



细菌药物耐受

吕亮东^{*1} 赵国屏^{*2}

1 复旦大学基础医学院 医学分子病毒学教育部/卫生部重点实验室 上海 200032

2 中国科学院上海植物生理生态研究所 中国科学院合成生物学重点实验室 上海 200032

摘要: 细菌药物耐受(Drug tolerance)是指在没有发生耐药突变的情况下细菌耐受抗生素杀菌的能力,表现为细菌群体难以或不能被杀菌型药物清除。细菌药物耐受的调控机制包括群体异质性和压力应答两种途径。药物耐受性的本质是细菌通过调控或遗传突变的方式改变生理代谢状态,从而抵制药物引起的细胞死亡途径。比如,处于缓慢生长或生长停滞生理状态的细菌往往能够抵抗药物的杀菌作用。临床研究发现细菌药物耐受是导致持续性感染疾病迁延难愈、复发率高的病原学机制之一。同时,研究证明耐受性的形成是细菌耐药性(Drug resistance)产生的进化途径之一。因此,揭示细菌药物耐受的机制将有助于人们深入了解抗生素的杀菌机理,以及细菌耐药性形成的适应性进化机制,并为新型杀菌药物以及药物增效剂靶标的发现和抗生素合理使用策略的开发奠定理论基础。

关键词: 药物耐受, 持留, 耐药, 抗生素

Drug tolerance in bacteria

LÜ Liang-Dong^{*1} ZHAO Guo-Ping^{*2}

1 Key Laboratory of Medical Molecular Virology of Ministry of Education/Ministry of Health, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

2 CAS-Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: Drug tolerance is the capacity of genetically susceptible bacteria to survive the killing by bactericidal antibiotics. At population level, drug tolerance can result in slow killing kinetics or failure of sterilization by antibiotic treatment. Drug tolerance can stem from phenotypic heterogeneity or from environmentally induced stress response at population level. While various genes and pathways were shown to be implicated in bacterial drug tolerance, it is becoming clear that the common mechanism underlies the survival of antibiotic-tolerant cells is the alteration of cellular growth or metabolic state achieved by either regulation or genetic mutation, which counteracts or diminishes the killing effect induced by the drug-target interaction. Increasing clinic evidence shows that drug tolerance is a causative reason account for the requirement of lengthy treatment and the high relapse rate observed in persistent infections. Importantly,

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31830002)

***Corresponding authors:** LÜ Liang-Dong: Tel: 86-21-54237720; E-mail: ld.lyu@fudan.edu.cn
ZHAO Guo-Ping: E-mail: gpzhao@sibs.ac.cn

Received: 30-10-2018; **Accepted:** 02-01-2019; **Published online:** 09-01-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31830002)

***通信作者:** 吕亮东: Tel: 021-54237720; E-mail: ld.lyu@fudan.edu.cn

赵国屏: E-mail: gpzhao@sibs.ac.cn

收稿日期: 2018-10-30; **接受日期:** 2019-01-02; **网络首发日期:** 2019-01-09

recent studies demonstrated that drug tolerance could accelerate the emergency of drug-resistant mutants. Therefore, deciphering the molecular mechanisms of antibiotic tolerance may shed light on our understanding of antibiotic killing and the adaptive evolution of antibiotic resistance, and could facilitate the development of new intervention agents and therapeutic strategies.

Keywords: Drug tolerance, Persistence, Drug resistance, Antibiotics

青霉素耐药机制自 1940 年首次报道^[1], 目前人们已经对细菌耐药有了全面的认识。概括来说, 细菌耐药的分子机制主要围绕药物靶标和药物本身, 如药物靶标突变、修饰和抗生素修饰、降解及外排等^[2]。细菌耐药性具有明确的遗传或表型指标, 如基因突变、药物最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)上升以及发生耐药的细菌能够在药物处理条件下继续生长。然而耐药性并不是细菌抵抗药物的唯一策略。比如, 对于持续性感染疾病, 即便采用有效药物进行治疗也常常伴随迁延难愈和复发^[3-5], 该现象难以用耐药机制解释。其次, 发生在免疫功能下降人群的感染疾病往往难以治愈, 甚至需要终生服用抗菌药物, 这提示抗生素治疗很难清除体内的细菌, 宿主免疫因素对治愈发挥关键作用^[6-7]。另外, 绝大多数抗生素是放线菌和真菌产生的次级代谢产物, 因此, 环境微生物通常会频繁暴露于低浓度抗生素的环境下。Forsberg 等通过宏基因组学研究发现土壤菌群中的耐药基因分布与菌群结构高度相关, 同时耐药基因在不同菌种之间的水平转移能力很低^[8], 该研究结果提示环境菌群中不含有耐药基因的细菌也能通过其他方式维持其在菌群中的比例。

研究发现细菌在没有发生耐药突变(MIC 不改变)的情况下也能够耐受药物杀菌作用, 但不能在药物存在下增殖, 该现象被称为药物耐受(Drug tolerance)^[3,9]。药物耐受体现为抗生素清除细菌群体所需的时间或药物浓度上升, 并且不能完全清除细菌群体; 临床表现为治疗有效但疗程漫长且容易复发, 如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)感染、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)感染、大肠杆菌(*Escherichia coli*)尿路感染以及铜绿

假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)引起的肺部感染等^[3,5]。药物耐受一般不具有药物特异性, 常表现为对多类杀菌型药物同时耐受。药物耐受的量化检测指标包括测定药物杀死一定比例细菌所需的最低杀菌浓度(Minimum bactericidal concentration, MBC)或最低杀菌时间(Minimum duration for killing, MDK)^[10]。由于历史原因、观察角度以及药物作用机制的不同, 对细菌耐受药物杀菌的现象曾有多种命名, 如药物滞留(Drug persistence)、药物冷漠(Drug indifference)、表型耐药(Phenotypic drug resistance)以及非遗传性耐药(Non-inherited antibiotic resistance)等^[9,11], 虽然不同类型的耐受表现形式有差异, 但其本质都与耐受性有关。本文将从细菌药物耐受现象、调控机制、耐受药物杀菌的机理、耐受与耐药形成以及临床研究进展等方面进行介绍。

1 细菌药物耐受现象

药物耐受可以发生在群体水平和亚群水平。群体水平上的耐受一般发生在细菌生长停滞阶段, 如稳定期细菌和缺氧、饥饿等压力诱导的休眠细菌等, 表现为药物处理后活菌数目的下降速率较对数生长期细菌明显变缓^[12]。在青霉素临床试验成功后不久, Lee 等发现青霉素对金黄色葡萄球菌的杀菌效率与细菌生长速率正相关^[13]: 青霉素对于对数生长期的细菌表现为杀菌剂, 而当细菌进入培养稳定期或人为进行饥饿处理后, 青霉素几乎不能杀菌。随后 Mc Dermott 将这种现象称为“Drug indifference”^[14]。稳定期细菌的药物耐受现象普遍存在于细菌中, 如大肠杆菌、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)等^[12,15-18]。值得注意的是,

在天然生存环境下绝大多数微生物的大部分时间是处于缓慢生长或生长停滞状态, 因此, 可以认为群体水平的药物耐受现象是微生物与抗生素互作的自然状态^[19]。

亚群水平的药物耐受与异质性(Heterogeneity)有关, 表现为基因型相同的细菌群体中的部分个体对药物耐受。由于群体中同时存在药物敏感亚群和药物耐受亚群, 因此药物处理后的杀菌速率呈现二相性(Biphasic killing curve), 即处理早期呈现快速杀菌相(敏感亚群), 后期变为慢速杀菌相或抑菌状态(耐受亚群)。Bigger 最早对亚群水平的药物耐受进行了研究^[20]。他注意到尽管青霉素能够治愈葡萄球菌感染, 但并不能彻底清除病原菌, 病情复发较为普遍; 通过实验室研究他还发现青霉素不能彻底清除对数培养期的细菌群体, 并证实极少部分存活的细菌并未产生耐药性, Bigger 将这类存活菌命名为持留菌(Persister), 并认为持留菌处于休眠状态。随着单细胞研究技术的出现, 2004年 Balaban 等利用微流体及实时成像技术重复了 Bigger 当年的实验, 证实了持留菌的异质性和休眠特性^[21]。由于异质性是生物界中普遍存在的现象, 因此, 亚群水平的药物耐受也在生物中广泛存在。

药物耐受现象受菌种、药物作用机制、检测方法以及研究模型的影响, 因此细菌药物耐受的具体表现十分复杂, 开展相关研究应该综合考虑上述因素。比如, 我们发现稳定期或休眠样结核分枝杆菌对环丙沙星、氧氟沙星、异烟肼和链霉素表现出极强的耐受能力, 药物不能清除细菌, 但对利福平的耐受能力则较弱, 细菌能被药物清除^[16,18,22-23]。另外, 由于药物耐受表型的检测需要测定活菌数目, 因此检测方法本身也会对结果产生影响。研究发现在压力环境下(包括抗生素处理), 一部分细菌会进入 VBNC (Viable but non-culturable) 状态, 这部分细菌在平板培养时很难生长为可见克隆, 但可以用最大或然数法(Most probable number, MPN)进行检测^[24]。近期的临床研究发

接受化疗的结核病人痰液中有相当大比例的细菌处于 VBNC 状态^[25]。值得注意的是, 应该采用合适的模型来研究不同的细菌药物耐受形式, 比如, 研究 Persister 介导的耐受常用对数早期的细菌, 而在生物膜以及动物模型中, 应该注意可能存在多种耐受形式并存的现象。

2 细菌药物耐受的调控机制

目前的观点认为能够耐受药物杀菌的细菌个体往往处于缓慢生长或生长停滞的生理状态^[9]。因此, 影响细菌细胞周期和生长代谢速率的遗传因素都可能参与细菌药物耐受的形成。从调控机制角度可以将药物耐受细菌的形成机制分为压力应答调控和异质性调控两种方式。

群体水平上的药物耐受与细菌对不利生长环境的压力应答调控有关。降低生长与代谢速率是生物应对不利生长环境的生存策略之一, 尤其是对细菌这种只能被动应对环境变化的生物^[19]。目前发现多种环境压力能够诱导群体水平的药物耐受, 包括饥饿^[12]、缺氧^[22]、热激^[26]、氧化压力^[27]、DNA 损伤^[28]等。研究发现相关应答通路的基因与群体水平的药物耐受有关, 同时也与亚群水平的耐药现象有关(由相关基因的表达随机性导致)。例如, 研究发现 RelA 和 SpoT 介导的严紧应答(Stringent response)与细菌药物耐受有关, 敲除相关基因的大肠杆菌和铜绿假单胞菌其药物耐受能力降低^[29-30]。氨基酸饥饿可激活 RelA 和 SpoT 蛋白的(p)ppGpp 合成功能, 后者作为信使分子结合到 RNA 聚合酶复合体上并改变其构象, 最终导致 tRNA 和 rRNA 转录停滞, 细胞生长/代谢活动降低。研究发现毒素蛋白 HipA 诱导的药物耐受形成也与(p)ppGpp 上调有关, 推测其原因是 HipA 抑制蛋白质翻译后激活了严紧应答^[29]。除此之外, (p)ppGpp 还能提高 RNA 聚合酶对一些应激相关基因启动子的亲和力, 从而激活其他压力应答通路。例如, 研究发现严紧应答可激活铜绿假单胞菌的触酶(Catalase)和超氧化物歧化酶活力

(Superoxide dismutase, SOD), 从而增强了细胞的抗氧化应答^[30]。

异质性调控是亚群水平药物耐受形成的方式, 基因表达随机波动(Stochastic variation)是异质性产生的主要原因^[21]。基因表达随机波动是指在基因型相同的群体中, 细胞个体之间同一基因的表达水平呈现随机波动。当特定基因在个别细胞中出现过高或过低表达时会导致细胞表型变化, 从而形成群体异质性^[21,31-33]。例如, 大量研究发现大肠杆菌持留菌的形成与细菌毒素-抗毒素(Toxin-antitoxin, TA)表达随机波动有关, 目前已发现的参与持留菌形成有关的 TA 系统包括 HipAB^[21,33]、RelBE^[34]、YafNO^[35]、MqsRA^[36]、HigBA^[37]、CcdBA^[38]、TisAB^[39]等。TA 系统中的毒素蛋白具有水解 RNA、抑制翻译等功能, 毒素蛋白高表达会导致细菌进入休眠或生长停滞状态, 从而导致个体细胞对药物耐受。值得注意的是, 结核分枝杆菌编码了 88 个 TA 系统^[40]。Singh 等发现 RelBE 系统参与介导结核分枝杆菌的药物耐受, 提示 TA 系统在结核分枝杆菌持续性感染中发挥重要作用^[41]。其他基因的表达随机波动也会引起亚群水平的药物耐受, 目前已发现的这类基因包括了代谢基因、调控基因、核糖体、DNA 维护及药物靶标基因等^[42-44]。例如, Wakamoto 等^[32]研究发现异烟肼靶标基因 *katG* 低表达的亚群会耐受 INH 的杀菌作用; 张颖课题组发现调控蛋白 PhoU 在大肠杆菌和结核分枝杆菌中参与持留菌的形成^[45-46]; 在体外及感染模型中的研究均发现核糖体 RNA 的低表达会导致大肠杆菌和结核分枝杆菌进入休眠样状态, 形成药物耐受^[47-48]。

细菌分裂的非对称性也是导致群体异质性出现的原因之一^[49]。Aldridge 等^[49]利用微流体实时成像技术在单细胞水平监测了耻垢分枝杆菌的生长过程, 他们发现: (1) 分枝杆菌细胞繁殖方式为非对称分裂, 即分裂隔膜(Division septum)不位于母细胞的中央; (2) 分裂产生的两个子代细胞的生长速度也不相同; (3) 细胞分裂为时间依赖性, 与细

胞大小无关。这种独特的分裂方式导致细胞群体中始终存在一部分生长缓慢的亚群, 这类亚群对多种药物耐受。Rego 等^[50]通过进一步研究发现导致子代细胞生长速度不同的原因与分裂小体(Divisome)中的 LamA 蛋白有关, 研究发现该蛋白能够抑制新细胞级(Polar)的细胞壁合成, 从而导致细胞延伸缓慢。细菌分裂的非对称性还体现在细胞组分在子代间分配的不均一性。例如, Bergmiller 等^[51]研究发现大肠杆菌分裂过程中 AcrAB-TolC 外排泵系统在子代细胞间的分配存在偏向性, 富集 AcrAB-TolC 的子代细胞能够耐受药物的杀菌作用。

在持续性感染疾病中, 多方面的因素会调控细菌进入药物耐受状态。一方面, 宿主免疫应答会限制病原菌的生长, 例如, 胞内感染的病原菌常常面临饥饿、缺氧、低 pH、氧化压力及 DNA 损伤等。我们前期研究发现, 宿主巨噬细胞产生的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和活性氮(Reactive nitrogen species, RNS)是造成结核分枝杆菌核苷酸氧化修饰及 DNA 损伤的主要因素, 维护基因组稳定性与结核分枝杆菌建立持续性感染有关^[52]。近期研究发现, 宿主免疫应答会诱导结核分枝杆菌进入休眠样状态, 从而导致药物耐受^[48,53]。对于形成肉芽肿的感染, 虽然肉芽肿能够限制细菌扩散, 但也导致细菌生长变缓, 从而形成药物耐受。另外, 对于胞外感染的病原菌, 形成生物膜(Biofilm)是导致药物耐受的重要因素。目前认为导致生物膜药物耐受的因素包括药物难以扩散进入生物膜内部, 以及生物膜内部的缺氧和饥饿环境诱导细菌生长停滞^[11]。

3 细菌耐受药物杀菌的机理

导致细菌耐受药物杀菌的机理有多方面的因素。早期的观点主要从药物与药物靶标作用角度解释, 认为细菌药物耐受涉及到药物靶标表达或活力降低、药物进入细胞受阻^[34]。然而近期的大量研究发现, 细胞代谢调控和基因组 DNA 维护在

细菌药物耐受中发挥重要功能^[54]。

目前发现的大多数抗生素是作用于快速生长分裂阶段的细菌, 这类抗生素的杀菌效力与细胞生长速率为正相关^[12,17]。当细菌进入休眠或缓慢生长阶段时, 细胞壁合成、DNA 复制、蛋白翻译、有氧呼吸以及能量代谢等生命活动降低, 相关基因的表达水平以及活力显著降低^[19,34,55], 因此作用于这些代谢通路靶标的杀菌型抗生素的杀菌效力降低, 甚至仅表现抑菌作用。例如, 异烟肼是抑制结核分枝杆菌细胞壁合成的药物, 研究发现异烟肼对休眠样结核分枝杆菌几乎无杀菌作用^[18,22]; 单细胞水平的研究也证明低表达 *katG* 的分枝杆菌亚群确实对异烟肼不敏感^[32]。

药物入胞过程受阻也被认为是导致休眠样细菌药物耐受的原因之一。细菌进入休眠样状态后细胞壁会发生增厚、成分改变以及肽聚糖交联方式改变等生理变化。例如, 稳定培养期的金黄色葡萄球菌的细胞壁会明显增厚, 其肽聚糖层之间的交联减少, 类似于细菌芽孢皮层结构^[56]; 稳定培养期的霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)肽聚糖层中的 D 型氨基酸含量上升, 导致细胞壁通透性降低; 稳定培养期的结核分枝杆菌细胞壁增厚, 细胞壁脂质成分增加, 同时肽聚糖层的交联方式由 4-3 交联变为 3-3 交联, 最终导致对药物的通过性降低^[57-58]。研究发现破坏结核分枝杆菌中负责 3-3 交联的 L,D-转肽酶后, 细菌持续性感染能力降低, 同时对阿莫西林更加敏感^[59]。

尽管普遍认为细菌休眠样状态是导致药物耐受的主要机制, 但近期研究提示生长速率调节并不是导致细菌耐受药物杀菌的唯一机制。比如, 单细胞水平的研究发现尽管耐受药物杀菌的大肠杆菌在休眠样亚群中富集, 但大部分的休眠样细菌仍然对药物杀菌作用敏感^[47,49]。另外近期的研究发现用氧氟沙星(导致 DNA 损伤)处理稳定期的大肠杆菌后, 药物敏感亚群和药物耐受亚群中的 DNA 损伤情况没有差异, 提示药靶活性的降低并不是导致药物耐受的唯因素^[60]。随着药物耐受

研究的不断深入, 越来越多的研究发现细菌代谢基因与细菌药物耐受密切相关^[61-62]。可以从两方面来认识代谢调控与细菌耐受药物杀菌的关系:

第一, 代谢活动参与建立或维持细菌休眠样生理状态。例如, Baek 等通过筛查转座子突变文库发现了多个代谢基因与结核分枝杆菌在缺氧条件下的生长调节有关, 这些基因突变后结核分枝杆菌不能建立休眠样生理状态^[63]。他们对 *tgsI* 基因进行了深入研究, 发现该基因通过增加三脂酰甘油合成来减少脂肪酸分解和氧化磷酸化, 从而有助于结核分枝杆菌建立休眠及药物耐受性。Li 等^[46]研究发现破坏大肠杆菌 *phoU* 基因会导致细菌代谢活力增高, 该现象可能与其滞留菌水平下降的表型有关。

第二, 细菌通过代谢流调控来对抗生素引起的代谢紊乱以及细胞组分损伤。抗生素抑制药靶功能后会导致代谢紊乱^[54,64], 研究发现大多数杀菌型抗生素会导致细菌呼吸作用增强, 从而引起 ROS 的产生以及生物大分子的氧化损伤^[65-66]。我们研究发现利福平、链霉素和氧氟沙星处理会导致分枝杆菌 ROS 水平显著上调并激活氧化压力应答和 SOS 应答通路^[18]。Nandakumar 等^[67]通过代谢组学研究发现结核分枝杆菌经过异烟肼、利福平及链霉素处理后会主动上调异柠檬酸裂解酶, 引起三羧酸循环还原性分支的代谢流量上升, 他们发现这种代谢流调控可降低 ROS 的产生和基因组的氧化损伤, 从而导致结核分枝杆菌药物耐受。Tiwari 等^[68]研究发现结核分枝杆菌在受到异烟肼处理会上调精氨酸合成通路, 该通路上调有助于结核分枝杆菌降低 ROS 和基因组 DNA 损伤。

大量研究揭示维护基因组 DNA 稳定性在细菌药物耐受中发挥重要作用。Dwyer 等^[69]发现氨基青霉素、庆大霉素和诺氟沙星处理大肠杆菌后能够引起 DNA 断裂, 提示 DNA 损伤是抗生素杀菌机制之一。进一步的研究发现破坏 DNA 双链断裂修复系统(*recA*)或 DNA 甲基化依赖的错配修复系统(*dam*)会导致大肠杆菌滞留菌水平大幅下降^[70-71], 而

recA 表达上调则会促进大肠杆菌持留菌的形成^[28]。我们发现敲除分枝杆菌的 DNA 双链断裂修复基因 *recA* 或 *ligD* 后, 细菌对多种药物的敏感性大幅提高^[18]。以上结果提示 DNA 稳定性维护对细菌耐受药物杀菌发挥重要作用, 但药物处理如何造成 DNA 损伤, 其机制尚不明确。我们前期研究发现结核分枝杆菌 MazG 具有降解氧化损伤的 dCTP 的活力, 能够防止该核苷酸掺入 DNA 导致 DNA 损伤^[52,72]。近期, 我们揭示了 MazG 是稳定期结核分枝杆菌耐受药物杀菌的关键因子, 敲除 *mazG* 基因的结核分枝杆菌药物耐受能力大幅降低^[18,73]。深入研究发现药物处理会导致分枝杆菌 ROS 水平上升, 引起 dCTP 的氧化损伤; 该核苷酸可通过 DNA 易错聚合酶掺入基因组而导致碱基错配, 并进一步诱发 DNA 双链断裂, 造成细菌死亡。该研究说明氧化修饰核苷酸掺入 DNA 是造成休眠样结核分枝杆菌 DNA 损伤的主要机制, 通过降解氧化修饰的核苷酸来主动预防 DNA 损伤是稳定期结核分枝杆菌耐受药物杀菌的主要策略之一。

4 药物耐受与耐药性形成

大多数的压力环境都会引起基因组不稳定性, 从而导致 DNA 突变频率上升, 这种现象被称作适应性突变(Adaptive mutation)。如上所述, 药物耐受的细菌往往处于生长停滞和压力应答通路激活(如严紧应答和 SOS 应答)的状态, 这种独特的生理状态提示药物耐受会促进耐药性的形成。研究发现严紧应答和 SOS 应答是大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌发生适应性突变的主要因素, 其机制与压力环境下易错 DNA 聚合酶的激活有关^[74-75]。同时, 严紧应答和 SOS 应答也是生物膜中细菌突变频率明显提高的原因之一。我们的研究发现, 稳定期的结核分枝杆菌中易错 DNA 聚合酶大幅度上调, 是引起 DNA 损伤及稳定期细菌突变频率上升的主要因素^[18,52]。另外, 抗生素本身也可诱导 ROS 产生和细菌 DNA 损伤。研究发现亚致死剂量的氨苄青霉素和环丙沙星可诱导易

错 DNA 聚合酶上调以及 ROS 产生, 从而导致细菌耐药突变频率上升^[76-77]。Levin-Reisman 等近期通过实验进化和深度测序研究发现药物处理后大肠杆菌会首先产生导致耐受性的突变, 而耐药性的突变随后出现, 且耐药性突变产生于发生耐受性突变的亚群, 该研究提示细菌耐药性产生遵循先耐受药物杀菌, 再产生耐药突变的过程^[78]。

压力应答不但能促进 DNA 突变的发生, 还能够促进抗性基因的水平转移。研究发现喹诺酮类抗生素诱导的细菌 SOS 应答会促进基因水平转移^[79]。在肺炎链球菌中的研究发现氨基糖苷类药物会诱导细菌进入感受态, 从而促进基因水平转移^[80]。另外, 近期研究发现服用抗生素会激发肠道菌群的噬菌体转导频率, 从而提高噬菌体介导的抗性基因水平转移^[81]。由于药物耐受细菌在抗生素处理下的存活时间延长, 因此这类细菌接受外源抗性基因的几率大幅增加, 从而更容易产生耐药性。

5 临床研究进展

临床研究提示药物耐受与持续性感染疾病的迁延不愈和高复发率密切相关。研究发现伴随囊肿性纤维化患者的化疗, 病人体内分离出的铜绿假单胞菌的 MIC 未发生改变, 但药物耐受能力逐渐提高^[82]。结核病早期临床研究中就已经观察到药物耐受现象, 例如, 化疗早期痰液中的活菌数目会快速下降, 随后下降幅度明显减缓, 从而形成持续性感染^[83]。近期临床研究发现, 在活动性肺结核病人痰液样本中平均约有一半的结核分枝杆菌细胞内含有脂质小体(Lipid body), 提示其处于休眠样状态; 细菌转录组分析发现痰液中的结核分枝杆菌与休眠样细菌的转录组高度相似^[84]。另外, 很多持续性感染与细菌生物膜介导的药物耐受有关, 例如尿道致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌等。由于以下原因: (1) 测定细菌药物耐受需要检测药物杀菌曲线; (2) 药物耐受现象与细菌生存环境密切相关; (3) 导致药物

耐受的遗传因素远比耐药性复杂, 因此目前对临床细菌药物耐受的研究远远不如细菌耐药普遍。

全基因组测序分析极大地促进了对临床药物耐受的研究, 目前已发现了多种能够导致细菌药物耐受的遗传突变。Schumacher等测序分析了423株尿道致病性大肠杆菌, 他们发现其中23株是*hipA7*(G22S, D291A)突变株, 1株为*hipA*(P86L)突变株。研究发现相关突变不影响MIC, 但导致细菌对环丙沙星和氨基青霉素耐受^[85], 导致顽固性感染。Hicks等^[86]对549株耐药性结核分枝杆菌临床菌株进行了全基因组测序, 他们发现*prpR*基因(甲基柠檬酸循环的转录调控蛋白)突变与细菌耐药性高度关联。进一步研究发现相关突变导致PrpR调控功能丢失; 在以丙酸为唯一碳源的环境下, 相关*prpR*突变菌株对多种药物耐受。由于该突变与细菌耐药性发生高度关联, 因此该研究提示耐受性突变能够促进耐药性形成。近期的实验进化研究也发现频繁暴露在抗生素下的细菌群体会快速产生引起药物耐受的突变^[78,87-88], 提示遗传突变与细菌药物耐受有关。

6 展望

耐药细菌的全球扩散已对人类健康形成巨大挑战^[23]。2016年联合国首次针对“细菌耐药性”召开了全球领导人大会, 联合国秘书长潘基文提出警告: “随着耐药性细菌蔓延, 人类正在丧失抗击感染性疾病的能力”。同年, 细菌耐药被杭州G20峰会列为影响世界经济的5项深远因素之一。因此, 关注细菌耐药问题已到了刻不容缓的地步。控制细菌耐药问题涉及到社会、经济等多方面因素, 从科学研究角度看, 解决细菌耐药问题的关键是了解细菌耐药性形成的深层机制, 从而开发高效的治疗策略, 包括新型药物、药物增效剂、治疗方案和治疗效果监控方法等。全面深入地揭示细菌药物耐受的机制, 将加深我们对抗生素杀菌机制、细菌对抗生素压力的策略以及耐药性形成机制的了解, 相关领域的进展无疑将会为高

效治疗策略的开发提供新的视角和理论基础。

靶向干扰细菌药物耐受的关键代谢/调控机制已成为开发新型治疗策略的研究方向之一。Conlon等发现多肽类抗菌化合物ADEP4能够通过激活蛋白酶ClpP来杀灭形成生物膜的金黄色葡萄球菌, 动物实验显示ADEP4与利福平联合使用能够彻底清除细菌^[89]。DosRST双组分是结核分枝杆菌感应氧气及胞内氧化还原势从而建立休眠的关键调控系统, 近期研究显示青蒿素及其类似物能够抑制DosRST的激活, 体外实验结果显示青蒿素能够显著增强异烟肼对休眠样结核菌的杀菌效果^[90]。维护基因组DNA稳定性是细菌耐受药物杀菌的重要机制之一, 目前针对DNA双链断裂修复系统(RecA)的抑制剂研发已有报道^[91-92]。另外, 近年来的大量研究发现改变细菌生长生理状态(如添加碳源、氮源以及改变pH等)^[93-94]能够增强药物的杀菌效果, 但如何在临床上应用这些策略还有待进一步研究。

目前针对细菌药物耐受的临床研究与治疗还面临一些有待解决的问题。首先, 针对临床上细菌药物耐受的检测方法尚待建立。由于细菌药物耐受并不导致MIC改变, 因此, 传统药敏试验结果不能指示药物耐受状态。MBC或MKD方法能够定量检测药物耐受, 但该方法的操作过程不适用于临床大规模开展^[10]。因此, 开发自动化的药物耐受定量检测方法将会推动药物耐受临床检测和研究。其次, 目前对影响临床细菌药物耐受的遗传因素/突变的了解还不全面。如上所述, 由于耐受与耐药性形成密切相关, 因此, 全面鉴定细菌药物耐受的遗传因素/突变不但会推动药物耐受诊断分子标识的发现, 还将为耐药性发生及治疗效果的早期监测提供理论基础, 并进一步推动持续性感染疾病新型治疗策略的开发。细菌全基因组测序的普及为系统鉴定临床细菌药物耐受遗传因素/突变提供了可能, 通过临床样本数据与基础研究结合, 将会进一步推动细菌药物耐受机制及防治策略的研究。

REFERENCES

- [1] Abraham EC, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin[J]. *Nature*, 1940, 146(3713): 837
- [2] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1): 42-51
- [3] Meylan S, Andrews IW, Collins JJ. Targeting antibiotic tolerance, pathogen by pathogen[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1228-1238
- [4] Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(8): 453-464
- [5] Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. Microbial persistence and the road to drug resistance[J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 13(6): 632-642
- [6] LaFleur MD, Qi QG, Lewis K. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(1): 39-44
- [7] Perriens JH, St Louis ME, Mukadi YB, et al. Pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients in Zaire—A controlled trial of treatment for either 6 or 12 months[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1995, 332(12): 779-784
- [8] Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats[J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 612-616
- [9] Kester JC, Fortune SM. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 49(2): 91-101
- [10] Brauner A, Fridman O, Gefen O, et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(5): 320-330
- [11] Levin BR, Rozen DE. Non-inherited antibiotic resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(7): 556-562
- [12] Eng RH, Padberg FT, Smith SM, et al. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991, 35(9): 1824-1828
- [13] Lee SW, Foley EJ, Epstein JA. Mode of action of penicillin: I. Bacterial growth and penicillin activity—*Staphylococcus aureus* FDA[J]. *Journal of Bacteriology*, 1944, 48(4): 393-399
- [14] Mc Dermott W. Microbial persistence[J]. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 1958, 30(4): 257-291
- [15] Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(7): 1818-1824
- [16] Herbert D, Paramasivan CN, Venkatesan P, et al. Bactericidal action of ofloxacin, sulbactam-ampicillin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(10): 2296-2299
- [17] Gutierrez A, Jain S, Bhargava P, et al. Understanding and sensitizing density-dependent persistence to quinolone antibiotics[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(6): 1147-1154
- [18] Fan XY, Tang BK, Xu YY, et al. Oxidation of dCTP contributes to antibiotic lethality in stationary-phase mycobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(9): 2210-2215
- [19] Bergkessel M, Basta DW, Newman DK. The physiology of growth arrest: uniting molecular and environmental microbiology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 549-562
- [20] Bigger JW. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation[J]. *The Lancet*, 1944, 244(6320): 497-500
- [21] Balaban NQ, Merrin J, Chait R, et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch[J]. *Science*, 2004, 305(5690): 1622-1625
- [22] Rao SPS, Alonso S, Rand L, et al. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(33): 11945-11950
- [23] Baker S, Thomson N, Weill FX, et al. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens[J]. *Science*, 2018, 360(6390): 733-738
- [24] Li L, Mendis N, Trigui H, et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 258
- [25] Chengalroyen MD, Beukes GM, Gordhan BG, et al. Detection and quantification of differentially culturable tubercle bacteria in sputum from patients with tuberculosis[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2016, 194(12): 1532-1540
- [26] Cardoso K, Gandra RF, Wisniewski ES, et al. DnaK and GroEL are induced in response to antibiotic and heat shock in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59(9): 1061-1068
- [27] Wu YX, Vulić M, Keren I, et al. Role of oxidative stress in persister tolerance[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(9): 4922-4926
- [28] Dörr T, Lewis K, Vulić M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(12): e1000760
- [29] Korch SB, Henderson TA, Hill TM. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(4): 1199-1213
- [30] Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria[J]. *Science*, 2011, 334(6058): 982-986
- [31] Raj A, van Oudenaarden A. Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences[J]. *Cell*, 2008, 135(2): 216-226
- [32] Wakamoto Y, Dhar N, Chait R, et al. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria[J]. *Science*, 2013, 339(6115): 91-95
- [33] Germain E, Roghanian M, Gerdes K, et al. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(16): 5171-5176
- [34] Keren I, Shah D, Spoering A, et al. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*[J].

- Journal of Bacteriology, 2004, 186(24): 8172-8180
- [35] Harrison JJ, Wade WD, Akierman S, et al. The chromosomal toxin gene *yafQ* is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(6): 2253-2258
- [36] Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(42): 28746-28753
- [37] Li M, Long YQ, Liu Y, et al. HigB of *Pseudomonas aeruginosa* enhances killing of phagocytes by up-regulating the type III secretion system in ciprofloxacin induced persister cells[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 125
- [38] Tripathi A, Dewan PC, Barua B, et al. Additional role for the *ccd* operon of F-plasmid as a transmissible persistence factor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(31): 12497-12502
- [39] Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*[J]. PLoS Biology, 2010, 8(2): e1000317
- [40] Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution[J]. PLoS Genetics, 2009, 5(12): e1000767
- [41] Singh R, Barry III CE, Boshoff HI. The three RelE homologs of *Mycobacterium tuberculosis* have individual, drug-specific effects on bacterial antibiotic tolerance[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(5): 1279-1291
- [42] Dhar N, McKinney JD. *Mycobacterium tuberculosis* persistence mutants identified by screening in isoniazid-treated mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(27): 12275-12280
- [43] Hansen S, Lewis K, Vulić M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(8): 2718-2726
- [44] Spoering AL, Vulić M, Lewis K. GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(14): 5136-5144
- [45] Shi WL, Zhang Y. PhoY2 but not PhoY1 is the PhoU homologue involved in persisters in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010, 65(6): 1237-1242
- [46] Li YF, Zhang Y. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(6): 2092-2099
- [47] Shah D, Zhang ZG, Khodursky AB, et al. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*[J]. BMC Microbiology, 2006, 6: 53
- [48] Manina G, Dhar N, McKinney JD. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 17(1): 32-46
- [49] Aldridge BB, Fernandez-Suarez M, Heller D, et al. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility[J]. Science, 2012, 335(6064): 100-104
- [50] Rego EH, Audette RE, Rubin EJ. Deletion of a mycobacterial divisome factor collapses single-cell phenotypic heterogeneity[J]. Nature, 2017, 546(7656): 153-157
- [51] Bergmiller T, Andersson AMC, Tomasek K, et al. Biased partitioning of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC underlies long-lived phenotypic heterogeneity[J]. Science, 2017, 356(6335): 311-315
- [52] Lyu LD, Tang BK, Fan XY, et al. Mycobacterial MazG safeguards genetic stability via housecleaning of 5-OH-dCTP[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(12): e1003814
- [53] Liu YC, Tan SM, Huang L, et al. Immune activation of the host cell induces drug tolerance in *Mycobacterium tuberculosis* both *in vitro* and *in vivo*[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2016, 213(5): 809-825
- [54] Yang JH, Bening SC, Collins JJ. Antibiotic efficacy—context matters[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 39: 73-80
- [55] Keren I, Minami S, Rubin E, et al. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters[J]. mBio, 2011, 2(3): e00100-11
- [56] Zhou XX, Cegelski L. Nutrient-dependent structural changes in *S. aureus* peptidoglycan revealed by solid-state NMR spectroscopy[J]. Biochemistry, 2012, 51(41): 8143-8153
- [57] Sarathy J, Dartois V, Dick T, et al. Reduced drug uptake in phenotypically resistant nutrient-starved nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(4): 1648-1653
- [58] Kumar P, Arora K, Lloyd JR, et al. Meropenem inhibits D,D-carboxypeptidase activity in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Molecular Microbiology, 2012, 86(2): 367-381
- [59] Gupta R, Lavollay M, Mainardi JL, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* protein Ldt_{M2} is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin[J]. Nature Medicine, 2010, 16(4): 466-469
- [60] Völzing KG, Brynildsen MP. Stationary-phase persisters to ofloxacin sustain DNA damage and require repair systems only during recovery[J]. mBio, 2015, 6(5): e00731-15
- [61] Amato SM, Fazen CH, Henry TC, et al. The role of metabolism in bacterial persistence[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 70
- [62] Ehrt S, Schnappinger D, Rhee KY. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(8): 496-507
- [63] Baek SH, Li AH, Sasseti CM. Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity[J]. PLoS Biology, 2011, 9(5): e1001065
- [64] Belenky P, Ye JD, Porter CBM, et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage[J]. Cell Reports, 2015, 13(5): 968-980
- [65] Lobritz MA, Belenky P, Porter CB, et al. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(27): 8173-8180
- [66] Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(20): E2100-E2109
- [67] Nandakumar M, Nathan C, Rhee KY. Isocitrate lyase mediates broad antibiotic tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*[J].

- Nature Communications, 2014, 5: 4306
- [68] Tiwari S, van Tonder AJ, Vilch ze C, et al. Arginine-deprivation-induced oxidative damage sterilizes *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(39): 9779-9784
- [69] Dwyer DJ, Camacho DM, Kohanski MA, et al. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis[J]. Molecular Cell, 2012, 46(5): 561-572
- [70] Cohen NR, Ross CA, Jain S, et al. A role for the bacterial GATC methylome in antibiotic stress survival[J]. Nature Genetics, 2016, 48(5): 581-586
- [71] Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, et al. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics[J]. Science, 2012, 336(6079): 315-319
- [72] Lu LD, Sun Q, Fan XY, et al. Mycobacterial MazG is a novel NTP pyrophosphohydrolase involved in oxidative stress response[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(36): 28076-28085
- [73] Rasouly A, Nudler E. Antibiotic killing through oxidized nucleotides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(9): 1967-1969
- [74] Al Mamun AA, Lombardo MJ, Shee C, et al. Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks[J]. Science, 2012, 338(6112): 1344-1348
- [75] Cirz RT, O'Neill BM, Hammond JA, et al. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(20): 7101-7110
- [76] Gutierrez A, Laureti L, Crussard S, et al. β -Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1610
- [77] Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis[J]. Molecular Cell, 2010, 37(3): 311-320
- [78] Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance[J]. Science, 2017, 355(6327): 826-830
- [79] Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes[J]. Nature, 2004, 427(6969): 72-74
- [80] Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, et al. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*[J]. Science, 2006, 313(5783): 89-92
- [81] Modi SR, Lee HH, Spina CS, et al. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome[J]. Nature, 2013, 499(7457): 219-222
- [82] Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(23): 6191-6199
- [83] Mitchison D, Davies G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future[J]. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2012, 16(6): 724-732
- [84] Garton NJ, Waddell SJ, Sherratt AL, et al. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum[J]. PLoS Medicine, 2008, 5(4): e75
- [85] Schumacher MA, Balani P, Min J, et al. HipBA-promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance[J]. Nature, 2015, 524(7563): 59-64
- [86] Hicks ND, Yang J, Zhang XB, et al. Clinically prevalent mutations in *Mycobacterium tuberculosis* alter propionate metabolism and mediate multidrug tolerance[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(9): 1032-1042
- [87] van Den Bergh B, Michiels JE, Wenseleers T, et al. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence[J]. Nature Microbiology, 2016, 1: 16020
- [88] Fridman O, Goldberg A, Ronin I, et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations[J]. Nature, 2014, 513(7518): 418-421
- [89] 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
- [90] Zheng H, Colvin CJ, Johnson BK, et al. Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* DosRST signaling and persistence[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13(2): 218-225
- [91] Nautiyal A, Patil KN, Muniyappa K. Suramin is a potent and selective inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response: RecA as a potential target for antibacterial drug discovery[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(7): 1834-1843
- [92] Wigle TJ, Sexton JZ, Gromova AV, et al. Inhibitors of RecA activity discovered by high-throughput screening: cell-permeable small molecules attenuate the SOS response in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biomolecular Screening, 2009, 14(9): 1092-1101
- [93] Lebeaux D, Chauhan A, L toff  S, et al. pH-mediated potentiation of aminoglycosides kills bacterial persisters and eradicates *in vivo* biofilms[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2014, 210(9): 1357-1366
- [94] Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides[J]. Nature, 2011, 473(7346): 216-220