

DOI:10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20205560

· 综述 ·

## 持留菌形成机制及治疗研究进展

刘小龙<sup>1</sup>, 杨万霞<sup>2</sup>, 马延龄<sup>1</sup>, 王 丹<sup>1</sup>, 陈 昊<sup>1</sup>

(兰州大学第二医院 1. 肿瘤外科; 2. 检验科, 甘肃 兰州 730030)

**[摘要]** 持留菌在细菌群体中可耐受致死剂量药物及其他压力环境而存活的细菌亚群, 普遍存在于细菌各个种类, 甚至部分真核生物亦发现持留菌, 是未发生遗传突变且不会被抗菌药物杀伤的特殊表型变异细胞, 有学者认为是细菌的一种适应及进化形式。持留菌通过复杂的休眠机制来抵抗外界环境的不良刺激, 其脱离休眠状态后又会重新生长增殖的特性导致临床多种感染性疾病治疗失败或迁延复发, 以及增强遗传耐药变异的发展, 这对感染性疾病的诊治带来巨大挑战, 也给人类健康带来严重威胁。本文从持留菌特性、持留机制及临床治疗上进行综述, 为临床研究持留菌提供思考和帮助。

**[关键词]** 持留菌; 持留机制; 治疗; 研究进展

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2

## Research progress in the formation mechanism and treatment of persister

LIU Xiao-long<sup>1</sup>, YANG Wan-xia<sup>2</sup>, MA Yan-ling<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, CHEN Hao<sup>1</sup> (1. Department of Oncology Surgery; 2. Department of Laboratory Medicine, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

**[Abstract]** Persister is a subpopulation of bacteria that can tolerate lethal doses of drugs in the bacterial population and survive in other stressful environment, it is ubiquitous in various species of bacteria, and even exists in some eukaryotes. It is phenotypic mutant that does not have genetic mutation and will not be killed by antimicrobial agents, which are considered by some scholars to be an adaptive and evolutionary form of bacteria. Persister resists the adverse stimulation of the external environment through a complex dormancy mechanism, recovery of proliferation after detaching the dormant state leads to the failure of clinical treatment, prolongation and recurrence of multiple infectious diseases, and enhancement of genetic resistance mutation, which poses a great challenge to the diagnosis and treatment of infectious diseases, shows a great threat to human health. This article comprehensively summarizes the characteristics, mechanism and clinical treatment of persister, and provides new ideas and help for future research about persister.

**[Key words]** persister; persistence mechanism; treatment; research progress

1944 年 Joseph Bigger 第一次提出持留菌概念, 持留菌和持留表型是微生物对不利环境的一种适应性方式。抗菌药物治疗细菌感染时, 几乎不可能实现完全消灭细菌, 最常见的原因是耐药菌的存在。但是即使细菌对抗菌药物敏感, 菌群中总是含有一小部分能够耐受抗菌药物致死活性的群体, 该

亚群由持留菌组成, 在遗传上与其他细菌相同, 但其耐受表型不同, 在抗菌药物环境下进入休眠状态, 表现出对抗菌药物迟钝的反应能力来逃逸抗菌药物的杀伤作用, 待抗菌药物被代谢清除后, 持留菌则又恢复其生长能力, 导致临床治疗失败和感染复发, 这是持留菌的持留特点。到目前为止, 几乎所有被检测

[收稿日期] 2019-07-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670594)

[作者简介] 刘小龙(1991-), 男(汉族), 甘肃省定西市人, 硕士研究生, 主要从事肠道微生态研究。

[通信作者] 陈昊 E-mail: ery\_chenh@lzu.edu.cn

的细菌物种都已确定存在持留菌,甚至是真核微生物亦存在该表型的群体。目前研究证明,抗菌药物无法根除持留菌,进行体外抗菌药物试验发现,持留菌水平会持续升高,并且发现在疾病急性期或者早期持留菌水平较低,而在慢性感染中持留菌表达水平显著升高。这种具有逃逸性、适应性的特殊群体导致了临床迁延反复感染,给未来临床抗菌药物治疗带来巨大挑战。持久性细胞的临床意义不仅仅局限于复发感染,因为其构成一个免受致命抗菌药物杀灭的细胞亚群,在抗菌药物存在下仍然存活,并且可以积累抗性突变。这对未来抗菌药物使用具有潜在性威胁,极大危害人类健康<sup>[1]</sup>。

## 1 持留特性

随机形成、对抗菌药物敏感表型可逆是持留菌最大的特点,持留菌不同于耐药菌,并未发生基因突变,只是单纯抗菌药物敏感程度发生改变,在高浓度抗菌药物环境下处于静止或休眠状态,对抗菌药物呈现迟钝效应,高浓度过后又恢复对抗菌药物的敏感性,是一种特殊的高持留突变。持留菌休眠状态并非一切生理功能的停止,只是处于一种低活力状态,另外 Drescher 等<sup>[2]</sup>发现同一菌株在不同的环境下能诱导出不同的持留菌,可能是微生物互补的生存策略。

## 2 持留机制

2.1 免疫调控与持留表型 细胞因子信号转导抑制分子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)家族分子,能负反馈抑制细胞因子信号转导通路,SOCS-1 是 SOCS 家族的一员,某些病原体可以通过上调 SOCS-1 逃避宿主免疫攻击。病原微生物被巨噬细胞、树突状细胞 TLR 受体识别后,启动下游信号通路发挥免疫作用,发挥抗感染作用, Mal 是 TLR2、TLR4 的下游信号通路的主要调节靶点,SOCS-1 蛋白通过对 Mal 进行泛素化降解抑制免疫应答,使炎症因子减少,使病原微生物逃避宿主免疫应答<sup>[3-5]</sup>。持留菌亦是通过 SOCS-1 抑制 Mal 途径发挥免疫逃逸,通过 TLR4 诱导 SOCS-1 的表达,SOCS-1 沉默后解除了对 Mal 的抑制,肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6、IL-1 $\beta$  等炎症因子表达会明显上调,形成持留菌的 TLR4-SOCS-1-Mal 的持留菌免疫逃逸途径<sup>[6]</sup>。

2.2 生物被膜与持留表型 大部分感染性疾病都与生物膜有关,存在于生物膜的微生物易躲避抗菌药物的清除,持留菌的持留与其菌落形成的生物膜密切相关,生物被膜在持留菌和免疫大分子之间形成屏障,亦保护持留菌免受抗菌药物侵害,与其持留作用密切相关,研究<sup>[6-8]</sup>表明持留菌产生生物被膜的能力强于无持留能力的一般细菌,如在肺炎克雷伯菌持留菌与标准菌株对比中,持留菌被龙胆紫染色显著深于对照组<sup>[6]</sup>;另外生物膜中的持留菌其数量、耐药性均强于游离持留菌<sup>[9]</sup>,当致死量抗菌药物作用时,非持留菌和游离持留菌可被杀灭,生物膜中持留菌得以生存;Grant 等<sup>[10]</sup>提出“保护环境”理论,如人体一些生理性体腔、屏障等,抗菌药物难以到达或通过,又如结核分枝杆菌形成的肉芽肿,都有效躲避了药物及人体免疫系统的清除,同样生物膜亦是持留菌的“保护环境”,持留菌除了自身的耐药特性外,亦与生物膜形成的微环境密不可分<sup>[11]</sup>。

2.3 代谢与持留表型 微生物内 ATP 水平与持留菌的持留特性有关<sup>[12]</sup>,研究<sup>[13]</sup>表明金黄色葡萄球菌变为持留菌进入休眠状态后,细胞内的 ATP 水平下降,而且细胞休眠状态的标志物在抗菌药物攻击时,表达量会上升 100~1 000 倍,亦有试验研究<sup>[14-15]</sup>表明随着 ATP 消耗,持留菌的数目越来越多,为了进一步验证 ATP 与持留菌形成的关系,有研究<sup>[16]</sup>在培养微生物的培养基里增加 ATP,发现随着培养时间延长,持留菌形成会逐渐减少。

2.4 毒素蛋白/抗毒素蛋白失衡与持留表型 毒素/抗毒素系统是研究比较成熟的持留菌持留机制<sup>[17]</sup>,毒素/抗毒素系统主要在细菌线粒体,但其功能尚未阐明,但其在持留菌的特性中发挥重要作用<sup>[18-20]</sup>。毒素/抗毒素是广泛存在于原核生物体内的一对操纵子,一个编码毒素蛋白,另一个编码抗毒素蛋白,毒素蛋白抑制遗传物质复制、蛋白翻译、细胞周期等过程<sup>[21]</sup>,抗毒素蛋白调控毒素蛋白表达并及时对其降解,其中毒素蛋白会引起持留菌的形成<sup>[22]</sup>;hipA 在大肠埃希菌发现的编码毒素蛋白的基因,编码的毒素蛋白使微生物活性区域失活而增加微生物对不良环境的耐受性<sup>[23-25]</sup>。

## 3 持留菌的治疗

持留菌的休眠特性使多种抗菌药物治疗靶点失活,导致多种抗菌药物无法将其清除<sup>[26]</sup>,临床上治疗持留菌的方法主要有使用抗菌药物及物理、化学、

生物效应等方法。

3.1 联合应用抗菌药物 联合应用抗菌药物并根据药敏试验结果调整抗菌药物的种类和剂量,或辅以抗菌药物增敏剂来达到杀灭持留菌的目的,这是临床最常用的手段<sup>[27-28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>发现短时间内使用高剂量利福平能更快的清除小鼠结核分枝杆菌内脏感染,亦有学者发现延长抗菌药物作用时间虽然能清除病原菌,但是容易形成高突变持留菌,导致慢性感染反复<sup>[30]</sup>,说明延长抗菌药物使用时间并不可取,容易滋生持留菌。在抗菌药物使用同时,加以甘露醇、溶解态氧可有效杀灭病原菌<sup>[31-32]</sup>。

### 3.2 非抗菌药物

3.2.1 低水平直流电 低水平直流电对持留菌具有杀伤作用,应用 70  $\mu\text{A}/\text{cm}$  的直流电可以杀伤 98% 的铜绿假单胞菌,并且对铜绿假单胞菌持留菌呈现致死性杀伤,而且使用低水平直流电联合抗菌药物有更好的效果,具有协同作用<sup>[32]</sup>,对控制与植入式医疗器械导致的慢性感染有极大的帮助。

3.2.2 溶菌性噬菌体 持留菌在高浓度抗菌药物环境中会进入休眠状态,再次进入生长状态会引起迁延感染,溶菌性噬菌体会对重新生长阶段的持留菌杀伤,但对休眠状态的持留菌无法溶解清除<sup>[33]</sup>,从生长状态减少持留菌的形成,有效降低持留菌的数量,对控制感染具有重要意义。

3.2.3 分子抑制剂 在毒素/抗毒素体系中,毒素蛋白会可逆的抑制细胞的复制、转录及翻译,但当毒素蛋白持续作用时,细胞则会发生不可逆的生长停滞,因此,Lioy 等<sup>[34]</sup>验证了通过破坏毒素/抗毒素模式的方法让毒素蛋白持续杀灭持留菌,不能再生长增殖。BF8 是革兰阴性菌群体感应系统抑制物,能使持留菌从休眠状态转换为对抗菌药物敏感状态,达到杀伤持留菌的目的,C10 亦可逆转持留菌的抗菌药物敏感性,改变其休眠状态<sup>[35]</sup>。

## 4 持留菌的重要价值

4.1 持留菌对于临床研究的意义 持留菌由于逃逸致死抗菌药物杀伤的特性,使临床很多疾病都迁延不愈,反复发作,因此,针对持留菌的持留特性,临床上已经逐渐出现很多治疗手段,如低水平直流电、溶解性噬菌体等,这些对疾病的彻底治愈都具有很好的帮助。

4.2 持留菌对于微生物种群的意义 持留表型通常被认为是微生物种群一种“赌注/保值”,从而避免

种群灭绝手段,整个种群把赌注放在非生长或缓慢生长的持留菌,但这些表型变异体很好地适应未来的压力环境,从而使种群免于灭绝<sup>[36]</sup>。

## 5 讨论

持留菌是细菌对于外界不良环境的应激生存状态,属于一种进化形式,目前发现持留表型不仅存在于细菌,真核生物中亦出现持留菌<sup>[37]</sup>,持留菌于抗菌药物环境中变为休眠或者静止状态,呈现出对抗菌药物的惰性,待抗菌药物过后,又会重新生长增值,并且恢复其对抗菌药物的敏感性,其躲避抗菌药物的形式不同于耐药菌,且未发生基因突变。

持留菌的形成目前发现与生物膜的保护作用、胞内低 ATP 状态、毒素蛋白的作用、免疫调控等有关,临床亦出现了针对持留菌休眠状态的治疗方法,这对临床多种感染性疾病反复迁延的治疗很有针对性,相信不久将会有更多清除持留菌的新技术、新方法。

由于持留菌与临床治疗相关,其治疗方法主要分为抗菌药物联合治疗和非抗菌药物法,分为直接杀灭休眠状态的持留菌、使休眠状态持留菌重新获敏、干扰持留菌形成三条策略<sup>[38]</sup>。Joseph Bigger 第一次发现持留菌并提及持留菌清除方法,从持留菌的状态转化角度提出,分段或者间歇性使用抗菌药物可以使持留菌从休眠状态苏醒,恢复对抗菌药物的敏感性,继而达到后续杀灭的目的,Kim 等<sup>[35]</sup>发现 C10 和顺式-癸酸能够恢复杆菌和通路假单胞菌持留菌的休眠状态,使其重新对不同种类的抗菌药物敏感。菌膜去极化或直接破坏细胞膜,DNA 交联,抑制必需酶和反应性氧化应激产生均是潜在的方法,Hurdle 等<sup>[39]</sup>认为细菌双层膜及膜重要功能蛋白可作为直接杀灭持留菌的靶点,虽然持留菌特殊的休眠表型和低代谢状态,但仍需要完整的细胞膜保持其生存能力,Hu 等<sup>[40]</sup>发现氟喹诺酮衍生的 HT6 明显抑制对非倍增金黄色葡萄球菌细胞的活性,破坏细胞膜和去极化,能够杀灭持留菌和耐药菌,增强已用抗菌药物的效果。亦有学者通过质和肽因子复苏金黄色葡萄球菌持留状态,恢复抗菌药物杀伤的敏感性。持留菌产生的原因是外界各种原因刺激,因此,抑制应激信号,干扰持留菌形成是从源头上对其进行杀灭,Starkey 等<sup>[41]</sup>发现抑制假单胞菌中的群体感应调节因子 MfvR 可明显减少该类持留菌数目,抑制应激信号 ppGpp 可使多个革兰阳

性菌持留菌数目减少,虽然消除现有的持留菌极大地促进有效治疗,但在抗菌药物治疗之前抑制或减少其形成可有效预防感染<sup>[38]</sup>。

本综述总结了持留菌的特点、形成机制及治疗策略和手段,希望提高临床对持留菌及其预防和治疗手段的认识,解决顽固性感染问题,减少抗药性发展的机会,减少患者的身体负担和经济负担。

#### [参 考 文 献]

[1] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318 - 1322.

[2] Drescher SPM, Gallo SW, Ferreira PMA, et al. *Salmonella enterica* persister cells form unstable small colony variants after in vitro exposure to ciprofloxacin[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7232.

[3] Kobayashi T, Takaesu G, Yoshimura A. Mal-function of TLRs by SOCS[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(2): 123 - 124.

[4] Mansell A, Smith R, Doyle SL, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(2): 148 - 155.

[5] Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K, et al. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling[J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1840 - 1847.

[6] 秦琴. 临床感染持留菌的筛选及其感染免疫机制研究[D]. 上海:第二军医大学, 2016.

[7] Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, et al. D-amino acids trigger biofilm disassembly[J]. *Science*, 2010, 328(5978): 627 - 629.

[8] Waters EM, Rowe SE, O'gara JP, et al. Convergence of *Staphylococcus aureus* persister and biofilm research: can biofilms be defined as communities of adherent persister cells? [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(12): e1006012.

[9] Olson ME, Ceri H, Morck DW, et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics[J]. *Can J Vet Res*, 2002, 66(2): 86 - 92.

[10] Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response[J]. *Virulence*, 2013, 4(4): 273 - 283.

[11] Svenningsen MS, Veress A, Harms A, et al. Birth and resuscitation of (p)ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6056.

[12] Braetz S, Schwerk P, Thompson A, et al. The role of ATP pools in persister cell formation in (fluoro)quinolone-susceptible and-resistant strains of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 210: 116 - 123.

[13] Conlon BP, Rowe SE, Gandt AB, et al. Persister formation in

*Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1: 16051.

[14] Chen X, Li G, Liao X, et al. A switch in the poly(dC)/RmlB complex regulates bacterial persister formation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 27.

[15] Spanka DT, Konzer A, Edelmann D, et al. High-throughput proteomics identifies proteins with importance to postantibiotic recovery in depolarized persister cells[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 378.

[16] Wang Y, Bojer MS, George SE, et al. Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10849.

[17] Paul P, Sahu BR, Suar M. Plausible role of bacterial toxin-antitoxin system in persister cell formation and elimination[J]. *Mol Oral Microbiol*, 2019, 34(3): 97 - 107.

[18] Gurnev PA, Ortenberg R, Dörr T, et al. Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(16): 2529 - 2534.

[19] Rotem E, Loinger A, Ronin I, et al. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(28): 12541 - 12546.

[20] 苏国明, 杨丽青, 张丽华. 毒素-抗毒素系统介导持留菌形成机制的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2017, 45(3): 57 - 61.

[21] Choudhary E, Sharma R, Kumar Y, et al. Conditional silencing by CRISPRi reveals the role of DNA gyrase in formation of drug-tolerant persister population in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 70.

[22] Fasani RA, Savageau MA. Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(27): E2528 - E2537.

[23] Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, et al. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA[J]. *Mol Cell*, 2013, 52(2): 248 - 254.

[24] Goormaghtigh F, Fraikin N, Putrinš M, et al. Reply to holden and errington, "type II toxin-antitoxin systems and persister cells" [J]. *mBio*, 2018, 9(5), pii: e01838 - 18.

[25] Holden DW, Errington J. Type II toxin-antitoxin systems and persister cells [J]. *MBio*, 2018, 9(5), pii: e01574 - 18.

[26] Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(1): 48 - 56.

[27] Chung ES, Ko KS. Eradication of persister cells of *Acinetobacter baumannii* through combination of colistin and amikacin antibiotics [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(5): 1277 - 1283.

[28] De Miranda Silva C, Hajihosseini A, Myrick J, et al. Effect of moxifloxacin plus pretomanid against *Mycobacterium tuberculosis* in log phase, acid phase, and nonreplicating-persister phase in an in vitro assay [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(1), pii: e01695 - 18.

- [29] Hu Y, Liu A, Ortega-Muro F, et al. High-dose rifampicin kills persisters, shortens treatment duration, and reduces relapse rate in vitro and in vivo[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 641.
- [30] Cogan NG, Szomolay B, Dindos M. Effect of periodic disinfection on persisters in a one-dimensional biofilm model[J]. *Bull Math Biol*, 2013, 75(1): 94 – 123.
- [31] Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides[J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 216 – 220.
- [32] Grant SS, Kaufmann BB, Chand NS, et al. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(30): 12147 – 12152.
- [33] Pearl S, Gabay C, Kishony R, et al. Nongenetic individuality in the host-phage interaction [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(5): e120.
- [34] Lioy VS, Rey O, Balsa D, et al. A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development [J]. *Plasmid*, 2010, 63(1): 31 – 39.
- [35] Kim JS, Heo P, Yang TJ, et al. Selective killing of bacterial persisters by a single chemical compound without affecting normal antibiotic-sensitive cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11): 5380 – 5383.
- [36] Kussell E, Leibler S. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments [J]. *Science*, 2005, 309(5743): 2075 – 2078.
- [37] Wuyts J, Van Dijk P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(10): e1007301.
- [38] Wilmaerts D, Windels EM, Verstraeten N, et al. General mechanisms leading to persister formation and awakening [J]. *Trends Genet*, 2019, 35(6): 401 – 411.
- [39] Hurdle JG, O’neill AJ, Chopra I, et al. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(1): 62 – 75.
- [40] Hu Y, Shamaei-Tousi A, Liu Y, et al. A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: a novel topical antibiotic for staphylococcal infections [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11818.
- [41] Starkey M, Lepine F, Maura D, et al. Identification of antivirulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(8): e1004321.

(本文编辑:陈玉华)

**本文引用格式:**刘小龙,杨万霞,马延龄,等.持留菌形成机制及治疗研究进展[J].中国感染控制杂志,2020,19(2):184–188. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20205560.

**Cite this article as:** LIU Xiao-long, YANG Wan-xia, MA Yan-ling, et al. Research progress in the formation mechanism and treatment of persister [J]. *Chin J Infect Control*, 2020, 19(2): 184 – 188. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20205560.