益生菌，扰乱体内环境的稳定性，进而威胁健康。另一方面，大量抗生素的使用使得细菌耐药性不断累积和传播。现如今细菌耐药性产生的速度越来越快，而新型抗生素的研发却越来越慢。如果不能尽快解决这一问题，那我们将很快进入无药可用的“后抗生素时代”。随着分子生物学技术的发展以及对细菌耐药机制了解的深入，人们更多的将目光集中在利用生物化学，基因工程或分子生物学手段，特

收稿日期：2016-10-28

基金项目：国家自然科学基金(No. 81473251、No. 81301474和No. 31370166)；福建省自然科学基金(No. 2014J01139和No. 2015J01345)；

厦门大学校长基金(No. 20720160060)

作者简介：姚文晔，女，生于1991年，在读硕士研究生，研究方向为细菌耐药与新型抗生素杀菌，E-mail: ywy19910330@163.com

*通讯作者，E-mail: daiwang@xmu.edu.cn

异的针对病原菌或耐药菌进行消除。

本文将介绍传统抗生素及多重耐药菌的产生机制，并着重介绍针对多重耐药菌感染的传统疗法与新兴疗法如噬菌体疗法，光化学疗法以及CRISPR-Cas9系统作为新兴热门的基因编辑工具被用作一种序列特异性的杀菌药物的优缺点。

1 传统抗生素与细菌耐药性的发展

一直以来，人类与病原菌之间的抗争从来没有停止过。在抗生素发现以前，由细菌感染所引起的疾病极大程度的影响了人类的发展，造成较高的发病率和死亡率。如14世纪由于耶尔森菌(*Yersinia pestis*)传播引起的鼠疫流行^[1-2]以及在世界各地都有爆发和流行的疟疾、霍乱都曾经造成大规模的死亡。自青霉素被发现并投入使用后，抗生素得到了快速的发展，使得人类在对抗病原细菌上取得一定的胜利。

1.1 传统抗生素及作用机制

现如今抗生素的种类繁多，按照其作用方式的不同，我们可将其分为：干扰细胞壁合成的 β -内酰胺类和糖肽类；抑制蛋白质合成的氨基糖苷类；干扰DNA复制的喹诺酮类；抑制细菌新陈代谢的复方磺胺甲噁唑；以及破坏细菌细胞膜的多黏菌素和达托霉素(表1)^[3-5]。

1.2 细菌多重耐药性的产生

随着抗生素的使用，人类在对抗细菌感染性疾病上取得了阶段性的胜利，但是细菌针对抗生素不

断出现的耐药性也给人们带来了巨大的挑战。细菌产生耐药性的原因是多种多样的，有的是细菌天然的对超过一种以上的药物具有耐受性^[3]，而我们更加关注的是抗生素压力下的细菌获得性耐药。从作用方式上来看，细菌获得耐药性的机制主要有3种，即通过对药物靶位点的修饰，对药物的修饰以及对药物摄入途径的影响。

对药物靶位点的修饰，使得药物与靶点的结合能力减弱。如：在大肠埃希菌中，氟喹诺酮药物靶点DNA解旋酶亚基GyrA的第84位丝氨酸(Ser)突变成其他氨基酸如：色氨酸(Trp)，会降低氟喹诺酮类药物与DNA解旋酶的结合能力，从而导致细菌耐药性产生^[10-11]。利福平能与RNA聚合酶以1:1的比例形成复合物，抑制转录的启动，研究表明编码大肠埃希菌RNA聚合酶 β 亚基的*rpoB*基因的突变可以引起对利福平的耐药性。核糖体RNA，核糖体蛋白的点突变以及16S rRNA甲基化都会造成大肠埃希菌及铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物产生高水平耐药性^[12-13]。

在对药物的修饰导致耐药性产生这一机制中包括两种形式，一种是产生可以降解药物的酶类如 β -内酰胺酶(β -lactamases)，这是细菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药性的主要原因， β -内酰胺酶的种类繁多。如今，传播最为广泛的是广谱类 β -内酰胺酶类(extended spectrum lactamases, ESBL)以及碳青霉烯酶类(carbapenemases)，它们可以水解大部分内酰胺

表1 传统抗生素种类及作用位点

Tab. 1 The types and target of traditional antibiotic

药物类型	作用机制	作用菌群	代表药物
β -内酰胺类	与PBP结合，抑制细胞壁肽聚糖合成，激活细胞壁水解酶，引发细胞自溶 ^[6]	需氧，厌氧革兰阴性菌或阳性菌	根据其发展和分子结构可分为4类：第1类：青霉素类(penicillins)，如氨苄西林(ampicillin)和阿莫西林(amoxycillin)；第2类：头孢菌素类(cephalosporins)，如头孢噻吩(cefalotin)和头孢噻肟(cefotaxime)；第3类：单环内酰胺类(monobatam)，如氨基曲南(aztreonam)；第4类：碳青霉烯类(carbapenems)，如亚胺培南(imipenem)，厄他培南(ertapenem)和美罗培南(meropenem)
喹诺酮类	与DNA解旋酶(DNA gyraes)和拓扑异构酶(topoisomerase)结合，干扰DNA复制累积并释放断裂DNA片段 ^[7-8]	需氧革兰阴性菌或阳性菌，部分厌氧革兰阴性菌，如结核分枝杆菌	国际上根据其药物抗菌活性分为4代：第1代：萘啶酸(nalidixic acid)和奥索利酸(oxolinic acid)；第2代：氟喹诺酮类药物，如诺氟沙星(norfloxacin)，环丙沙星(ciprofloxacin)和氧氟沙星(ofloxacin)；第4代：莫西沙星(moxifloxacin)和加替沙星(gatifloxacin)；第4代：曲伐沙星(trovafloxacin)
氨基糖苷类	与30S核糖体亚基结合抑制蛋白质合成 ^[9]	需氧革兰阴性菌或阳性菌	链霉素(streptomycin)，庆大霉素(gentamicin)，卡那霉素(kanamycin)和妥布霉素(tobramycin)
脂肽类	破坏细胞膜结构	革兰阴性菌及阳性菌	达托霉素(daptomycin)和多黏菌素B(polymixin B)
利福平	抑制RNA转录	革兰阴性菌或阳性菌，如肺炎链球菌	利福霉素(rifamycins)和利福平(rifampin)

类抗生素^[6]。另一种对抗生素化学修饰的典型例子就是氨基糖苷酶催化的化学修饰,主要通过3个常规的机制发生:O-磷酸转移酶(APH),O-核苷酸转移酶(ANT)和N-乙酰基转移酶(AAC)。对抗生素关键位点的修饰阻断了它们与16S rRNA结合的能力,是大部分临床分离菌株产生耐药性的原因。

在对药物摄入途径的影响中,位于细胞膜上孔蛋白通道或者外排泵(efflux pump)突变所导致的对药物摄入障碍,可能导致多重耐药性(multidrug resistance)的产生。在革兰阴性菌疏水性外膜上存在亲水性孔道,由孔蛋白(porins)构成,亲水孔道可选择性的吸收一些营养物质或其他成分如抗生素进入到细胞中。因此孔蛋白的任何变化都会造成抗生素摄入障碍,导致对抗生素的敏感性降低。研究表明在大肠埃希菌(*E. coli*)中OmpF和OmpC孔蛋白家族^[14],肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)中的孔蛋白OmpK35/36以及鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)中的孔蛋白OmpF的表达修饰会降低细胞膜的渗透性,导致对碳青霉烯类抗生素的耐药性^[15-17]。通过细菌细胞膜上的输出泵将进入细菌内但未到达靶点的抗生素主动外排到环境中也是细菌产生抗药性的原因之一。研究表明,三大类抗生素都有相关的外排泵突变导致的耐药性产生。在大肠埃希菌中AcrAD(属于RND蛋白家族)是与TolC相关的一种氨基糖苷类的外排泵,能够从细胞间质和细胞质中捕获抗生素并输出^[18-19]。

通过基因的水平转移即:转化(transformation)、噬菌体转导(transduction)、质粒接合(conjugation),使得耐药基因可以在不同种属的细菌间相互传播,从而导致细菌耐药性以飞快的速度蔓延,并逐渐演化同时可以耐受多种药物的超级细菌,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant enterococci),耐万古霉素(vancomycin-resistant, MRSA),碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC)等,使得抗生素的研发和使用面临着巨大的挑战。

2 针对多重耐药菌的传统疗法和新型疗法

多重耐药菌的出现给临床感染治疗带来了一系列的挑战。针对这一现象,既有传统抗生素治疗方法,研究人员也正在积极研究一系列新型非抗生素疗法来针对病原菌或耐药菌的感染。

2.1 传统治疗方法—抗生素治疗

针对多重耐药菌引起的感染,传统的治疗方法

依旧是使用抗生素治疗,关键在于通过对感染细菌进行一系列药敏实验找出对其敏感的抗生素或使用与其耐受药物作用途径不同的抗生素种类进行杀菌如:氨曲南对大多数内酰胺酶高度稳定,是多重耐药鲍曼不动杆菌的有效抗菌药物^[20];多黏菌素类药物可以通过与革兰阴性菌膜外的阳离子竞争来破坏细胞膜通透性从而使细胞裂解死亡,对多重耐药铜绿假单胞菌具有良好的抗菌活性^[21]。体外实验表明碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌对替加环素的敏感性为100%。当单一抗生素对多重耐药菌的治疗效果不明显时,往往采取联合用药的方式,将两种不同作用方式的抗生素联用获得协同作用的效果,可以增加药物覆盖面,减小突变选择窗,从而减少耐药菌突变。通常使用的联合用药组合包括 β -内酰胺类/ β -内酰胺酶抑制剂如:替卡西林/克拉维酸。有时也会使用3种抗生素联合使用,如替卡西林,妥布霉素和利福平^[22]。

但是传统抗生素大多都是广谱类抗生素,其杀菌或抑菌效果是通过抑制或破坏细菌生长过程中一些保守的代谢途径来实现的,在杀菌过程中往往无法区分杀菌对象,因此长期使用会导致一系列的副作用如:耐药菌的积累和传播以及环境和人体肠道内菌群失调等。因此,研究人员正在积极研究一些非抗生素疗法,能够特异性地针对我们的病原菌或耐药菌,而不会对环境中的其他微生物造成影响。近年来,常见的非抗生素疗法主要有噬菌体疗法,金属螯合剂,光动力疗法和CRISPR-Cas9系统等。

2.2 噬菌体及噬菌体裂解酶疗法

噬菌体是自然界中广泛存在的细菌病毒,能够特异的感染宿主细菌,在宿主细胞内复制繁殖,引发宿主细胞裂解死亡。在早期研究中,Stoothill^[23]曾用噬菌体治疗铜绿假单胞菌和产气肠杆菌感染,并对烧伤后感染起到很好的预防作用。研究表明,利用噬菌体疗法治疗耐万古霉素肠球菌感染的小鼠,对其能达到100%的保护,证明了噬菌体疗法的有效性^[24]。噬菌体疗法的作用方式不同于传统抗生素,因此对多重耐药菌也有较好疗效^[25]。并且具有专一性强的特点,因为噬菌体能在宿主细胞内复制,繁殖,因此少量噬菌体便能达到目的。当然因为噬菌体的专一性强,造成可应用的范围过窄,其安全性问题也有待解决,噬菌体入侵引起的细胞免疫反应,以及噬菌体裂解病原菌造成的内毒素释放等问题都有待解决。

考虑到活噬菌体制剂的安全性问题,研究人员

想到利用来源于噬菌体的多种噬菌体裂解酶也能发挥相似的作用,噬菌体裂解酶能水解细菌细胞壁肽聚糖,破坏其结构,其作用方式与抗生素不同,因此同样可以应用于耐药菌^[26]。Schuch等^[27]的研究表明,来源于炭疽芽孢杆菌噬菌体C的裂解酶能裂解其宿主细胞的多个分离株以及与之亲缘关系较近的蜡质芽孢杆菌,并且动物实验表明其对腹腔感染的小鼠有良好的保护作用。因此相比于噬菌体制剂,噬菌体裂解酶有较宽的杀菌谱,但是噬菌体裂解酶其本质是蛋白质,在使用时需考虑其所引起的免疫反应^[28-29]。

2.3 金属螯合剂

有些金属离子是细菌在合成生物膜,蛋白质和核酸时必不可少的物质,参与到生物体各个生命活动过程中,如铁离子是细胞呼吸,TCA循环和氧传递过程中必不可少的物质。研究表明,使用铁离子螯合剂联吡啶对铜绿假单胞菌,鲍曼不动杆菌均有一定的抑菌效果^[30]。镓(Ga^{2+})与铁离子具有相似的原子半径和电荷比,使得镓离子可以利用微生物铁运输通道进入到细胞内,并可以与铁离子竞争其在蛋白质上结合位点,但是三价镓离子无法像铁离子一样能够被氧化还原,使得生物大分子失去活性,从而干扰细菌细胞内正常的铁代谢途径,导致细菌生长受阻,严重时会导致细菌死亡。研究表明,在体外实验中,硝酸镓具有良好的抗菌活性,对多重耐药的结核分枝杆菌,鲍曼不动杆菌以及金黄色葡萄球菌均具有良好的杀菌抑菌作用,并且可以影响其毒力水平^[31-33]。但是金属化合物的使用会对人身体造成一定损害如肾毒性,骨髓抑制以及对消化道的的影响等,因此需要进一步的研究。

2.4 光动力疗法

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)一直以来应用于肿瘤和皮肤血管瘤方面的治疗,其基本原理是利用光,光敏剂和氧的共同作用下对细胞造成氧化损伤从而致使细胞死亡。将光动力疗法应用于微生物灭菌、抗微生物化学治疗方面被称为光动力抗菌化学疗法(photo-dynamic antimicrobial chemotherapy, PACT),光动力灭活微生物的机制与抗生素不同,它依赖于光敏剂聚集在细菌胞内,在适当波长的光照下,光敏剂被激发,与周围生物大分子反应产生自由基或与分子氧反应产生活性氧,产生的自由基和活性氧破坏细胞膜和核酸从而导致细胞死亡^[34]。革兰阴性菌和阳性菌因细胞壁成分不同,造成其对光敏剂的摄入量不同从而影响PACT

的疗效。革兰阳性菌的细胞壁由多孔的肽聚糖和磷酸壁组成,允许光敏剂通过。中性或带负电的光敏剂可在适当波长的光照下能有效抑制细菌生长并杀菌。体外实验中,PACT对金黄色葡萄球菌杀菌效果良好,且不受细菌耐药性的影响^[35]。而对于革兰阴性菌,由于存在由脂蛋白,脂质双层和脂多糖构成的疏水性外膜,能选择性的吸收大分子物质进入细胞,造成光敏剂进入细胞时存在障碍,因此中性或带负电的光敏剂因无法通过外膜导致杀菌效果不好。而对阳离子光敏剂来说,由于能结合在细胞外膜上,干扰细胞外膜功能,从而透过外膜起作用^[36]。并且PACT在对于临床治疗铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌时,均可提高其对抗生素的敏感性^[37]。采用光动力抗菌化学疗法的优点有:对临近组织伤害较少;因为光敏剂和光照波长的双选择,杀菌更具有精确性,不易产生耐药性^[38]。其缺点是对光敏剂的选择,病人是否会对光敏剂敏感以及光敏剂光毒性的问题都应当考虑其中^[39-40]。

2.5 CRISPR-Cas9系统

CRISPR-Cas system(clustered regularly interspaced short palindromic repeats CRISPR-associated protein)即规律成簇间隔短回文序列,是细菌的一种获得性免疫,主要存在于细菌和古细菌中,能够保护细菌免受外界核酸如噬菌体和质粒的入侵^[41]。CRISPR系统利用RNA以碱基互补配对的方式识别靶基因,其对靶基因的识别仅需要靶基因位点上20bp左右碱基加上PAM序列,具有简单,高效的特点。利用具有核酸内切酶活性的Cas9蛋白对靶基因进行切割,造成双链断裂后,利用同源重组或非同源重组的方式进行修复,最终完成各种类型的基因编辑,如基因敲除,插入和点突变等。因此,CRISPR-Cas9系统很快的成为最新最热的基因编辑工具,用于各种类型的细胞及模式生物中,如大肠埃希菌(*E. coli*),肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),线虫,果蝇,小鼠以及拟南芥^[42-43]。在针对病原菌和耐药菌方面,研究人员想要利用CRISPR系统特异识别靶基因的能力从基因水平上特异的识别环境中的病原菌或耐药菌,对其进行杀灭。原理在于利用噬菌体将CRISPR系统相关基因注入细菌内,当靶基因位于耐药质粒上时,CRISPR对靶基因的切割导致质粒丢失,使得细菌恢复对药物的敏感性(图1a);当靶基因位于细菌基因组上时,CRISPR系统对靶基因的切割导致双链断裂,最终导致细胞死亡(图1b)。并且一旦CRISPR

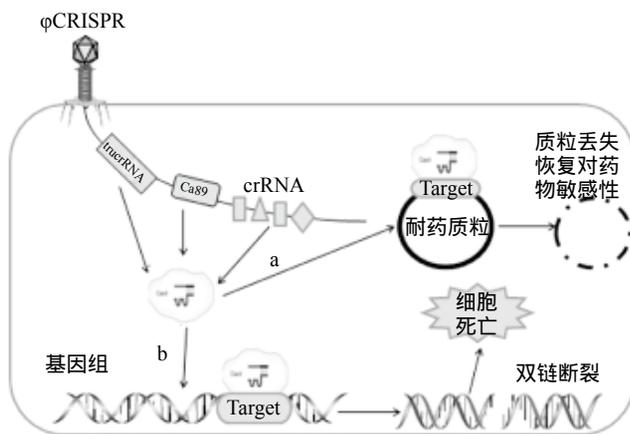


图1 CRISPR系统作为序列特异性杀菌药物作用示意图

Fig. 1 The mechanism of CRISPR system as sequence-specific antimicrobial

系统能够在细菌中稳定存在并遗传下来，它将会抵御含有相同靶基因的DNA片段再次入侵，能在一定程度上抑制耐药基因的传播^[44]。

早期研究表明，当CRISPR系统造成的靶基因断裂位于染色体上，会因无法及时修复造成细菌死亡^[45]，因此有研究人员利用CRISPR系统通过切割特定基因来清除菌群中某一特定的菌种^[46]。而Bikard和Citorik等^[47-48]的研究更加确定了这一想法的可行性和有效性。在Bikard等^[47]的研究结果表明含有CRISPR系统的噬菌体颗粒侵染细菌后，可以选择性的杀死含毒力基因的菌株，清除耐药基因质粒，阻止耐药基因传播以及在小鼠皮肤感染的实验中也能有效减少靶细菌的数量。在Citorik等^[48]的研究中，还利用了质粒接合的方式向菌株胞内运输CRISPR系统，不过转化效率有待加强。并且通过流式细胞仪检测发现CRISPR对基因组的切割引起了细菌的DNA损伤和SOS反应。并且发现，当靶基因位于细菌本身质粒(the native plasmid)上时，对质粒的切割同样也会造成细菌死亡，原因在于促发了质粒上的毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system TA systems)，说明了CRISPR系统引发杀菌作用的多重可能性。在大蜡螟感染模型的实验中，CRISPR系统的存在也有效的提高了大蜡螟的生存率^[48]。

虽然实验证明，CRISPR系统作为一种序列特异性的杀菌药物具有较好的效果和特异性，但是仍然存在一些问题有待解决，比如：如何将CRISPR系统安全有效的运输到细菌胞内。虽然2篇文章都使用了噬菌体侵染技术有效的将CRISPR系统相关基因运输到细菌中，但是，其缺点同噬菌体疗法一致，如侵

染的专一性导致其应用范围过窄，以及细菌对噬菌体的防御机制导致噬菌体入侵时效率降低，此外还有噬菌体应用到临床的安全性问题^[45]。虽然尝试采用了质粒接合的方式运输CRISPR系统到靶细胞中，但其效率并不尽如人意。找到一种安全，高效的运输方式是使用CRISPR-Cas系统作为杀菌药物的一大问题。针对以上问题，可以采取的方法有：对噬菌体进行改造使其适应更多的宿主^[49]及采用鸡尾酒方法将几种噬菌体混合对菌群进行感染^[50]。此外，当CRISPR系统对细菌造成生存压力时，细菌就会出现一系列突变来逃避CRISPR系统的切割。最常见的突变便是位于识别位点的20bp的原间隔序列和PAM序列的碱基突变会造成CRISPR-Cas系统无法识别靶标。针对这一问题可以采取的措施有：在CRISPR系统上设计多个sgRNA识别位点以及设计sgRNA切割含有耐药基因的质粒，造成耐药质粒的丢失，从而恢复细菌对药物的敏感性^[51]。此外有研究表明，将含有CRISPR系统的温和性噬菌体与裂解性噬菌体联用，可以用来作为外用消毒及进行物体表面的清洁，温和噬菌体中包含同时针对耐药基因和裂解性噬菌体的CRISPR系统，成功注入细菌胞内CRISPR系统会恢复耐药菌对抗生素的敏感性，而没有接受CRISPR系统的细菌会被裂解性噬菌体裂解，从而达到消毒目的来减少院内耐药菌感染^[52]。

3 展望

一直以来，人类与病原菌的斗争从未停止过，抗生素的发现和和使用使得人类在对抗病原菌的入侵上取得了巨大的胜利，但是传统抗生素研发的困难和耐药菌的出现与传播又是人们不得不面对的非常棘手的问题。除了规范化管理和使用现有抗生素外^[53]，研发新型抗菌药物也迫在眉睫。噬菌体疗法，光动力疗法以及CRISPR系统都是研究人员针对细菌耐药性所尝试的新型疗法，是将分子生物学、微生物学甚至光化学与临床应用之间的结合。虽然目前来看，这些尝试都还面临着巨大的挑战，但是这在对抗病原菌方面给了我们新的视角和启示，促使我们从不同角度研究开发新的药物。相信未来，我们所面临的一系列问题都将得到很好的解决。

致谢：感谢厦门大学分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室提供的研究平台，感谢厦门大学公共卫生学院病原微生物与抗感染治疗课题组老师和同学在文献撰写方面提供的宝贵意见和帮助。

参考文献

- [1] Perry R D, Fetherston J D. Yersinia pestis--etiologic agent of plague[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10(1): 35-66.
- [2] Drancourt M, Houhamdi L, Raoult D. Yersinia pestis as a telluric, human ectoparasite-borne organism[J]. *Lanc Infect Dis*, 2006, 6(4): 234-241.
- [3] Tenover F C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria[J]. *Am J Infect Control*, 2006, 34(5 Suppl 1): S3-S10.
- [4] Oliphant C M, Green G M. Quinolones: a comprehensive review[J]. *Am Fam Physician*, 2002, 65(3): 455-464.
- [5] 郑卫. 氨基糖苷类抗生素研究的新进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2005, 26(3): 101-110.
- [6] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(5): 263-272.
- [7] 龙泉鑫, 何颖, 谢建平. 喹诺酮类药物作用的生理和遗传的分子机制[J]. 药学学报, 2012, 47(8): 969-977.
- [8] Kampranis S C, Maxwell A. The DNA gyrase-quinolone complex. ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(35): 22615-22626.
- [9] Kohanski M A, Dwyer D J, Collins J J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(6): 423-435.
- [10] Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, et al. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34(6): 1271-1272.
- [11] 夏蕊蕊, 国宪虎, 张玉臻, 等. 喹诺酮类药物及细菌对其耐药性机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(4): 255-261.
- [12] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(8): 2565-2571.
- [13] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *The Lancet*, 2003, 362(9399): 1888-1893.
- [14] 董辉, 钟利, 林茹, 等. 临床分离大肠埃希菌多重耐药菌株与外膜蛋白的相关研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(5): 369-373.
- [15] Armand-Lefevre L, Leflon-Guibout V, Bredin J, et al. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar wien related to porin loss and CMY-4-lactamase production[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(3): 1165-1168.
- [16] Shin S Y, Bae I K, Kim J, et al. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36[J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61(Pt 2): 239-245.
- [17] Chia J H, Siu L K, Su L H, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: Resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency[J]. *J Chemother*, 2009, 21(6): 621-626.
- [18] Rosenberg E Y, Ma D, Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump[J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(6): 1754-1756.
- [19] Aires J R, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(6): 1923-1929.
- [20] 凌保东. 鲍曼不动杆菌抗生素多重耐药性: 耐药机制与感染治疗对策[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(04): 241-254.
- [21] Gales A C, Jones R N, Sader H S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme(2001-2004)[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(4): 315-321.
- [22] 曲芬, 汤一苇, 毛远丽. 多重耐药菌的抗菌治疗[J]. 传染病信息, 2011, 24(2): 72-74.
- [23] Soothill J S. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Burns*, 1994, 20(3): 209-211.
- [24] Biswas B. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(1): 204-210.
- [25] Viertel T M, Ritter K, Horz H P. Viruses versus bacteria--novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(9): 2326-2336.
- [26] Cisek A A, Dabrowska I, Gregorczyk K P, et al. Phage therapy in bacterial infections treatment: One hundred years after the discovery of bacteriophages[J]. *Curr Microbiol*, 74 (2): 277-283.
- [27] Schuch R, Nelson D, Fischetti V A. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*[J]. *Nature*, 2002, 418(6900): 884-889.
- [28] 姜焕焕, 安小平, 米志强, 等. 噬菌体治疗细菌性感染的进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(12): 116-122.
- [29] 赵晨, 王轲. 噬菌体治疗—旧概念, 新阶段[J]. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1698-1704.
- [30] Thompson M G, Corey B W, Si Y, et al. Antibacterial activities of iron chelators against common nosocomial pathogens[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(10), 5419-5421.
- [31] Leseleuc L, Harris G, Lee Kuo R, et al. *In vitro* and *in vivo* biological activities of iron chelators and gallium nitrate against *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(10), 5397-5400.
- [32] Antunes L C, Imperi F, Minandri F, et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(11): 5961-5970.

- [33] Olakanmi O, Kesavalu B, Pasula R, *et al.* Gallium nitrate is efficacious in murine models of tuberculosis and inhibits key bacterial Fe-dependent enzymes[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12): 6074-6080.
- [34] 彭莹莹, 葛海燕. 光动力抗菌化学疗法治疗难治性细菌感染性疾病的研究进展[J]. *中国激光医学杂志*, 2010, 19(1): 50-53.
- [35] Bertoloni G, Lauro F M, Cortella G, *et al.* Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1475(2): 169-174.
- [36] Hamblin M R. Polycationic photosensitizer conjugates: Effects of chain length and gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49(6): 941-951.
- [37] Cassidy C M, Donnelly R F, Tunney M M. Effect of sub-lethal challenge with photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2010, 99(1): 62-66.
- [38] 雷万华, 王雪松. 光动力抗菌光敏剂的研究进展[J]. *影像科学与光化学*, 2013, 31(5): 321-334.
- [39] 宋元林, 白春学, 王琴, 等. 细菌感染的非抗生素治疗研究进展[J]. *微生物与感染*, 2012, 7(4): 202-207.
- [40] 龙智, 周云芳. 非抗生物质抗菌治疗的研究现状[J]. *临床儿科杂志*, 2015, 33(6): 592-596.
- [41] Mojica F J, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, *et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. *J Mol Evol*. 2005, 60(2): 174-182.
- [42] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [43] Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [44] Bikard D, Hatoum-Aslan A, Mucida D, *et al.* CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infection[J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(2): 177-186.
- [45] Vercoe R B, Chang J T, Dy R L, *et al.* Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(4): e1003454.
- [46] Goma A A, Klumpe H E, Luo M L, *et al.* Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems[J]. *MBio*, 2014, 5 (1): 00928-00913.
- [47] Bikard D, Euler C W, Jiang W, *et al.* Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1146-1150.
- [48] Citorik R J, Mimee M, Lu T K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1141-1145.
- [49] Lin T Y, Lo Y H, Tseng P W, *et al.* AT3 and T7 recombinant phage acquires efficient adsorption and a broader host range[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30954.
- [50] Abedon S T, Kuhl S J, Blasdel B G, *et al.* Phage treatment of human infections[J]. *Bacteriophage*, 2011, 1(2), 66-85.
- [51] Kim J S, Cho D H, Park M, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated re-sensitization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* harboring extended-spectrum beta-lactamases[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(2): 394-401.
- [52] Yosef I, Manor M, Kiro R, *et al.* Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(23): 7267-7272.
- [53] 冯晶晶, 王小万, 靖瑞锋. 控制抗生素滥用的国际经验及启示[J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(1): 14-18.