



对硝基苯酚对细菌产生持留菌的影响及其相关机制

魏维, 方杰, 李根, 陈旭, 李博, 李辉信, 胡锋, 武俊*

南京农业大学资源与环境学院, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】研究对硝基苯酚(PNP)对大肠杆菌和铜绿假单胞菌产生持留菌的影响, 并对转录组进行分析, 阐明对硝基苯酚影响持留菌形成的相关机制。【方法】采用氧氟沙星抗生素探究对硝基苯酚对细菌产生持留菌的影响, 并通过检测细菌自溶情况和呼吸抑制剂羧酰氰氯苯腈(CCCP)对持留菌比例的影响, 然后通过转录组分析其相关基因的表达, 最后通过实时荧光定量 PCR 和反义核酸进行相关功能基因的验证。【结果】PNP 可以通过抑制大肠杆菌和铜绿假单胞菌的呼吸作用使其产生持留菌的比例增加, PNP 不同浓度、作用不同时间和作用不同生长时期的菌体都会影响细菌产生持留菌的比例。PNP 和呼吸抑制剂 CCCP 均能够抑制 2 个菌体的自溶情况, 包括溶解氧含量的变化、蛋白质降解情况、细胞尺寸的变化和 RNA 完整性。转录组分析和实时荧光定量 PCR 实验结果表明加入 PNP 后, *cyoA*、*appC* 两个基因在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中的表达量均显著下降, 再通过反义核酸抑制 *cyoA*、*appC* 的表达发现持留菌的比例和原始菌株相比均有所增加。【结论】PNP 可以通过抑制细胞呼吸作用来增加细菌产生持留菌的比例。

关键词: 持留菌, 大肠杆菌, 铜绿假单胞菌, 对硝基苯酚, 细胞呼吸

持留菌是某个细菌群体中一定比例表型异化的小亚群, 它可通过临时休眠或缓慢生长来耐受致死浓度抗菌药物的作用^[1]。持留菌主要通过“休眠-生长-增殖”的模式来应对逆境的胁迫, 从而维持自身生存和菌体结构稳定。细菌耐药持留现象最早由 Bigger 在治疗金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)感染时发现, 随后在大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)等细菌中证实了持留菌的存在^[2-5]。由于细菌持留与反复感染、慢性感染的治疗失败等密切相关, 且持留菌的长期存在增加了菌株不断获得外源基因(耐药基因)的几率, 所以有关持留菌及其形成机制长期以来引起科学工作者们的广泛关注。

近年来, 一些外源化合物(例如氰化钾、一氧化氮、吡啶)对持留菌影响的相关机制研究越来越

基金项目: 国家自然科学基金(31470551); 中央高校基本科研业务费(KYZ201409, KYTZ201404)

*通信作者。Tel/Fax: +86-25-84395815; E-mail: wujun2013@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-01-03; 修回日期: 2017-02-17; 网络出版日期: 2017-05-11

受到重视。在大肠杆菌中, 氰化钾通过抑制呼吸作用或者在厌氧条件下均可以减少持留菌的数量 1000 倍^[6]; 一氧化氮也可以通过抑制呼吸作用减少持留菌的数量^[7]; 吡啶可以通过上调氧化应激及噬菌体休克通路的相关基因来增加持留菌的产生^[8]。在铜绿假单胞菌中, 吩嗪绿脓菌素和 AIN-3-氧代十二烷酰-高丝氨酸内酯在菌体对数生长期中都可以显著提高细菌产生持留菌的比例^[9], 而对大肠杆菌中的持留菌并没有显著变化。前期研究对一些有机污染物是否影响持留菌比例进行验证, 结果证明 PNP 会显著增加持留菌比例。PNP 是美国环保局分类的一种优先控制污染物之一, 广泛用于有机合成工业和生产杀虫剂^[10], 不断地在废水、河流、湖泊、土壤、空气和地下水中检出, 在废水中对硝基苯酚含量为 3000–8000 mg/L^[11], 严重威胁人体健康和水体安全^[12], 并且 PNP 对细菌产生持留菌的影响还未见报道。

因此, 本研究的目的是探究 PNP 对大肠杆菌和铜绿假单胞菌产生持留菌的影响及其相关机制。在本研究中, 首先比较了 PNP 对两种菌体的持留菌比例的影响, 并对其在不同浓度、不同作用时间和细菌生长不同时期下的持留菌比例的变化做出分析。然后, 通过 CCCP 和 PNP 对细胞自溶情况的检测, 推测可能是 PNP 对细胞呼吸有抑制作用, 最后通过转录组分析、实时荧光定量 PCR 和反义核酸进一步验证 PNP 影响持留菌比例的相关机制。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养基

本实验所用的菌株和质粒见表 1。大肠杆菌、铜绿假单胞菌均用 LB 培养基培养, 并在必要情况

表 1. 本实验所用菌株和质粒

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> O157:H7	Wild type strain	This study
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild type strain	This study
<i>E. coli</i> DH5 α	Plasmid vector	TaKaRa
Plasmid MCS5	Cloning vector	This study
Plasmid MCS5-RFP	Expression plasmid containing RFP, Gm ^r	This study

下在培养基中添加抗生素, 抗生素选择庆大霉素, 其浓度为 50 mg/L。

1.2 大肠杆菌和铜绿假单胞菌生长曲线的测定

从 -80 °C 冰箱中将冻存的大肠杆菌和铜绿假单胞菌复苏, 挑取单菌落接种到 3 mL LB 培养基中, 置于恒温摇床上 37 °C、250 r/min 过夜培养 12 h 后测定 OD_{600} 。将菌液以 1:100 的比例接种到新鲜的 LB 培养基中, 以接种时为零点, 每隔 2 h 测定 1 次菌液的 OD_{600} 值。

1.3 试管二倍稀释法对铜绿假单胞菌和大肠杆菌最低抑菌浓度(MIC 值)的测定

排列无菌试管 2 列, 每列 10 管。除第 1 管加入菌液 1.5 mL 外, 其余各管均加入 1.0 mL, 然后向第 1 管加入氧氟沙星抗生素 0.5 mL, 混匀后吸出 1.0 mL 加入第 2 管中, 用同法依次 2 倍稀释至第 9 管, 弃去 1.0 mL, 第 10 管为生长对照, 每种菌重复 2 次。37 °C 培养 16–18 h 后观察结果。如果试管澄清透明, 摇匀后仍透明, 认为试管无菌生长, 若试管呈现浑浊状态, 表明有菌生长, 以无菌生长的最低浓度为 MIC^[13]。

1.4 持留菌的测定

首先, 将划有大肠杆菌的平板, 挑取单菌落接种到 3 mL LB 试管中, 过夜培养后以 5% 接种量接种到盛有 40 mL LB 液体培养基的 100 mL 三角

瓶中, 37 °C、250 r/min 培养到对数生长中期。然后转移 3 mL 培养液到 LB 试管中, 加入 DMSO 溶解的 PNP (100 mg/L)。同时取 3 mL 培养液, 加入等量的 DMSO 作为对照, 37 °C 培养 1 h, 稀释涂板计数。最后向剩余的培养液中加入氧氟沙星 5 mg/L (100×MIC), 于 37 °C、250 r/min 继续培养 3 h, 用稀释涂板的计数方法定量存活的持留菌(通常认为抗生素处理敏感菌后存活的细胞为持留菌)^[6]。

将划有铜绿假单胞菌的平板挑取单菌落接种到 3 mL LB 试管中, 与大肠杆菌不同的是, 在培养过程中菌体以 1% 的接种量接种至盛有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、250 r/min 条件下培养至对数生长中期, 加入 PNP、DMSO (100 mg/L) 后对菌落进行计数, 再加入氧氟沙星 5 mg/L (50×MIC), 继续培养 3 h, 稀释涂板计数^[9]。

1.5 蛋白质降解

重新构建的大肠杆菌和铜绿假单胞菌携带 MCS5-RFP 质粒, 引物序列为 RFP (F_{RFP}: 5'-GGgtacc ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATA-3', R_{RFP}: 5'-CCCaagcttCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC G-3')。菌体过夜培养, 大肠杆菌按 5% 的接种量、铜绿假单胞菌按 1% 的接种量分别接种至 40 mL 和 100 mL LB 液体培养基, 待培养到对数生长中期时加入 PNP (100 mg/L) 和 1 mmol/L IPTG 继续培养 1 h, 细胞用 PBS 缓冲液稀释到 $OD_{600}=0.1$ 时, 然后使用酶标仪在 558/583 nm 吸收波长/发射波长测量其吸光度^[6-7], 并且以 PBS 缓冲液做为对照。

1.6 RNA 提取

Trizol 法提取 RNA: (1) 取 2-3 mL 菌液于 12000 r/min、4 °C 离心 5 min 后收集沉淀, 加入 1 mL Trizol Reagent 反复抽吸混匀。(2) 于 12000 r/min、4 °C 离心 10 min, 将上清转入 2 mL 新管后于

15-30 °C 静置 5 min, 然后加入 1/5 体积量的氯仿 (约 0.2 mL), 大力摇 15 s 后于室温静置 2-3 min。

(3) 将样品置于 4 °C、12000 r/min 离心 15 min 后转水相至 1.5 mL 离心管, 于 15-30 °C 下加入等体积异丙醇, 轻轻上下颠倒混匀 10 min。(4) 然后置于 12000 r/min、4 °C 离心 10 min, 去上清, 加入 1 mL 75% 预冷乙醇, 混匀。(5) 置于 7500 r/min、4 °C 离心 5 min 后去上清, 室温放置 5-10 min (可倒置于纸巾上, 使得乙醇挥发) 后加入 30-50 μL RNase-free 水重溶, -80 °C 保存备用。

1.7 溶解氧量测定

采用 YSI 550A 溶氧仪测定溶解氧浓度(用% 饱和度来标定)。首先, 打开仪器预热 15-20 min, 将探头放入待测样中, 待测样为 PNP (100 mg/L) 和 DMSO 处理后的菌液离心上清液, 并持续搅拌或在水样中晃动探头, 待温度和溶解氧读数稳定后观察记录读数。

1.8 转录组分析

大肠杆菌和铜绿假单胞菌在对数生长中期分别用等量的 PNP (100 mg/L) 和 DMSO 处理 1 h, 送上海美吉生物医药科技有限公司进行转录组分析, 其操作流程为: (1) 提取 RNA。利用 Nanodrop2000 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, 单次建库要求 RNA 总量 5 μg。浓度 200 ng/μL, $OD_{260/298}$ 介于 1.8-2.2 之间。(2) 去除核糖体 RNA。不同于真核生物 mRNA 3' 末端具有 polyA 尾, 原核生物不能利用 Oligo dT 与 ployA 进行 A-T 碱基配对, 从总 RNA 中分离出 mRNA。一般采用去除 rRNA 的方式, 用于分析转录组信息。(3) 片段化 mRNA。Illumina 平台是针对短序列片段进行测序, 去除 rRNA 得到的 mRNA 是完整的 RNA 序列, 平均长度达几 kb, 因此需要对其进行随机打断。利用金

属离子可以将 mRNA 随机断裂成 200 bp 左右的小片段。(4) 反转合成 cDNA。在逆转录酶的作用下, 利用随机引物, 以 mRNA 为模板反转合成一链 cDNA, 随后进行二链合成, 形成稳定的双链结构。(5) 连接 adaptor。双链的 cDNA 结构为粘性末端, 加入 End Repair Mix 将其补成平末端, 随后在 3' 末端加上一个 A 碱基, 用于连接 Y 字形的接头。(6) Illumina 测序。先文库构建, PCR 扩增 15 个 cycles, 再用 2% 琼脂糖胶回收目的条带, TBS380 定量, 按数据比例混合上机, cBot 上进行桥式 PCR 扩增, 生成 clusters, 最后再用 IlluminaHiseq4000 测序。

1.9 荧光定量 PCR 分析

把用 PNP (100 mg/L) 和等量的 DMSO 分别处理过的大肠杆菌和铜绿假单胞菌样品的总 RNA 利用 PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect real time) 购于 (TaKaRa 公司) 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。利用 UltraSYBR Mixture (With ROX) 试剂盒 (购于 CWBIO 公司) 在 Bio-Rad 公司的荧光定量 PCR 仪上采用 SYBR green I 荧光染料法进行 qRT-PCR。采用 CFX Manager[™] 1.6 软件, 在铜绿假单胞菌中以 *nadB* 基因为内参, 在大肠杆菌中以 *gapA* 基因为内参, 采用相对定量法进行结果分析。利用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计基因的引物序列 *appC* (F_{appC} : 5'-TCCTCGCCACTCACTCATTAG-3', R_{appC} : 5'-AGCCCAGGTCACCTTCAG-3'), *cyoA* (F_{cyoA} : 5'-TGATGCGACAGAAGAACA-3', R_{cyoA} : 5'-ATGGCAATCCAAGGTAAT-3'), *cydA* (F_{cydA} : 5'-GTTGCGAACGGCTGGAT-3', R_{cydA} : 5'-TTTAGCGAAGGCGAAGTCA-3'), 委托 Invitrogen 公司合成引物。反义核酸基因的荧光定量以上述同样的方法, 但是不加入 PNP, 在铜绿假单胞菌中以 *nadB* 基因为内参, 在大肠杆菌中以

gapA 基因为内参, 基因的引物序列为 *appC*^{antisense} ($F_{appC}^{antisense}$: 5'-CCCaaagcttGCCACTCACTCATTAGATAAACCC-3', $R_{appC}^{antisense}$: 5'-GGggtaccGGCTCAGATTGCCTTGC-3'), *cyoA*^{antisense} ($F_{cyoA}^{antisense}$: 5'-CCCaagcttCGGAACAGGGCTTTGCT-3', $R_{cyoA}^{antisense}$: 5'-GGggtaccTGGCGGAGATACCGTCATA-3')。

1.10 反向克隆法构建 *appC*、*cyoA* 基因反义核酸原核表达载体 MCS5/*appC*^{antisense}、MCS5/*cyoA*^{antisense}

以铜绿假单胞菌 PAO1 做为模板, *appC* (F_{appC} : 5'-TCCTCGCCACTCACTCATTAG-3', R_{appC} : 5'-AGCCCAGGTCACCTTCAG-3'), *cyoA* (F_{cyoA} : 5'-TGATGCGACAGAAGAACA-3', R_{cyoA} : 5'-ATGGCAATCCAAGGTAAT-3') 做为引物, 进行 PCR 循环。PCR 产物及载体 MCS5 经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切后, 凝胶回收试剂盒回收大片段, 二者大片段用 T4 连接酶连接。另基因上游引物的酶切位点与质粒载体插入位点的下游酶切位点保持一致, 下游引物的酶切位点和质粒载体插入位点的上游酶切位点亦一致, 基因的引物序列为 *appC*^{antisense} ($F_{appC}^{antisense}$: 5'-CCCaaagcttGCCACTCACTCATTAGATAAACCC-3', $R_{appC}^{antisense}$: 5'-GGggtaccGGCTCAGATTGCCTTGC-3'), *cyoA*^{antisense} ($F_{cyoA}^{antisense}$: 5'-CCCaagcttCGGAACAGGGCTTTGCT-3', $R_{cyoA}^{antisense}$: 5'-GGggtaccTGGCGGAGATACCGTCATA-3'), 这样 *appC*、*cyoA* 基因就反向插入质粒 MCS5 中, 从而获得 MCS5/*appC*^{antisense}、MCS5/*cyoA*^{antisense}[14]。

1.11 载体转化、筛选及鉴定

载体经电转化法转化至大肠杆菌和铜绿假单胞菌中^[15], 转化产物均匀涂布含 50 mg/L 庆大霉素培养基培养, 取转化子接种于 50 mg/L 庆大霉素的 LB 培养基中培养, 试剂盒提取质粒, 质粒经 PCR 鉴定, 最后通过测序确定序列。

2 结果和分析

2.1 PNP 不同浓度、不同时间及不同生长时期对细菌产生持留菌比例的影响

用 200、400、600、800 mg/L 浓度的 PNP 处理对数生长时期的大肠杆菌和铜绿假单胞菌，持留菌的比例均显著增加，不同浓度的 PNP 会对持

留菌比例有不同的影响。当 PNP 浓度为 400 mg/L 时，大肠杆菌的持留菌比例变化最为显著(图 1-A)；当 PNP 浓度为 200 mg/L 的时候，铜绿假单胞菌的持留菌比例变化最为显著(图 1-B)；用 100 mg/L 浓度的 PNP 分别处理对数生长时期的大肠杆菌、铜绿假单胞菌，在其作用的 1、3、5、7 h 测定持留菌存活比例。PNP 作用的 1-7 h 对 2 个菌持留

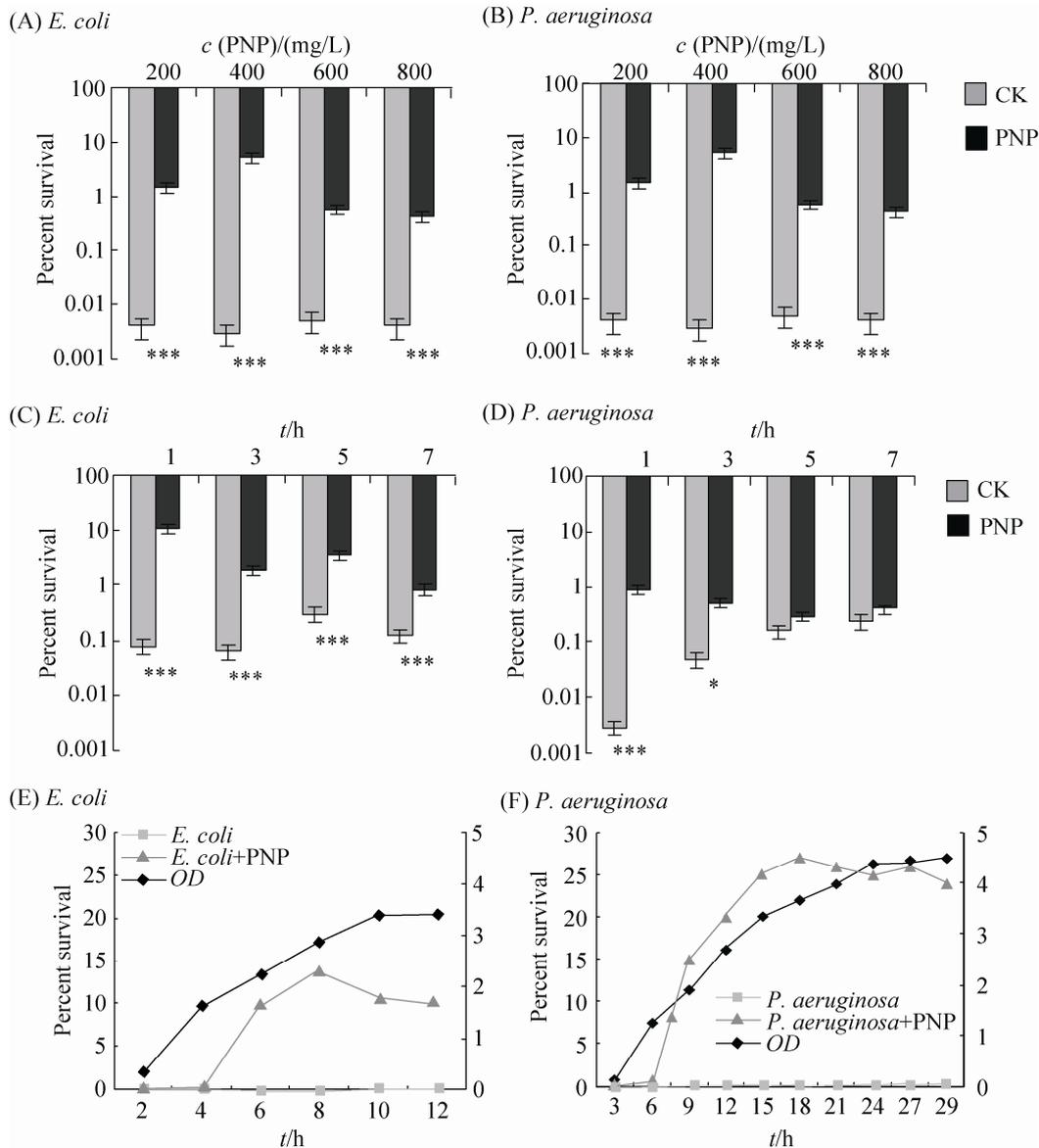


图 1. PNP 不同浓度(A, B)、作用不同时间(C, D)和菌体不同生长状况(E, F)对细菌产生持留菌比例的影响
Figure 1. Effect of different concentration of PNP (A, B) and PNP at different time (C, D) bacterial at different growth phases (E, F) on the proportion of bacterial persisters. All samples were treated with 5 mg/L ofloxacin. A, C, E: the levels of persister in *E. coli*; B, D, F: the levels of persister in *P. aeruginosa*. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

菌的比例均有显著增加,但以 1 h 时持留菌的比例增幅最大(图 1-C, D); 用 100 mg/L 浓度的 PNP 分别处理大肠杆菌和铜绿假单胞菌生长的不同时期, PNP 对两种菌体持留菌比例变化趋势一致。PNP 对大肠杆菌和铜绿假单胞菌的不同生长时期持留菌比例的影响不同: 在菌体生长初期, 持留菌比例未见明显变化, 待细菌至对数生长期, 持留菌比例有显著增加; 当细菌生长至稳定期时, 持留菌比例增幅减小(图 1-E, F)。

2.2 PNP 和 CCCP 对细菌自溶现象的影响

用 100 mg/L PNP、20 $\mu\text{mol/L}$ 呼吸抑制剂 CCCP 处理对数生长时期的大肠杆菌和铜绿假单胞菌。与对照组相比, PNP 和 CCCP 均可以增加大肠杆菌和铜绿假单胞菌持留菌比例至少 2 个数量级(图 2-A), 同时二者均可以增加 RNA 的完整性(图 2-B)、增加细胞尺寸(图 2-C)、抑制蛋白质降解(图 2-D), 细胞尺寸均增加至少 1.5 倍, 溶解氧含量均会增加, 在大肠杆菌中增加约 2 倍, 在

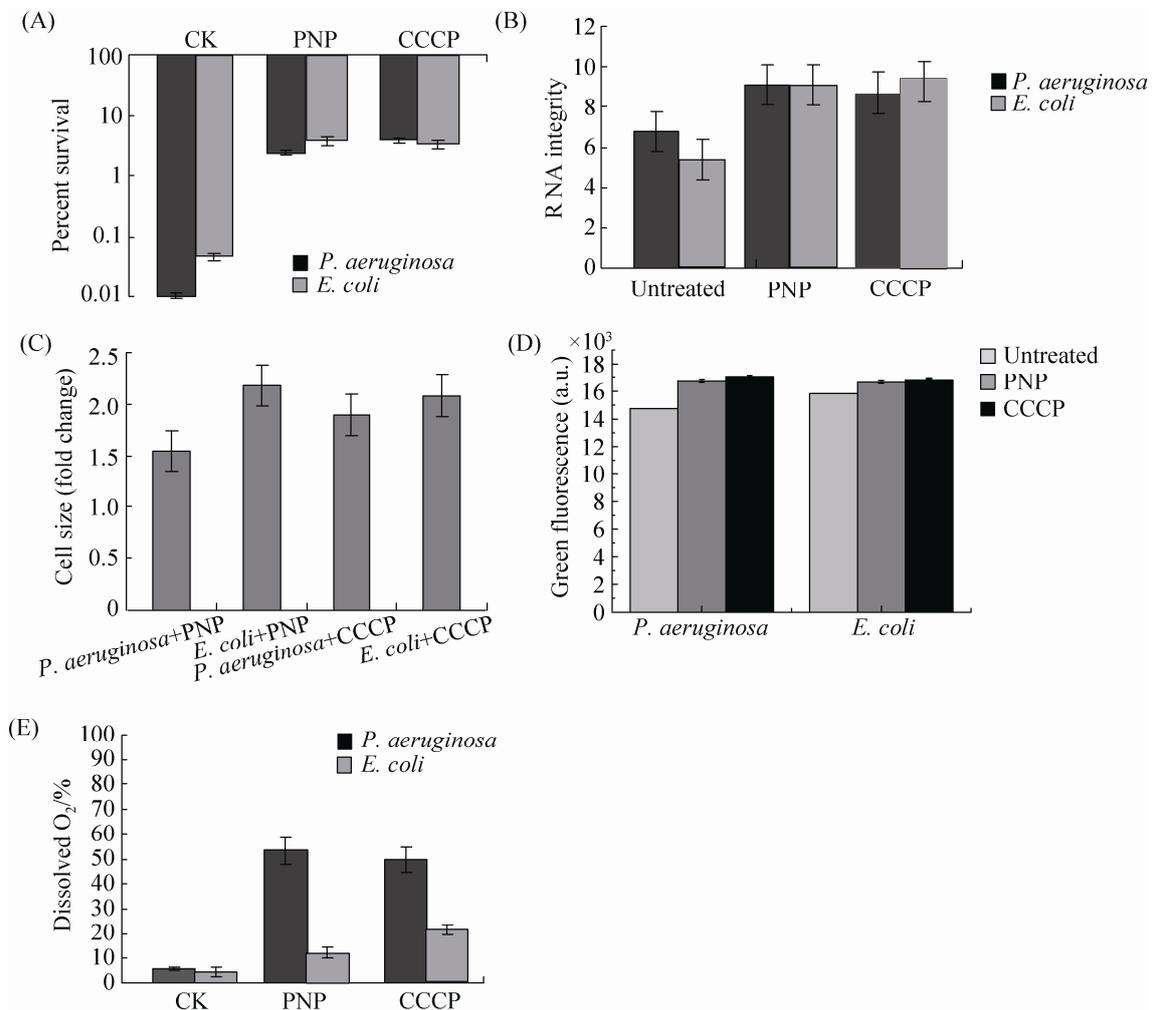


图 2. PNP 和 CCCP 对细菌产生持留菌比例(A)和对 RNA 完整性(B)、细胞尺寸(C)、蛋白质降解(D)、溶解氧含量(E)的影响

Figure 2. Effects of PNP and CCCP on proportion of bacteria persisters (A), RNA integrity (B), cell size (C), protein levels (D) and dissolved oxygen (E). *E. coli* and *P. aeruginosa* were all treated with 100 mg/L PNP and 20 $\mu\text{mol/L}$ CCCP.

铜绿假单胞菌中增加约 6 倍(图 2-E)。实验结果验证了 PNP 和呼吸抑制剂有相同作用, 均可以抑制细菌自溶现象, 推测可能是 PNP 对菌体呼吸作用有抑制。

2.3 PNP 对细菌滞留菌影响的转录组分析

上述实验的结果推测可能是 PNP 对菌体呼吸作用有抑制。为了验证这个推测, 将 PNP 处理组和对照组样品进行转录组分析, 结果表明, 加入 PNP 后, 与细胞呼吸相关通路 K00425 基因表达量显著降低(图 3), 其中 *appC*、*cyoA*、*cydA* 三个基

因为铜绿假单胞菌和大肠杆菌共同调控。

2.4 PNP 对细菌滞留菌影响的功能基因的实时荧光定量 PCR 分析

通过转录组分析, 筛选出与细胞呼吸相关的 3 个功能基因。通过荧光定量 PCR 进一步验证 PNP 对细胞呼吸是否有抑制作用, 结果表明与对照组相比, PNP 处理组 *appC*、*cyoA* 在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中的表达量均显著下降 ($P < 0.05$), 而 *cydA* 在加入 PNP 后差异均并不显著(图 4-A, B)。

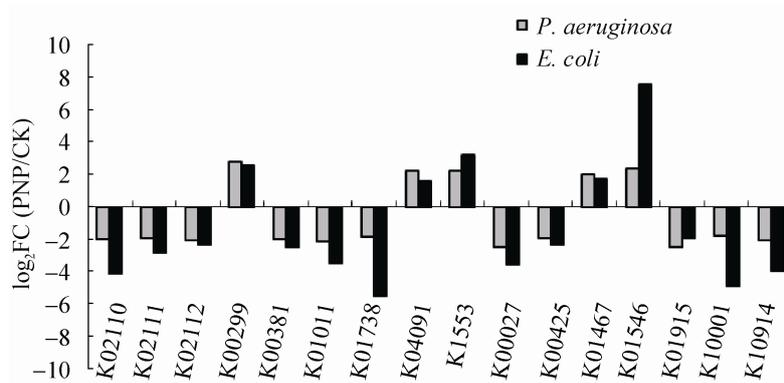


图 3. PNP 对信号通路基因表达的影响

Figure 3. Effect of PNP on signaling pathway gene expression. *E. coli* and *P. aeruginosa* were all treated with 100 mg/L PNP.

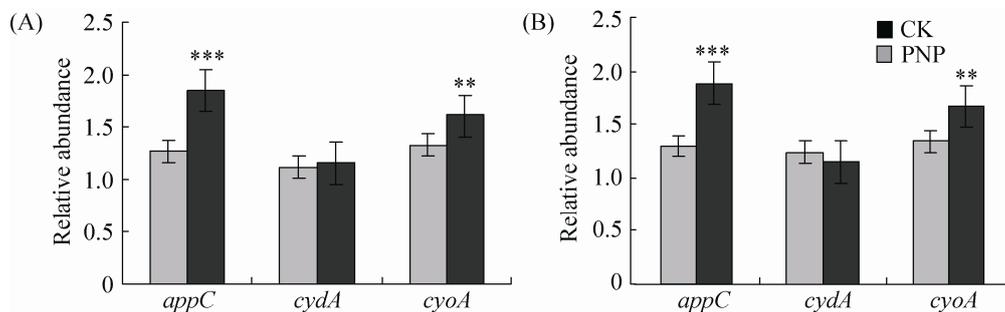


图 4. 在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中的荧光定量 PCR 分析(A, B)

Figure 4. qPCR analyses in *E. coli* (A) and *P. aeruginosa* (B). In *E. coli*, housekeeping gene is *gapA*; in *P. aeruginosa*, housekeeping gene is *nadB*. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.5 PNP 对细菌持留菌影响的功能基因验证

PNP 分别处理大肠杆菌和铜绿假单胞菌后, 与细胞呼吸相关的 2 个基因 *appC*、*cyoA* 表达量显著减少。为了进一步验证 PNP 是通过抑制细胞呼吸而增加持留菌比例, 敲除基因 *appC*、*cyoA* 发现会导致细菌死亡, 该现象可能与这 2 个基因控制细胞呼吸有关, 于是选择反义核酸来抑制基因

的表达。荧光定量 PCR 分析结果表明, 在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中, 反义核酸基因 *appC^{antisense}*、*cyoA^{antisense}* 与原始的 *appC*、*cyoA* 基因表达量相比均显著下降($P<0.05$)(图 5-A, B), 并且携带 2 个反义核酸基因的大肠杆菌和铜绿假单胞菌的持留菌比例和原始菌株相比至少上升 2 个数量级(图 6), 表明 *appC* 和 *cyoA* 两个基因与持留菌比例的变化有关。

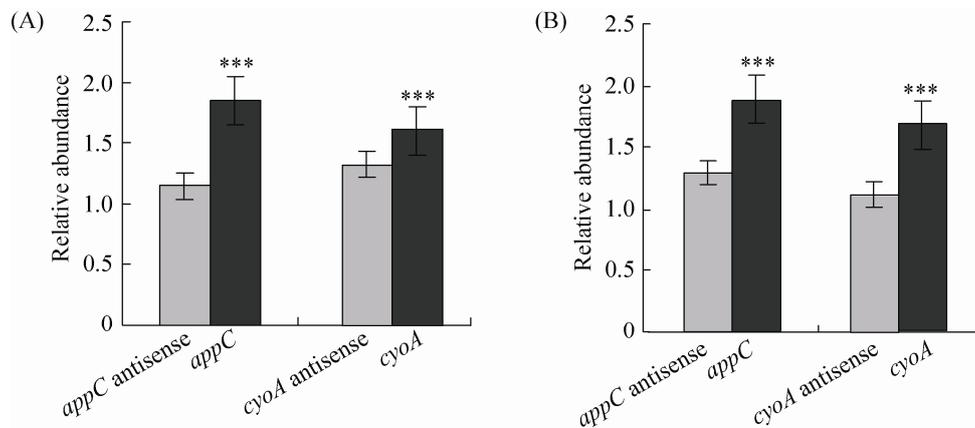


图 5. 在大肠杆菌(A)和铜绿假单胞菌(B)中的荧光定量 PCR 分析

Figure 5. qPCR analyses in *E. coli* (A) and *P. aeruginosa* (B). In *E. coli*, housekeeping gene is *gapA*; in *P. aeruginosa*, housekeeping gene is *nadB*. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

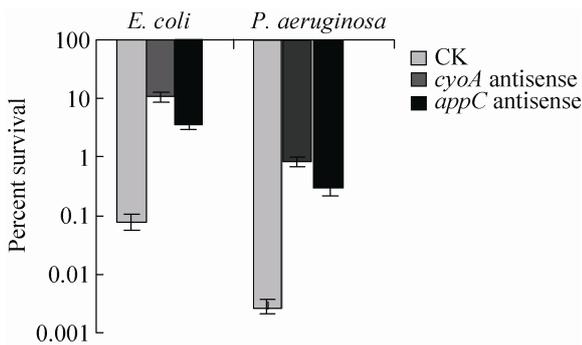


图 6. 携带反义核酸基因的大肠杆菌和铜绿假单胞菌对持留菌比例的影响

Figure 6. The influence of *E. coli* and *P. aeruginosa* carrying antisense gene on the proportion of bacterial persisters. All samples were treated with 5 mg/L ofloxacin.

3 讨论

持留菌自 1944 年被发现后, 近几十年来因其在慢性持续性感染和生物膜感染中的重要作用而得到越来越多的重视, 已有研究表明, 持留菌的形成分子机制极为复杂, 很多因素比如全局调控因子、毒素抗毒素系统(TA 系统)、群体感应系统(QS)、抗氧化反应等^[16-21]。虽然不同细菌的持留机制有一定的形似性和保守性, 但不同细菌的持留机制也存在差异, 如毒素-抗毒素系统在大肠埃希菌(*E. coli*)中的过度激活可导致持留菌增加, 但在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

中却无相同作用^[22]。

本研究结果表明, PNP 可以同时增加大肠杆菌和铜绿假单胞菌持留菌的比例, PNP 作用菌体不同时间、不同生长时期和 PNP 不同浓度都会对持留菌的比例产生不同影响, 当 PNP 作用 2 个菌体的对数生长期、时间为 1 h、浓度为 200 mg/L 的时候, 持留菌比例增加是最大的。由于 PNP 毒性强且难降解, 当它作用菌体较长时间、浓度过大时, 会把大部分细菌直接杀死, 从而导致持留菌的比例减小。已有研究表明, 氰化钾作用大肠杆菌 6 h 可以减少持留菌比例 1000 倍, 在对数生长期中期时对持留菌比例影响最大, 并且浓度为 0.52 mmol/L 时可以大幅度减少持留菌比例 1000 倍。这是由于当氰化钾作用菌体时, 可以产生特定的代谢产物杀死持留菌, 当作用时间和浓度不同时所产生的效果不同, 从而引起持留菌比例的不同变化^[6]。在铜绿假单胞菌中, 吩嗪绿脓菌素和 AIN-3-氧代十二烷酰-高丝氨酸内酯可以显著提高细菌产生持留菌的比例, 当菌体在对数生长期且绿脓菌素浓度在 2 mmol/L 时, AIN-3-氧代十二烷酰-高丝氨酸内酯浓度为 0.1 mmol/L 即能够增加至少 5 个数量级的持留菌数量^[9]。

本实验研究结果表明, PNP 可以抑制细菌自溶现象, 我们推测可能是 PNP 对细胞呼吸有抑制作用。通过转录组分析结果表明, 与细胞呼吸有关的基因 *appC*、*cyoA* 在 PNP 处理大肠杆菌和铜绿假单胞菌的样本中表达量较低, 这 2 个基因与细胞色素氧化酶有关, 并且此酶是把呼吸底物的电子经过细胞色素系统直接传递给分子态氧(即具有自动氧化作用), 在细胞呼吸中处于细胞色素系统的末端; 荧光定量 PCR 结果进一步验证了 PNP 处理组与对照组相比 *appC*、*cyoA* 表达量会显

著降低; 通过反义核酸抑制 2 个基因的表达, 并检测持留菌比例的变化, 结果发现当基因受到抑制的同时持留菌的比例上升至少 2 个数量级。实验结果说明了 PNP 是通过抑制细胞呼吸作用增加持留菌比例。此外, 外源化合物也可以通过抑制呼吸作用减少持留菌的比例, 例如, 氰化钾、一氧化氮均可以通过抑制呼吸作用减少持留菌的数量 1000 倍^[6-7], 同时也可以抑制细胞的自溶现象, 增加溶解氧含量 80 倍, 抑制蛋白质降解 3 倍, 增加细胞尺寸 2 倍。细胞呼吸会造成代谢损伤, 例如 RNA 降解、蛋白质降解, 然而, 细胞自溶现象是呼吸被抑制情况下的一种生理状态, 可以通过蛋白质降解、RNA 完整性、细胞尺寸、溶解氧含量的变化情况来检测细胞自溶情况, 所以, 当细胞呼吸被抑制, 代谢损伤会消失, 从而会抑制细胞的自溶现象^[6,17]。一氧化氮通过代谢解毒酶减少大肠杆菌持留菌数量, 敲除与解毒酶相关的 3 个基因 *hmp*、*norV*、*nsrR*, 持留菌数量上升; 氰化钾通过 TCA 循环酶减少大肠杆菌持留菌比例, 敲除与 TCA 循环酶有关的 3 个基因 *sucB*、*mdh*、*ubiF*, 持留菌数量上升; 绿脓菌素会增加铜绿假单胞菌持留菌数量, *phz1*、*phz2* 两个基因控制绿脓菌素的产生, 但是敲除 2 个基因, 并不会影响持留菌的数量, 超表达 *LasR*, 会增加群体感应信号分子 3-OC12-HSL 的产生, 从而增加持留菌的数量^[9]。

探究持留菌的形成分子机制和多药耐性对于治疗顽固的长期感染疾病具有重大意义, 然而, 持留菌的形成机制很复杂, 仍有许多问题值得我们深入探讨。本研究结果表明, PNP 可以通过抑制细胞呼吸作用减少大肠杆菌和铜绿假单胞菌持留菌的比例, 深入研究这一现象将对持留菌形成机制提供重要依据。

参考文献

- [1] Jiang B, Li S. New progresses of research methods and achievements on persisters. *Journal of Medical Postgraduates*, 2014, 27(6): 665–668. (in Chinese)
姜北, 黎庶. 持留菌研究方法的新进展. 医学研究生学报, 2014, 27(6): 665–668.
- [2] Dhar N, McKinney JD. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(1): 30–38.
- [3] Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(23): 6191–6199.
- [4] Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jørgensen MG, Gerdes K. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(32): 13206–13211.
- [5] Levin BR, Rozen DE. Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(7): 556–562.
- [6] Orman MA, Brynildsen MP. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nature Communications*, 2014, 6: 7983.
- [7] Orman MA, Brynildsen MP. Persister formation in *Escherichia coli* can be inhibited by treatment with nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 93: 145–154.
- [8] Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(5): 431–433.
- [9] Möker N, Dean CR, Tao JS. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(7): 1946–1955.
- [10] Melgoza RM, Chew M, Buitrón G. Start-up of a sequential anaerobic/aerobic batch reactor for the mineralization of p-nitrophenol. *Water Science and Technology*, 2000, 42(5/6): 289–292.
- [11] Li QB, Shi ZJ. Macroporous resin for treatment of p-nitrophenol wastewater. *Guangdong Chemical Industry*, 2010, 37(6): 198–199. (in Chinese)
李启本, 时召俊. 大孔树脂在处理对硝基苯酚废水中的应用. 广东化工, 2010, 37(6): 198–199.
- [12] Wan NS, Gu JD, Huang JH, Gao CD. Isolation of *Achromobacter xylosoxidans* NS12 and Degradation of nitrophenols. *Environmental Science*, 2007, 28(2): 422–426. (in Chinese)
万年升, 顾继东, 黄锦辉, 高传德. *Achromobacter xylosoxidans* NS12 的分离和对硝基苯酚的降解. 环境科学, 2007, 28(2): 422–426.
- [13] Meng JS, Yuan JG, Ma H. Research on antibacterial activity of taraxacum mongolicum hand *in vitro*. *Hebei Chemical Industry*, 2013, 36(3): 29–31. (in Chinese)
孟静思, 袁进罡, 马辉. 中草药蒲公英的体外抑菌试验. 河北化工, 2013, 36(3): 29–31.
- [14] Zhang L, Zhou JL, Li JM, Liao F. Construction of prokaryotic expression vectors of antisense nucleic acid of *LasR* gene and its effect on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34(10): 1049–1054. (in Chinese)
张玲, 周俊立, 李静铭, 廖芳. 铜绿假单胞菌 *LasR* 基因反义核酸原核表达载体的构建及对该菌毒力的影响. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(10): 1049–1054.
- [15] Zhu SK, Huang L, Li YF, Zhong WH, Xu ZN. Preparation of efficient electrotransformation competent cells of *Escherichia coli* and condition of electrotransformation. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 27(10): 206–209. (in Chinese)
朱森康, 黄磊, 李燕飞, 钟卫鸿, 徐志南. 制备高效大肠杆菌电转化感受态细胞和电转化条件的研究. 生物技术通报, 2011, 27(10): 206–209.
- [16] Ma C, Sim S, Shi WL, Du LJ, Xing DM, Zhang Y. Energy production genes *sucB* and *ubiF* are involved in persister survival and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 303(1): 33–40.
- [17] Li YF, Zhang Y. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(6): 2092–2099.
- [18] Shi WL, Zhang XL, Jiang X, Yuan HM, Lee JS, Barry III CE, Wang HH, Zhang WH, Zhang Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2011, 333(6049): 1630–1632.
- [19] Starosta AL, Lassak J, Jung K, Wilson DN. The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38(6): 1172–1201.
- [20] Brantl S. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biology*, 2012, 9(12): 1488–1490.
- [21] Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Drèze P, van Melderen L. Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(13): 5513–5525.
- [22] Syed MA, Lévesque CM. Chromosomal bacterial type II toxin-antitoxin systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(5): 553–562.

Influence of p-nitrophenol on bacteria persisters

Wei Wei, Jie Fang, Gen Li, Xu Chen, Bo Li, Huixin Li, Feng Hu, Jun Wu*

College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: **[Objective]** To study the effect of p-nitrophenol (PNP) on persisters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and to analyze the transcriptome to illustrate the impact of PNP on persister formation. **[Methods]** Ofloxacin was used to determine the bacteria persisters number. Cell self-digestion assay was done and the effect of respiratory inhibitors carbonyl cyanide chlorobenzene hydrazone (CCCP) on bacteria persisters was studied as well. Based on analysis of bacterial transcriptome, two genes (*cyoA* and *appC*) associated with the formation of persistence were screened. Their expressions were confirmed by Real-time Fluorescence Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR). The association between the two genes and the formation of persistence was also checked by antisense oligodeoxynucleotide assay. **[Results]** PNP inhibited the respiration of *E. coli* and *P. aeruginosa*, thus increased the proportion of bacterial persisters. PNP concentration, PNP function time and the bacterial growth period affected the proportion of bacteria persisters. PNP and CCCP inhibited the self-digestion of *E. coli* and *P. aeruginosa*, including the changes in dissolved oxygen, protein degradation and cell size, and the integrity of RNA. The results from transcriptome analysis and Real-time fluorescent quantitative PCR showed that PNP addition decreased the expression of *cyoA* and *appC* in *E. coli* and *P. aeruginosa*. Through the antisense oligodeoxynucleotide inhibitory expression of *cyoA* and *appC* was found that bacteria persister proportion increased compared with the original strain. **[Conclusion]** PNP can increase the proportion of bacteria persisters by inhibiting the cellular respiration.

Keywords: persisters, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, nitrophenol, cell respiration

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470551) and by the Central University Basic Scientific Research Service Charge (KYZ201409, KYTZ201404)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84395815; E-mail: wujun2013@njau.edu.cn

Received: 3 January 2017; Revised: 17 February 2017; Published online: 11 May 2017