

## •综述•

## 生物膜休眠菌及其靶向治疗研究进展

李明基 朱禹璇 刘鈺逸 罗颀颀 杨浩宇 刘铁鑫 林俊卿 郑宪友

**摘要** 随着抗生素的广泛使用,细菌耐药性问题日益突出。生物膜形成是导致耐药菌不断增加的重要因素,休眠菌是生物膜中一种具有特殊表型的细菌,可导致慢性和复发性感染,由于其来源多样、耐药机制复杂,目前尚无有效治疗措施,探索休眠菌靶向疗法具有重要临床价值。该文就生物膜休眠菌及其靶向治疗研究进展进行综述。

**关键词** 生物膜;休眠菌;靶向治疗;耐药性

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-7083.2024.02.010

生物膜是微生物通过分泌胞外多糖黏附在物体表面形成的一种特殊结构,可保护微生物免受外界因素干扰<sup>[1]</sup>。生物膜的结构分为4层:主体层、连接层、调节层和基质层<sup>[2]</sup>。美国国立卫生研究院报道,约80%的持续性细菌感染与生物膜有关<sup>[3]</sup>。生物膜相关感染不仅增加患者死亡率,还带来巨大经济负担。生物膜深层存在一种体积较小、代谢缓慢的特殊菌群,被认为是一种休眠状态细菌,又称为休眠菌。虽然在生物膜中休眠菌数量只占1%<sup>[4]</sup>,但由于其生物学特性、形态结构、致病性和对环境敏感程度均与普通细菌不同,且是导致感染迁延不愈的重要原因,因此成为研究热点。

### 1 生物膜休眠菌形成

按照生物膜休眠菌产生的原因,可将其分为触发产生、自发产生和突变产生3种类型<sup>[5]</sup>。

触发产生是生物膜休眠菌的主要来源,其指正常细菌在环境因素刺激下转化为休眠菌。目前已发现多种触发休眠菌产生的因素,如营养缺乏<sup>[6]</sup>、pH值<sup>[7]</sup>、DNA损伤<sup>[8]</sup>及细胞间信号作用<sup>[9]</sup>等。营养物质缺乏可导致微生物的生理功能改变,当细菌生长于营养物质丰富的培养基并保持指数生长状态时,休眠菌数量将大大减少。细菌也可通过应急反应(SOS)在恶劣环境下转变为休眠菌。

SOS反应是DNA损伤时的重要反应,当DNA发生损伤或处于应激条件下,RecA蛋白特异地结合单链DNA,形成RecA细丝,触发LexA蛋白降解;LexA失活可导致SOS基因的释放和表达,引发SOS反应。在SOS基因缺陷的细菌中,休眠菌数量通常显著性下降也证实了这一点<sup>[10]</sup>。生物膜休眠菌的形成也与细胞间信号交流有关,如细菌可通过群体感应系统(QS)调节细胞外基质相关基因表达,进而调控生物膜休眠菌形成<sup>[11]</sup>。

休眠菌的自发产生是指在无环境因素刺激下正常细菌转化为休眠菌。在细菌生长的对数期,部分细菌通过表型转换自发地由快速分裂状态转变为生长停滞状态。Dawson等<sup>[12]</sup>研究发现,在微流控芯片中植入指数增长的大肠杆菌后,部分细胞停止分裂,转变为休眠菌<sup>[13]</sup>。这表明,当处于不利条件下,细菌可通过自发产生保留“火种”,避免整个菌群的“全军覆没”。

除上述类型外,基因突变也可使正常细菌转化为休眠菌。Gerdes等<sup>[14]</sup>研究发现,高耐药基因A(*hipA7*)突变,可通过毒素-抗毒素(TA)系统促使大肠杆菌进入休眠状态。*prpR*、*tolC*、*carB*等基因突变也被证实与休眠菌产生有关<sup>[15-17]</sup>。Wang等<sup>[18]</sup>研究发现,抗抑郁药物可以诱导细菌*ompT*、*stfQ*、*stfR*和*tfaD*等基因发生突变,降低细菌通道蛋白表达并诱导氧化应激,促使休眠菌产生。

### 2 生物膜休眠菌耐药机制

生物膜休眠菌在临床上常表现为高耐药性。与常规耐药菌不同,休眠菌耐药性是通过改变其表型获得的<sup>[17]</sup>。研究表明,休眠菌耐药性产生机制主要有3种:休眠失活机制、外排泵机制和QS

基金项目:上海市科学技术委员会“科技创新行动计划”生物医药支撑专项(21S11909100)、上海交通大学医工交叉研究基金(YG2022ZD017)、上海交通大学医学院大学生创新性训练计划(1723X014)

作者单位:200025,上海交通大学医学院(李明基、朱禹璇、刘鈺逸、罗颀颀、杨浩宇);200233 上海,国家骨科医学中心(刘铁鑫、林俊卿、郑宪友);200233,上海交通大学医学院附属第六人民医院骨科(刘铁鑫、林俊卿、郑宪友)

通信作者:郑宪友 E-mail: zhengxianyou@126.com

机制<sup>[19]</sup>。明确休眠菌耐药性的机制可以帮助寻找杀灭休眠菌的特效药物,为根除难治性细菌感染提供新的治疗方案。

### 2.1 休眠失活机制

细菌可通过降低代谢速率进入休眠状态来抵御抗菌药物的作用,TA系统是诱导细菌进入休眠状态的关键途径,其由含2个基因的操纵子组成,分别编码毒素和抗毒素,毒素抑制细菌生长繁殖,抗毒素则抑制毒素产生或中和毒素。由于抗毒素不稳定,在应激条件下可发生降解,导致游离毒素增多,从而抑制细胞活动,诱导细菌进入休眠状态<sup>[20]</sup>。

根据抗毒素中和毒素的机制,TA系统可被分为6种类型(I~VI型),其中I型和III型TA系统中的抗毒素为RNA,其他抗毒素为低相对分子质量蛋白质,而TA系统中的毒素均为蛋白质<sup>[21]</sup>。目前,I型和III型TA系统机制已较为明确。Edelman等<sup>[22]</sup>研究发现,I型TA系统中的TisAB/IstR-I系统与大肠杆菌休眠菌产生有关。在应激条件下,抗毒素RNA减少,导致单链毒素mRNA增多,翻译产生的TisB毒素增多<sup>[23]</sup>。TisB毒素可促进细菌发生SOS反应,诱导休眠菌的触发产生,增强细菌耐药性。Sonika等<sup>[24]</sup>研究发现,II型TA系统中HipBA系统中的毒素分子Hip可引起热不稳定延伸因子(EF-Tu)失活,抑制细菌生长,以达到抵御抗菌药物的作用。

### 2.2 QS机制

QS是一种广泛存在于微生物群落中的细胞间通信系统,细菌合成释放的自诱导物为其起始信号分子<sup>[25]</sup>。当细菌密度达到阈值时,自诱导物与相应受体结合,促进生物膜形成并调节表型性状<sup>[26]</sup>。通过QS系统,单个细菌即可调控菌群的生理特征。根据作用范围,QS系统可分为种内QS系统和种间QS系统。种内QS系统中,革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌具有较大差异。革兰氏阳性菌以自诱导肽(AIP)为信号介导QS系统,调控其生殖、分泌等功能,如枯草芽孢杆菌的孢子形成和金黄色葡萄球菌的毒素分泌。而革兰氏阴性菌以酰基高丝氨酸内酯(AHL)为信号介导QS系统,与转录蛋白LuxR共同构成AHL-LuxR转录因子,促进鼠李糖脂等基因的表达以形成生物膜和增强细菌外排泵功能,增强休眠菌耐药性<sup>[27-28]</sup>。种间QS系统中,革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均以自诱导物-2

(AI-2)为信号介导QS系统<sup>[29]</sup>。LuxS是AI-2合成酶,可与AI-2组成LuxS/AI-2型QS系统<sup>[30]</sup>,影响外排泵SatAB的表达,进而影响休眠菌耐药性。它还通过影响叶酸合成、生物膜和细菌可移动遗传元件来增加休眠菌耐药性<sup>[31]</sup>。

### 2.3 外排泵机制

休眠菌还可通过外排泵将胞内药物泵出,以降低药物作用<sup>[32]</sup>。根据细菌中外排泵利用能量方式和氨基酸序列不同,将其分为5类:三磷酸腺苷(ATP)结合盒(ABC)、主要易化子超家族(MFS)、耐药性结节化细胞分裂家族(RND)、小多重耐药转运分子家族(SMR)、多药和有毒物排出家族(MATE)。目前关于外排泵转运药物的机制有2种,即“真空吸尘器”和“翻转酶模式”<sup>[33]</sup>。“真空吸尘器”通过膜转运蛋白将药物主动运出胞外,由此可解释RND的外排机制,如铜绿假单胞菌中CzcC、CzcB和CzcA蛋白构成的RND系统可充当阳离子转运蛋白,将阳离子抗菌药物排出,提高对阳离子抗生素的耐药性<sup>[34]</sup>。“翻转酶模式”即转运蛋白结合药物后改变其与药物的亲和力,通过翻转将药物泵出胞外。由此可解释多种ABC型外排泵,如吡喹酮可通过调控TCSsBacSR和CpxAR的转录来调控大肠杆菌mdtABC外排泵的基因表达,从而获得耐药性。

## 3 生物膜休眠菌靶向治疗策略

生物膜休眠菌具有特殊表型和耐药性,传统杀菌方法效果甚微。因此,靶向治疗可能为潜在的治疗方法。通过靶向治疗休眠菌感染,对于临床治疗具有重要价值。目前,靶向生物膜休眠菌的治疗方案分2种:①将其杀灭于休眠阶段;②先将休眠菌复苏为代谢活跃细菌再进行杀灭<sup>[35]</sup>。

### 3.1 直接杀灭法

目前,已发现多种药物能在休眠阶段杀灭休眠菌。这些药物通过激活特异的蛋白酶或交联DNA来干扰休眠菌的正常生理功能,引发休眠菌死亡。

ClpP是一类需要ATP依赖性的ClpX蛋白来识别和降解错误折叠蛋白质的蛋白酶。酰基去甲肽(ADEP)4能够靶向激活ClpP蛋白酶以降解核糖体蛋白、细丝温度敏感蛋白等,引起细胞自噬,诱导细胞死亡。由于ClpP蛋白酶作用不受ATP限制,从而表现出对休眠菌良好的杀灭作用。Conlon等<sup>[36]</sup>研究发现,ADEP4可在休眠阶段广泛降解休眠菌

的蛋白质,诱导休眠菌自噬,直接杀灭休眠菌; ADEP4 与利福平、利奈唑胺或环丙沙星等抗生素联合使用具有更好的效果。

顺铂是传统抗癌药物。Chowdhury 等<sup>[37]</sup>研究发现,顺铂还能直接消除肠出血型大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌形成的休眠菌。顺铂能与 DNA 交联,抑制其功能,并可交联多种 RNA (如 siRNA, tRNA 和 rRNA),直接抑制细菌许多重要生理过程,诱导生物膜休眠菌死亡。与之类似, Kwan 等<sup>[38]</sup>研究发现,丝裂霉素 C 也可通过与 DNA 交联直接杀灭休眠菌。

### 3.2 活化杀灭法

休眠菌通过减少生理活动和降低代谢速率来进入休眠状态,规避外界不良环境的影响,从而呈现出极强的抗生素耐药性。因此,可以利用药物活化休眠菌使之进入增殖状态,再使用杀菌药物以达到清除的目的。

顺式-2-癸烯酸可活化铜绿假单胞菌和大肠杆菌休眠菌,其原理是通过促进休眠菌呼吸相关的核酸和蛋白质的转录与表达,使细胞解除休眠状态,完成活化进入增殖状态,再使用抗生素来杀灭休眠菌。研究表明,通过顺式-2-癸烯酸活化休眠菌并与抗生素联合治疗,可明显消灭休眠菌<sup>[39]</sup>。研究还发现,其他脂肪酸分子如十一烷酸、月桂酸和 N-十三烷酸等也同样具有活化休眠菌的作用<sup>[40]</sup>。

腺苷是 ATP 和三磷酸鸟苷 (GTP) 合成的重要原料,可通过提高 ATP 和 GTP 的合成能力,促进细胞呼吸,增强休眠菌的代谢活性,以促进休眠菌复苏<sup>[41]</sup>。值得注意的是,腺苷的作用需要具有完整的电子传递链,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 脱氢酶缺乏会导致腺苷作用能力减弱,这在实际应用中具有重要意义。Allison 等<sup>[42]</sup>研究发现,糖及糖酵解中间产物也能促进休眠菌复苏。葡萄糖、甘露醇、果糖和丙酮酸等代谢产物可被细菌转运到细胞质中进行糖酵解,诱导休眠菌复苏生成 NADH。NADH 氧化供能产生质子动力势能,可促进氨基糖苷类药物的摄取。这些药物再与休眠菌核糖体结合,干扰细菌的翻译过程,导致休眠菌死亡。

正丁醇也能诱导休眠菌活化。正丁醇可以促进氨基糖苷类抗生素摄取,将氨基糖苷类分子快速转运到细胞质中。此外,正丁醇还可损伤细胞膜并增加对氨基糖苷类药物的渗透性<sup>[43]</sup>,增强休

眠菌对抗生素的敏感性。

## 4 结语

尽管目前关于休眠菌机制的认识已有较大突破,但针对休眠菌靶向治疗的研究成果还相当有限。休眠菌靶向治疗技术的研究将为解决生物膜感染的问题提供新思路和新途径。今后,有望结合休眠菌形成原因及其耐药性机理研发特定药物,构建纳米药物载体,靶向消灭生物膜休眠菌,为生物膜相关感染提供有效治疗。

### 参考文献

- [1] Sousa A, Phung AN, Škalko-Basnet N, et al. Smart delivery systems for microbial biofilm therapy: dissecting design, drug release and toxicological features[J]. *J Control Release*, 2023, 354: 394-416.
- [2] Habash M, Reid G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections[J]. *J Clin Pharmacol*, 1999, 39(9): 887-898.
- [3] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections[J]. *J Chin Med Assoc*, 2018, 81(1): 7-11.
- [4] Modi SK, Gaur S, Sengupta M, et al. Mechanistic insights into nanoparticle surface-bacterial membrane interactions in overcoming antibiotic resistance[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1135579.
- [5] Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(7): 441-448.
- [6] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230(1): 13-18.
- [7] Goode O, Smith A, Zarkan A, et al. Persister Escherichia coli cells have a lower intracellular pH than susceptible cells but maintain their pH in response to antibiotic treatment[J]. *MBio*, 2021, 12(4): 10.1128/mbio.00909-21.
- [8] Zou J, Peng B, Qu J, et al. Are bacterial persisters dormant cells only?[J]. *Front Microbiol*, 2022, 12: 4206.
- [9] Ruiz CH, Osorio-Llanes E, Trespalacios MH, et al. Quorum sensing regulation as a target for antimicrobial therapy[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2022, 22(6): 848-864.
- [10] Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure[J]. *Science*, 2016, 354(6318): aaf4268.
- [11] Ge C, Sheng H, Chen X, et al. Quorum sensing system used as a tool in metabolic engineering[J]. *Biotechnol J*, 2020, 15(6): 1900360.
- [12] Dawson E, Şimşek E, Kim M. Observing bacterial persistence at single-cell resolution[J]. *Methods Mol Biol*, 2021: 85-93.
- [13] Kaldalu N, Hauryliuk V, Turnbull KJ, et al. In vitro studies of persister cells[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2020, 84(4): e00070-20.
- [14] Gerdes K, Bærentsen R, Brodersen DE. Phylogeny reveals novel HipA-homologous kinase families and toxin-antitoxin gene organizations[J]. *MBio*, 2021, 12(3): 10.1128/mbio.01058-21.
- [15] Hicks ND, Yang J, Zhang X, et al. Clinically prevalent mutations in *Mycobacterium tuberculosis* alter propionate metabolism and mediate

- multidrug tolerance[J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(9): 1032-1042.
- [16] Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(8): 2003-2020.
- [17] Cameron DR, Shan Y, Zalis EA, et al. A genetic determinant of persister cell formation in bacterial pathogens[J]. *J Bacteriol*, 2018, 200(17): e00303-18.
- [18] Wang Y, Yu Z, Ding P, et al. Antidepressants can induce mutation and enhance persistence toward multiple antibiotics[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2023, 120(5): e2208344120.
- [19] Kouhsari E, Kaviar VH, Asadi A, et al. Bacterial persister cells: mechanisms of formation, control, and eradication[J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2023, 23(7): 17-28.
- [20] LeRoux M, Laub MT. Toxin-antitoxin systems as phage defense elements[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2022, 76: 21-43.
- [21] Singh G, Yadav M, Ghosh C, et al. Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence[J]. *Curr Res Microb Sci*, 2021, 2: 100047.
- [22] Edelmann D, Berghoff BA. A shift in perspective: a role for the type I toxin TisB as persistence-stabilizing factor[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 871699.
- [23] Edelmann D, Leinberger FH, Schmid NE, et al. Elevated expression of toxin TisB protects persister cells against ciprofloxacin but enhances susceptibility to mitomycin C[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 943.
- [24] Sonika S, Singh S, Mishra S, et al. Toxin-antitoxin systems in bacterial pathogenesis[J]. *Heliyon*, 2023, 9(4): e14220.
- [25] Huang L, Wu C, Gao H, et al. Bacterial multidrug efflux pumps at the frontline of antimicrobial resistance: an overview[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(4): 520.
- [26] Azimi S, Klementiev AD, Whiteley M, et al. Bacterial quorum sensing during infection[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2020, 74: 201-219.
- [27] Liu L, Zeng X, Zheng J, et al. AHL-mediated quorum sensing to regulate bacterial substance and energy metabolism: a review[J]. *Microbiol Res*, 2022: 127102.
- [28] Li Y, Feng T, Wang Y. The role of bacterial signaling networks in antibiotics response and resistance regulation[J]. *Mar Life Sci Technol*, 2022, 4(2): 163-178.
- [29] Fan Q, Wang H, Mao C, et al. Structure and signal regulation mechanism of interspecies and Interkingdom quorum sensing system receptors[J]. *J Agri Food Chem*, 2022, 70(2): 429-445.
- [30] Deng Z, Hou K, Valencak TG, et al. AI-2/LuxS quorum sensing system promotes biofilm formation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and enhances the resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* and enhances the resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* in germ-free zebrafish[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e00610-22.
- [31] Wang Y, Liu B, Grenier D, et al. Regulatory mechanisms of the LuxS/AI-2 system and bacterial resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(10): 10.1128/aac.01186-19.
- [32] Nishino K, Yamasaki S, Nakashima R, et al. Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 737288.
- [33] Lv B, Bian M, Huang X, et al. n-Butanol potentiates subinhibitory aminoglycosides against bacterial persisters and multidrug-resistant MRSA by rapidly enhancing antibiotic uptake[J]. *ACS Infect Dis*, 2022, 8(2): 373-386.
- [34] Hassan MT, van der Lelie D, Springael D, et al. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Gene*, 1999, 238(2): 417-425.
- [35] Wood TK. Strategies for combating persister cell and biofilm infections[J]. *Microb Biotechnol*, 2017, 10(5): 1054-1056.
- [36] Conlon BP, Nakayasu ES, Fleck LE, et al. Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection[J]. *Nature*, 2013, 503(7476): 365-370.
- [37] Chowdhury N, Wood TL, Martínez-Vázquez M, et al. DNA-crosslinker cisplatin eradicates bacterial persister cells[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(9): 1984-1992.
- [38] Kwan BW, Chowdhury N, Wood TK. Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C[J]. *Environ Microbiol*, 2015, 17(11): 4406-4414.
- [39] Kalita S, Kandimalla R, Bhowal AC, et al. Functionalization of  $\beta$ -lactam antibiotic on lysozyme capped gold nanoclusters retrogress MRSA and its persisters following awakening[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5778.
- [40] Jin X, Zhou J, Richey G, et al. Undecanoic acid, lauric acid, and N-tridecanoic acid inhibit *Escherichia coli* persistence and biofilm formation[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2021, 31(1): 130.
- [41] Kitzenberg DA, Lee JS, Mills KB, et al. Adenosine awakens metabolism to enhance growth-independent killing of tolerant and persister bacteria across multiple classes of antibiotics[J]. *Mbio*, 2022, 13(3): e00480-22.
- [42] Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides[J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 216-220.
- [43] Zhang SP, Feng HZ, Wang Q, et al. Bacterial type II toxin-antitoxin systems acting through post-translational modifications[J]. *Comp Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 86-93.

( 收稿日期 : 2023-09-15)

( 本文编辑 : 杨晓娟)