

持留菌的控制研究进展

牛媛媛^{1,2}, 邱志刚^{*1,2}

1 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306

2 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050

牛媛媛, 邱志刚. 持留菌的控制研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3955-3966

Niu Yuanyuan, Qiu Zhigang. Control of persisters: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3955-3966

摘要: 持留菌是高度耐受抗生素的细菌亚群。持留菌的出现加剧了抗生素治疗感染性疾病的难度, 对人类的生命健康造成不可忽视的威胁。因此, 如何控制与去除持留菌成为目前的一个研究热点。本文主要综述了持留菌的基本特性与危害, 分析了持留菌形成的机制, 并系统地总结了目前持留菌控制与去除的方法。本文对研究控制持留菌及改善持续性感染的治疗具有一定的指导意义和参考价值。

关键词: 持留菌; 危害; 控制

Control of persisters: a review

NIU Yuanyuan^{1,2}, QIU Zhigang^{*1,2}

1 College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China

Abstract: Persisters, a subgroup of bacteria that can survive high dosage of antibiotics, make it more difficult to treat infections with antibiotics and threaten human life and health. How to control and remove persisters has become a research hotspot at the moment. In this paper, we summarize the characteristics and harms of persisters, analyze the formation mechanism of them, and sum up methods for controlling and removing this subgroup. This review is expected to guide the control of persisters and the treatment of persistent infection.

Keywords: persisters; hazards; control

基金项目: 国家自然科学基金(42177414, 31470234)

Supported by: National Nature Science Foundation of China (42177414, 31470234)

*Corresponding author: E-mail: zhigangqiu99@gmail.com

Received: 2022-01-06; Accepted: 2022-04-11; Published online: 2022-04-21

持留菌是细菌在生长过程中随机形成的休眠细胞亚群,对抗生素等选择压力高度耐受^[1-5]。1942年Hobby等首次发现抗生素不能完全杀死葡萄球菌,后来Bigger将抗生素不能杀死的细菌亚群称为持留菌,并且发现去除抗生素后,持留菌能恢复生长且具有与初始种群一样能被抗生素杀死的性质,从而提出了间歇灭菌治疗葡萄球菌感染的方法^[6-8]。然而,周期性暴露于高浓度抗生素的细菌群体,可能产生大量突变,从而导致耐受水平迅速上升,而且长时间的耐受可能演变为耐药^[9]。持留菌是多变环境中细菌的最佳防护策略^[10],使细菌在抗生素治疗时存活下来,从而导致慢性感染性疾病反复发作。持留菌导致的持续性感染大大增加了治疗难度,构成了重大的公共卫生问题^[7,11-12],使得人们对持留菌的控制与去除方法的探索与研究愈发重视。学者们通过阻遏细菌进入持留状态或诱导持留菌恢复生长,采用物理、化学、生物等手段等来控制或根除持留菌,但是各种方法都有一定的局限性。尽管持留菌一直是国内外研究的热点,但在其形成机制和有效控制方面仍有很大的探索空间。本文主要介绍了持留菌的特征、危害及形成机制,并讨论了持留菌的控制方法,以期有助于加深人们对持留菌的认识,提高对持留菌的控制水平,减少持留菌对人类健康的风险。

1 持留菌的产生与分型

持留是指细菌在抗生素治疗下存活的能力,也是持续感染时间延长的重要因素。无论在体外还是宿主体内,持留菌是对抗生素治疗不敏感的细菌亚群^[7]。

1.1 持留菌的特征

细菌在生长过程中,部分细菌会进入持留状态,形成持留菌。这种持留菌对多种药物具

有耐受性^[13],在致死浓度的抗生素条件下既不会生长也不会死亡。在细菌生长的迟缓期和指数前期,持留水平变化不大,而在指数中期显著增加^[14]。通常用随时间变化的抗生素杀灭曲线来表示持留的特征:曲线的第一阶段大多数细菌会因接触抗生素而迅速死亡,第二阶段表现出持留菌的死亡速度比它们的易感亲属慢得多^[15-16]。持留菌的RNA表达谱显示,参与能量产生和鞭毛合成等非必要功能的基因转录下调,这表明持留菌处于休眠状态且与其缓慢或不生长的表型一致^[17-18]。持留菌可能与正常细胞的形态难以区分,但是在某些情况下存在差异,如细胞壁缺陷型菌株(包括L型细菌和球形体)是一种特殊的持留形态,并不是休眠细胞,其通过特殊的机制克服抗生素的选择压力存活下来^[19]。结核杆菌培养时间较久时为球形,在生物膜中为细胞壁缺陷的L型^[20-21]。这些持留表型可能与特定基因有关,如翻译抑制因子*rmf*、分离抑制因子*sulA*,以及毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)基因座*relBE*、*dinJ*和*mazEF*等^[22-24]。

即使DNA序列未直接变化,生物体也会受到超过一代的表型变异的影响。持留现象是表型变异的一个显著例子。与遗传变异会在许多世代中遗传相比,因为未在DNA序列中编码,持留产生的表型变异从基因层面很难研究^[25]。根据细胞过程的波动和可变性,每个细菌群体都含有不同的持留菌。细菌的持留现象可能是种群内多种不同细胞生理的结果^[26-27]。HipA7突变体较野生菌株对抗生素有更高的耐受性,但是该突变体的持留菌恢复生长后的时间杀灭曲线表现出与突变体基本相同的模式,这表明持留是不可遗传的^[14]。

1.2 持留菌的分型

持留菌分为I型和II型持留菌。I型持留菌是在压力信号下产生的,如饥饿、高细胞密度、

酸性 pH、热、免疫因子、抗生素、过氧化物、弱酸和能量抑制剂等^[28]都会诱发 I 型持留。pH 条件变化及降低的营养供应等压力信号引起的 I 型持留是野生型菌株(如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌等)对抗生素耐受的主要因素^[14,29]。I 型持留是一种细菌耐受抗生素的特殊状态,与耐受有相似的机制,如细菌休眠、新陈代谢降低和 ATP 水平变化等^[7]。蛋白质合成停止和环境信号提示会形成细菌的持留,如利福平等抗生素通过阻遏转录或翻译途径诱发病原菌形成持留^[30];金黄色葡萄球菌通过多种代谢途径影响小菌落变异体中毒力因子的表达来形成持留^[31];高温和金属(铜和锌)也是诱发柠檬黄杆菌形成持留的因素之一,其诱发的持留率可以增加 10–100 倍^[32];吞噬环境可以提高分枝杆菌人亚种的持留水平,并且该持留种群随金属离子浓度的不同而不同^[33]。这种持留状态使细胞在致命压力下存活下来^[34]。即使移除诱导压力,持留菌仍然可能存在很长一段时间,即单个细胞暴露于压力后需要的恢复时间可能取决于持留水平。当抗生素为诱发因素时,较高的药物浓度会激活细胞的应激反应使之存活。在这种情况下,持留水平取决于所用的抗生素类别及其浓度^[7]。

II 型持留菌是指正常细胞不需要压力信号,自发产生的持留^[34]。当细菌处于稳定的指数增长状态,持留可能会自发产生,并且只要保持稳定增长,持留率就保持不变,这种持留叫作 II 型持留^[7,35]。持留状态的产生为细胞在多变的环境中提供了可靠的生存策略,这种表型变异能使细胞在致死环境压力下延续种群^[25]。

总而言之,持留的产生是随机的^[28],是一种自发形成过程或应对恶劣环境变化的应激反应,环境适宜后可以再恢复为正常细胞的状态。这种持留状态的细胞时间短暂、不可培养。持

留菌是一种代谢能力低下的休眠、不分裂的细胞^[5],可以耐受抗生素的灭杀,与其同种群的敏感细胞基因相同^[7,15]。

1.3 细菌在自然生长与环境压力产生持留菌的区别

野生型大肠杆菌在指数增长期间会随机产生少数缓慢生长的持留菌^[7]。持留表型的出现取决于信号核苷酸(p)ppGpp、Lon 蛋白酶、无机多聚磷酸和毒素-抗毒素^[36]。(p)ppGpp 的水平在指数增长的细胞群体中随机变化,只有极少数细胞出现高水平的(p)ppGpp 来诱发缓慢生长和持留^[36]。(p)ppGpp 通过依赖于无机多聚磷酸和 Lon 蛋白酶的级联反应激活毒素-抗毒素位点,从而诱发生长缓慢^[36]。营养充分的自然生长状态下,TA 产生毒素增加种群异质性,持留菌便是小部分表型异质的群体^[37]。此时密码子出现误译的频率为 10^{-4} ,当这些小的错误频率开始累积时,细菌持留的速度就会增加^[38]。

环境压力下,不同的种群具有不同的机制来形成持留^[39]。一些细菌如铜绿假单胞菌通过响应群感信号分子来增加持留菌数量^[40],大肠杆菌可以被污染物抑制呼吸作用从而增加持留率^[41],变形链球菌通过感受态刺激因子(competence stimulating peptide, CSP)在细菌群体中传递环境压力信息,从而增加持留水平^[27]。目前,学者大多认为细菌主要是通过 TA 系统等相应机制在转录或翻译等途径阻遏生长过程,进入休眠状态,提高持留水平^[42]。我们的研究结果也表明纳米材料产生的环境选择压力,能促进耐药基因在细菌间水平转移^[43-45],还能诱导部分细菌转向持留状态从而抵抗纳米材料的杀灭作用存活下来^[46]。

2 持留菌的危害

细菌对抗生素的抗性是影响人类健康的问

题之一。然而越来越多的证据表明,不是耐药病原体而是抗生素耐受的持留菌导致了大多数难以治疗的慢性感染疾病^[15]:如根管治疗后,以链球菌持留菌为主的厚壁菌门是引发持续性牙髓感染的主要原因^[47];分枝杆菌持留菌导致治疗结核病的时间延长^[21];金黄色葡萄球菌持留会导致各种慢性和复发性感染(骨髓炎、心内膜炎和植入装置的感染)^[48]。研究发现,细胞内的金黄色葡萄球菌持留菌在撤去抗生素压力,恢复正常培养状态后,会保持代谢活性,但表现出与应激反应相一致的转录特征的变化。这种变化与耐受有关,可诱发慢性感染疾病,从而导致药物治疗失败^[49]。

持留进化很快,逐渐会转变成耐药,耐药菌也存在持留状态^[50],导致慢性感染、抗生素治疗失败,使病人备受折磨,产生昂贵的住院治疗费用^[48]。持留水平高的菌株会迅速替代持留水平低的菌株,持留会逐渐转为群体耐受^[51]。抗生素治疗是导致细菌产生抗生素耐药的途径之一,如抗生素间歇暴露会迅速导致耐受的演变,而耐受增加了耐药突变在群体中传播的机会,为随后的耐药快速进化铺平了道路^[9,52]。持留可被看作细菌获得遗传型耐药突变的中间过程。群感效应、SOS系统等持留的应激反应促进了抗生素耐药性在菌群中的水平传播^[53],同时环境中的纳米材料等因素增强了细菌抗生素抗性基因的获得,耐药基因的广泛传播对健康和生态产生重大影响^[44,54-55]。

持留可能会在种群水平上表现出优势,这是一种更好地对抗环境压力的策略^[27]。每种细菌都存在持留状态^[56],可以应对波动的压力环境,确保菌群在恶劣环境中存活^[27]。细菌持留水平随着环境适宜性的降低而增加。细胞对极端环境压力的适应性越差其产生持留的能力越强,也就是说,细胞对过度刺激毒素的压力越

敏感,持留越容易形成^[57]。细胞是主动抵抗压力还是转变成持留菌,取决于压力的强度和类型^[58]。

3 持留机制

阐明细菌进入持留的机制是消除细菌持留现象的重要前提。学者们已对持留菌的形成机制进行了大量研究,希望从根本上解决细菌对抗生素耐受的问题^[59],但是关于持留的完整形成机制尚不明确^[27-28,60],学者们通常认为持留菌的形成主要包括以下机制。

3.1 TA 系统

TA系统通常由2种元素组成:一种是稳定的毒素,通过干扰翻译等基本细胞生理过程使细胞中毒;另一种是不稳定的抗毒素,可以中和与其同源的毒素。TA系统在细胞生理活动中起着至关重要的作用,特别是在持留细胞形成过程中^[58],TA系统参与了多种类型持留菌的形成。细菌细胞中含有许多编码TA系统的基因,这些基因针对不同的细胞过程影响持留菌的形成。沙门氏菌的乙酰转移酶毒素 TacT 能阻断负载在 tRNA 分子上的氨基酸中的伯胺基,从而抑制 tRNA 的翻译促进持留水平升高^[61]。结核分枝杆菌的 TA 系统 DarTG 能够催化 DNA 的可逆 ADP 核糖基化,同时引发 SOS 反应,抑制 DNA 复制等生物过程使其进入持留,是持留过程中的应激策略之一^[62]。大肠杆菌产生的 YafQ 毒素能够抑制细胞中吡啶信号的产生,进而增加持留菌的形成,说明 TA 系统与细胞信号有关^[63]。引起齧齿的变形链球菌持留菌数量增加主要是由于 II 型 TA 系统 MazEF 和 RelBE 的异位表达^[27]。大肠杆菌中的 HipA 蛋白是一种属于 Tor 族的激酶,能抑制细胞生长并诱导持留或多药耐受。HipA 通过在核糖体 A 位点产生“饥饿”密码子来调节持留,该密码子触发

(p)ppGpp 的合成^[64]。毒素 RelE、MazF、HipA 的过表达显著增加了持留水平, 但是部分基因如 *rmf*、*relE* 或 *mazF* 的缺失未对持留表型产生明显影响, 说明导致持留的基因元件有冗余^[27,65-67]。例如大肠杆菌中至少有 10 对 TA 系统, 变形链球菌中有 4 对(MazE/MazF、RelB/RelE、XRE COG2856 和 PIN/AbrB) II 型 TA 系统^[18,27,68]。持留不仅与 HipA 或专门毒素的表达引起的毒性有关, 还与其他无关蛋白的表达有关, 如沙门氏菌中的热休克蛋白 DnaJ 和磷酸乙醇胺转移酶 PmrC 是 2 个与 TA 系统无关的酶, 但当它们异位表达时会变成细胞有毒蛋白, 促进菌群产生 100–1 000 倍的持留菌^[67]。研究发现铜绿假单胞菌持留的形成与 PA0610 基因调控绿脓杆菌素的生成有关, 绿脓杆菌素通过群感效应进一步促进持留的形成^[69]。

TA 系统不仅在持留形成中起作用, 在持留菌恢复时也发挥重要作用。如氟喹诺酮类药物损伤持留菌 DNA 后, 直到 II 型 TA 系统合成一种蛋白质类抗毒素才能使细菌恢复生长, 这有效地延迟了与生长相关的过程, 为 DNA 的修复赢得了时间, 所以 TA 系统对持留菌的存活至关重要^[70]。若毒素水平高于阈值, 细胞就会进入休眠状态, 超过阈值程度决定休眠的持续时间; 毒素水平在阈值上下波动会导致休眠细胞和生长细胞共存。TA 系统导致休眠细胞亚群的产生, 也是一种调节生长停滞的频率和持续时间的机制^[60]。学者们建立了描述转录调控的随机模型, 通过随机增加游离毒素水平来模拟持留细胞的形成。这种模型可使人们更好地理解 TA 系统及 TA 与持留的关系, 为从根源上控制持留的发生提供解决方案^[5]。

TA 系统在细菌持留中的作用也存在一定局限性。在不能产生吡啶的菌株中, 细菌毒素 YafQ 的产生对持留水平的影响要小得多^[63]。也

有学者认为 TA 系统与持留形成无直接关系^[71], 如磷酸盐饥饿、酸和渗透胁迫导致一些特定的 II 型 TA (包括 *dinJ/yafQ*、*mazEF*、*mqrSA*、*relBE*、*yafNO*) 的表达上调, 但在这些条件下并不增加细菌的持留水平^[15]。TA 系统的功能冗余, 不同 TA 系统的关系相互依赖、错综复杂。若存在一个完全无 TA 系统的菌株, 将可以更好地观察 TA 在持留形成中的作用, 然而 TA 系统在许多细菌基因组中数量较多, 很难完全去除^[37,72]。对 TA 系统作用的研究还需进一步加强。

3.2 SOS 反应

DNA 损伤诱导的 SOS 反应是持留菌产生和细菌群体广泛耐受的关键因素之一。SOS 反应是一种可诱导的 DNA 损伤修复系统。除了 2 个重要的 SOS 调节器 LexA 和 RecA, 一些压力源或压力响应也可以调控 SOS 反应, 如 DNA 损伤因子、环境因素(包括香烟烟雾)等^[73]。SOS 反应是激活 TA 系统的主要途径之一^[40]。大肠杆菌 TisB/IstR 系统是截至目前唯一与持留菌形成有关的 SOS 调节 TA 系统。SOS 反应对生物膜的形成起着关键作用, 动态生物膜环境会产生 DNA 损伤因子, 触发生物膜内的 SOS 反应, 从而增加细菌的多样性及对环境的适应性^[73]。

3.3 DNA、RNA 异化

腺嘌呤甲基化酶通过转录控制、细胞运动、DNA 修复和代谢物转运过程介导持留菌形成, 这是 DNA 甲基化调节基因表达促进大肠杆菌持留形成的首要依据^[74]。tRNA 的 m¹G37 甲基化不仅对细菌的生存和生长至关重要, 而且与革兰氏阴性菌的多药耐药和持留密切相关。通常细菌通过关闭体内主要代谢活动而只保留药物外排系统的活性进入持留状态。最近的研究结果表明 tRNA 的 m¹G37 甲基化控制了细菌细胞膜的内膜和外膜的生物合成, 从而决定了细胞被膜结构的完整性, 为药物的外排提供便利

条件,是细菌耐药和滞留新的机制^[75]。脱酰 tRNA 的积累能够触发细菌滞留,并且这一过程不依赖于 RelA 相关的应激反应,主要是通过对生理信号响应转录调控控制实现对细菌滞留的调节^[38]。DNA、RNA 异化主要通过转录、翻译的控制触发细菌滞留^[74-75]。

3.4 信号分子

细菌通过可扩散的群体感应信号分子进行细胞密度感应,这些群体感应信号与滞留形成息息相关。学者在研究铜绿假单胞菌的过程中发现了滞留菌数量增加是响应群体感应的现象^[40]:滞留率随着群体感应相关信号分子[如绿脓杆菌苷和 N-(3-氧代碘酰酞基)-L-高丝氨酸内酯]的增加而增加^[18,40]。在环境压力下,种内群体感应系统在诱导滞留菌形成过程中起重要作用^[27]。在变形链球菌和肺炎链球菌中,群体感应信号 CSP 在某些应激环境中能起到应激信息素或“警告素”的作用,促进细菌滞留水平提高^[27]。细菌进入稳定期后,在高浓度的抗生素作用下大量的滞留菌会存活下来,这一阶段滞留菌的产生主要是营养匮乏、信号分子增加等导致的^[76-77]。

吡啶信号是一种细菌信号分子,由于营养限制而产生,通过激活应激反应来诱导大肠杆菌亚群对抗生素,从而导致滞留的形成^[78]。增加吡啶水平会导致滞留菌的增加,从而对不同类别的抗生素产生耐受^[59]。吡啶诱导的滞留在一定程度上是对细胞周质或胞外空间中吡啶浓度的反映。吡啶在生理浓度下是无毒的,但其会触发保护性反应以利于滞留菌抵御未来可能出现的压力^[78]。

通过干扰细菌种内群体感应系统可以影响滞留的形成,这将为药物的开发提供有效的策略。例如,研究发现部分藻类和陆生植物产生的化合物能够干扰细菌群体感应^[27,76]。

3.5 其他

Huemer 等对滞留菌进行蛋白质组学分析发现,翻译后磷酸化修饰导致翻译活性降低,细菌生长停滞,滞留水平增加^[79-80]。除此之外,细菌 ATP 水平降低,更有可能进入滞留状态^[47]。为了应对营养缺乏导致的饥饿,大肠杆菌中 (p)ppGpp 激活 I 型 HokB-SokB TA 模块的转录表达,HokB 毒素水平升高导致膜去极化,细菌发生严谨反应,进入滞留状态^[19,81]。细菌通过自身独特的机制在各种环境压力下存活下来,目前发现的机制并非单一起作用,机制之间存在冗余,关于主要机制的确定还需要进一步研究。

4 滞留菌的控制措施

人们尝试了许多新治疗方法如合成化合物来杀死滞留菌。目前常用的方法包括化学、物理和生物手段等。通过复苏或改变滞留菌的新陈代谢状态,如刺激滞留菌恢复对抗生素的敏感性或间歇给药、开发新药、使用适当的药物组合、联合化疗和免疫治疗等方法来更有效地控制滞留菌^[21],从而为治疗各种慢性感染提供可行性方案。

4.1 物理手段

铜绿假单胞菌滞留菌可以通过低水平直流电来消除,联合抗生素使用效果更好,但是这种方法很难用于临床治疗,对防止医疗器械引起的感染有一定控制作用^[82-83]。

研究发现纳米材料可以抑制生物膜和滞留菌的形成,如 5-硝基吡啶(5N)修饰的 CuO/ZnO 双金属纳米颗粒 [5-nitroindole (5N)-capped CuO/ZnO bimetal nanoparticles, 5NNP],除具有抗菌和抗生物膜作用外,还能抑制耐多药菌株铜绿假单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的滞留菌形成^[84]。该方法无细胞毒性,具有潜在的应用前景,可以替代抗生素作为杀菌剂,

但是 5 NNP 在体内的作用还需要进一步研究^[84]。咖啡碱包被的金纳米颗粒(gold nanoparticles obtained from caffeine, Caff-AuNPs)具有防止生物膜形成、破坏生物膜及杀死不同类型革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌和单核细胞增生李斯特菌)和革兰氏阴性菌(铜绿假单胞菌和大肠埃希氏菌)的能力;金纳米颗粒合成过程绿色环保,可用作潜在药物对抗由致病细菌形成的生物膜引起的慢性感染,从而缩减抗生素治疗时间^[85]。然而 Caff-AuNPs 的杀菌机制尚不清楚。

4.2 化学手段

新的化学物质具有抗菌的潜力,有望替代抗生素成为新的抗菌手段。一种新的 1,3,5-三嗪衍生物,能够有效控制革兰氏阴性菌的持留和生物膜的生长,被认为是一种有效的抗菌化合物^[86]。抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸可减少铜和锌诱导橘黄单胞菌(*Xanthomonas citri*)的持留,但不能减少四环素诱导的持留^[34]。此外,不依赖新陈代谢的药物(如顺铂和丝裂霉素 C)及铜能够在高浓度下杀死橘黄单胞菌持留菌^[34]。特定的氨基酸(如脯氨酸和异亮氨酸)能够干扰橘黄单胞菌休眠的生理平衡,刺激或阻止持留复苏^[34]。这些可以诱导、唤醒和杀死橘黄单胞菌持留细胞的化学物质,为控制持留菌提供了参考^[34]。Kim 等^[87]筛出一种化合物 C10,其可以选择性地杀死对抗生素耐受的持留菌,但不影响对抗生素敏感的正常细胞。虽然 C10 本身并不影响正常的细胞生长,但其通过使持留菌恢复到对抗生素敏感的状态而导致持留菌死亡^[87]。因此,寻找 C10 的结合靶点应该能进一步有效控制持留菌。C10 显著降低了氟喹诺酮类抗生素诱导的大肠杆菌和铜绿假单胞菌的持留水平,但是无抗生素作用时,这种化合物如何去除其他压力诱导的持留菌还需进一步研究。抗菌肽是杀灭病原体非常有效的方法,可以通过靶向细胞

膜控制生物膜和持留菌^[86]。氨基酸与抗生素协同作用能增强抗生素的杀菌效果,如半胱氨酸等细菌代谢调节剂能够增强环丙沙星等常用抗生素对革兰氏阴性杆菌的持留菌的杀灭效果^[88]。

4.3 生物手段

压力条件下,细菌毒素 *mqsR* 的表达高于抗毒素 *mqsA* 的表达;当毒素的转录被抑制时,就能根除持留菌^[89]。因此有学者通过反义治疗手段构建了反义 *mqsR*-PNA (肽核酸)作为根除铜绿假单胞菌持留菌的潜在靶点^[89]。35 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的 *mqsR*-PNA 作用 24 h 可以完全清除持留细胞^[90]。反义 PNA 可以调节铜绿假单胞菌的其他毒素-抗毒素翻译以去除持留菌^[89]。然而这种方法较为复杂,尚不能实际应用于持留菌治疗。

以 $m^1\text{G37}$ 为靶点开发新型抗菌疗法具有多方面优势,如目前新的纳米效价抑制剂可用于对抗革兰氏阳性细菌^[75]。然而该抑制剂仍然存在渗透性差、敏感性差等局限,这使得了解和探索 TrmD 调节细菌通透性和外排的生物合成能力更加必要^[75]。由于 TrmD 本身是一种胞内酶,一旦进入体内,这些抑制剂会减少 $m^1\text{G37-tRNA}$ 的生物合成,对细胞膜造成足够的破坏,从而允许其他抗生素发挥作用并加速杀菌作用^[75]。这将是一种新的作用机制,可以根除多药耐药细菌和持留菌^[75]。

将杀死生长细菌的药物和杀死持留菌的药物联合使用,可以完全根除含有持留菌的感染。在治疗时,用具有强效杀菌效果的抗生素迅速杀死种群中不断增长的细菌,再用克林沙星杀死持留菌;克林沙星在组合中是至关重要的,可以抑制细菌 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV,不同于其他喹诺酮类药物,克林沙星苯环上含有氯基,具有独特的杀死持留菌的能力^[91]。

生物膜中包括生长的正常细菌和代谢低下

的持留菌。铜绿假单胞菌表面的生物膜几乎不能被目前的抗菌剂穿透,使用宿主特异性噬菌体可能是一种潜在的替代方法。研究发现将不锈钢板上形成的生物膜用噬菌体处理后,噬菌体能够有效控制生物膜的发展,生物膜去除率达到 90%。但由于生物膜的复杂结构和细菌的可塑性,噬菌体对附着细胞的去除效果较差^[92]。

目前生物方法具有靶向治疗的特点,但是去除机制尚不清楚,持留菌的去除效果也有待加强。物理、化学手段合成新的药剂来替代抗生素,对去除持留菌有一定作用,但是是否能长期使用并且保持较好的去除率还有待研究。噬菌体与抗生素或其他药物联合使用,能从不同机制抑制细菌生长,从而有效杀灭持留菌。

5 展望

由持留菌引起的感染对医疗卫生系统提出了巨大的挑战,寻找一种替代抗生素的治疗药物迫在眉睫。众多学者尝试了不同的方法清除持留菌,但是都有一定的局限性。持留菌的控制措施有待进一步探索和改进。作为这个问题的潜在解决方案,生物手段如噬菌体特异性疗法越来越受到人们的关注。

在不同的生态环境中,噬菌体的丰度和多样性是细菌生存的主要阻力^[93]。噬菌体用途广泛,在各种生理条件下都具有感染细菌的能力^[51]。单细胞观察噬菌体裂解的时间杀灭过程表明,持留菌并非直接被噬菌体杀死,只有当细菌从持留状态转变为正常生长时,裂解过程才会进行^[51]。细菌的遗传个性可以显著影响种群动态,或许与细菌和噬菌体的共同进化有关^[51],将噬菌体传代培养靶向裂解同一细菌种群,或许能达到清除或控制持留菌的目的。找到噬菌体侵染正常细菌与持留菌时细菌基因表达的不同,也许对去除持留菌提供方法和思路。

除此之外,基于抗生素杀死细菌的机制去寻找药物靶点来去除持留菌或者构建新的杀菌材料等都是潜在根除持留的方法。在将来,物理、生物等多种方法组合使用或许使得去除持留更高效。

REFERENCES

- [1] Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch[J]. *Science*, 2004, 305(5690): 1622-1625
- [2] Choi MJ, Ko KS. Persister cells[J]. *Journal of Bacteriology & Virology*, 2013, 43(1): 37-44
- [3] Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides[J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 216-220
- [4] Amato SM, Orman MA, Brynildsen MP. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(4): 475-487
- [5] Gelens L, Hill L, Vandervelde A, Danckaert J, Loris R. A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli*[J]. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(8): e1003190
- [6] Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1942, 50(2): 281-285
- [7] Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, Brynildsen MP, Bumann D, Camilli A, Collins JJ, et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(7): 441-448
- [8] Bigger J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation[J]. *The Lancet*, 1944, 244(6320): 497-500
- [9] Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shoshitaishvili N, Balaban NQ. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance[J]. *Science*, 2017, 355(6327): 826-830
- [10] Browning AP, Sharp JA, Mapder T, Baker CM, Burrage K, Simpson MJ. Persistence as an optimal hedging strategy[J]. *Biophysical Journal*, 2021, 120(1): 133-142
- [11] Helaine S, Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(7): 417-424
- [12] Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(8): 453-464
- [13] Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms

- underlying bacterial persisters[J]. *Cell*, 2014, 157(3): 539-548
- [14] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang YP, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 230(1): 13-18
- [15] Ronneau S, Helaine S. Clarifying the link between toxin-antitoxin modules and bacterial persistence[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(18): 3462-3471
- [16] Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(5): 320-330
- [17] Spoering AL, Vulic M, Lewis K. GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(14): 5136-5144
- [18] Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(1): 48-56
- [19] Zou J, Peng B, Qu JX, Zheng J. Are bacterial persisters dormant cells only?[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 708580
- [20] Zhang Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis[J]. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 2004, 9: 1136-1156
- [21] Zhang Y, Yew WW, Barer MR. Targeting persisters for tuberculosis control[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(5): 2223-2230
- [22] Christensen SK, Pedersen K, Hansen FG, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 332(4): 809-819
- [23] Yoshida H, Maki Y, Kato H, Fujisawa H, Izutsu K, Wada C, Wada A. The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of *Escherichia coli*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2002, 132(6): 983-989
- [24] Christensen SK, Gerdes K. RelE toxins from bacteria and archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(5): 1389-1400
- [25] Gefen O, Balaban NQ. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(4): 704-717
- [26] Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(5): 593-598
- [27] Leung V, Lévesque CM. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(9): 2265-2274
- [28] 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
- [29] Kreling V, Falcone FH, Kehrenberg C, Hensel A. *Campylobacter* sp.: pathogenicity factors and prevention methods-new molecular targets for innovative antivirulence drugs?[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(24): 10409-10436
- [30] Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, Wood TK. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(3): 1468-1473
- [31] Tuchscher L, Löffler B, Proctor RA. Persistence of *Staphylococcus aureus*: multiple metabolic pathways impact the expression of virulence factors in small-colony variants (SCVs)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1028
- [32] Martins PMM, Wood TK, De Souza AA. Persister cells form in the plant pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under different stress conditions[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 384
- [33] Danelishvili L, Armstrong E, Miyasako E, Jeffrey B, Bermudez LE. Exposure of *Mycobacterium avium* subsp. *homonissuis* to metal concentrations of the phagosome environment enhances the selection of persistent subpopulation to antibiotic treatment[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(12): 927
- [34] Gefen O, Gabay C, Mumcuoglu M, Engel G, Balaban NQ. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria[J]. *PNAS*, 2008, 105(16): 6145-6149
- [35] Cañas-Duarte SJ, Restrepo S, Pedraza JM. Novel protocol for persister cells isolation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88660
- [36] Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity[J]. *Cell*, 2013, 154(5): 1140-1150
- [37] Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea[J]. *Annual Review of*

- Genetics, 2011, 45: 61-79
- [38] Wood WN, Mohler K, Rinehart J, Ibba M. Deacylated tRNA accumulation is a trigger for bacterial antibiotic persistence independent of the stringent response[J]. *mBio*, 2021, 12(3): e0113221
- [39] 崔鹏, 许涛, 张文宏, 张颖. 细菌持留与抗生素表型耐药机制[J]. *遗传*, 2016, 38(10): 859-871
- Cui P, Xu T, Zhang WH, Zhang Y. Molecular mechanisms of bacterial persistence and phenotypic antibiotic resistance[J]. *Hereditas*, 2016, 38(10): 859-871 (in Chinese)
- [40] Möker N, Dean CR, Tao JS. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(7): 1946-1955
- [41] 魏维, 方杰, 李根, 陈旭, 李博, 李辉信, 胡锋, 武俊. 对硝基苯酚对细菌产生持留菌的影响及其相关机制[J]. *微生物学报*, 2018, 58(1): 28-38
- Wei W, Fang J, Li G, Chen X, Li B, Li HX, Hu F, Wu J. Influence of *p*-nitrophenol on bacteria persisters[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(1): 28-38 (in Chinese)
- [42] Long YQ, Fu WX, Li SY, Ren H, Li M, Liu C, Zhang BY, Xia YS, Fan Z, Xu C, et al. Identification of novel genes that promote persister formation by repressing transcription and cell division in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(9): 2575-2587
- [43] Qiu ZG, Yu YM, Chen ZL, Jin M, Yang D, Zhao ZG, Wang JF, Shen ZQ, Wang XW, Qian D, et al. Nanoalumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera[J]. *PNAS*, 2012, 109(13): 4944-4949
- [44] Ding CS, Pan J, Jin M, Yang D, Shen ZQ, Wang JF, Zhang B, Liu WL, Fu JL, Guo X, et al. Enhanced uptake of antibiotic resistance genes in the presence of nanoalumina[J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10(8): 1051-1060
- [45] Qiu ZG, Shen ZQ, Qian D, Jin M, Yang D, Wang JF, Zhang B, Yang ZW, Chen ZL, Wang XW, et al. Effects of nano-TiO₂ on antibiotic resistance transfer mediated by RP4 plasmid[J]. *Nanotoxicology*, 2015, 9(7): 895-904
- [46] Wang S, Zhao C, Xue B, Li CY, Zhang X, Yang XB, Li Y, Yang YP, Shen ZQ, Wang JF, et al. Nanoalumina triggers the antibiotic persistence of *Escherichia coli* through quorum sensing regulators IrsF and qseB[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129198
- [47] Nardello LCL, Pinheiro ET, Gavini G, Prado LC, Romero RX, Gomes BPF, Skelton-Macedo MC. Nature and prevalence of bacterial taxa persisting after root canal chemomechanical preparation in permanent teeth: a systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Endodontics*, 2022
- [48] Huemer M, Mairpady Shambat S, Bergada-Pijuan J, Söderholm S, Boumasmoud M, Vulin C, Gómez-Mejía A, Antelo Varela M, Tripathi V, Götschi S, et al. Molecular reprogramming and phenotype switching in *Staphylococcus aureus* lead to high antibiotic persistence and affect therapy success[J]. *PNAS*, 2021, 118(7): e2014920118
- [49] Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée JY, Wolz C, Tenson T, Van Bambeke F. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 2200
- [50] 李好, 程磊, 周学东, 任彪. 持留菌与抗药菌的相互关系及其转化[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(8): 628-633
- Li H, Cheng L, Zhou XD, Ren B. Relationship and conversion between persisters and antimicrobial resistant bacteria[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2017, 37(8): 628-633 (in Chinese)
- [51] Pearl S, Gabay C, Kishony R, Oppenheim A, Balaban NQ. Nongenetic individuality in the host-phage interaction[J]. *PLoS Biology*, 2008, 6(5): e120
- [52] Liu Y, Yang KN, Zhang HJ, Jia YQ, Wang ZQ. Combating antibiotic tolerance through activating bacterial metabolism[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 577564
- [53] 陆君卓, 程磊, 周学东, 任彪. 持留菌的控制与清除研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(1): 77-82
- Lu JZ, Cheng L, Zhou XD, Ren B. The progresses and perspectives of the control and eradication of persistent bacteria[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2018, 31(1): 77-82 (in Chinese)
- [54] Yang D, Qiu ZG, Shen ZQ, Zhao H, Jin M, Li HY, Liu WL, Li JW. The occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China)[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(6): 576
- [55] Li YQ, Yang D, Wang S, Li CY, Xue B, Yang L, Shen ZQ, Jin M, Wang JF, Qiu ZG. The detailed bactericidal process of ferric oxide nanoparticles on *E. coli*[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2018, 23(3): 606
- [56] 景双艳, 魏莲花. 金黄色葡萄球菌生物膜形成及其与持留菌关系研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021,

- 34(1): 102-105
- Jing SY, Wei LH. Advances in research on formation of *Staphylococcus aureus* biofilm and its relationship to retained bacteria[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2021, 34(1): 102-105 (in Chinese)
- [57] 姜倩倩, 李国才. 毒素抗毒素系统促进持留菌形成的分子机制[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(76): 120-122, 131
- Jiang QQ, Li GC. Molecular mechanism of formation of persisters mediated by toxin-antitoxin system[J]. World Latest Medicine Information, 2019, 19(76): 120-122, 131 (in Chinese)
- [58] Hong SH, Wang XX, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases[J]. Microbial Biotechnology, 2012, 5(4): 509-522
- [59] Kint CI, Verstraeten N, Fauvart M, Michiels J. New-found fundamentals of bacterial persistence[J]. Trends in Microbiology, 2012, 20(12): 577-585
- [60] Rotem E, Loinger A, Ronin I, Levin-Reisman I, Gabay C, Shoshitashvili N, Biham O, Balaban NQ. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence[J]. PNAS, 2010, 107(28): 12541-12546
- [61] Cheverton AM, Gollan B, Przydacz M, Wong CT, Mylona A, Hare SA, Helaine S. A *Salmonella* toxin promotes persister formation through acetylation of tRNA[J]. Molecular Cell, 2016, 63(1): 86-96
- [62] Jankevicius G, Ariza A, Ahel M, Ahel I. The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA[J]. Molecular Cell, 2016, 64(6): 1109-1116
- [63] Hu Y, Kwan BW, Osbourne DO, Benedik MJ, Wood TK. Toxin YafQ increases persister cell formation by reducing indole signalling[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(4): 1275-1285
- [64] Germain E, Castro-Roa D, Zenkin N, Gerdes K. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA[J]. Molecular Cell, 2013, 52(2): 248-254
- [65] Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies[J]. Journal of Medical Microbiology, 2011, 60(Pt 6): 699-709
- [66] Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon[J]. Journal of Biosciences, 2008, 33(5): 795-805
- [67] Vázquez-Laslop N, Lee H, Neyfakh AA. Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(10): 3494-3497
- [68] Brown JM, Shaw KJ. A novel family of *Escherichia coli* toxin-antitoxin gene pairs[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(22): 6600-6608
- [69] Roux A, Payne SM, Gilmore MS. Microbial telesensing: probing the environment for friends, foes, and food[J]. Cell Host & Microbe, 2009, 6(2): 115-124
- [70] Mok WWK, Brynildsen MP. Timing of DNA damage responses impacts persistence to fluoroquinolones[J]. PNAS, 2018, 115(27): E6301-E6309
- [71] Goormaghtigh F, Fraikin N, Putriņš M, Hallaert T, Hauryliuk V, Garcia-Pino A, Sjödin A, Kasvandik S, Udekwi K, Tenson T, et al. Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells[J]. mBio, 2018, 9(3): e00640-e00618
- [72] Harms A, Brodersen DE, Mitarai N, Gerdes K. Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology[J]. Molecular Cell, 2018, 70(5): 768-784
- [73] Podlessek Z, Bertok DŽ. The DNA damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population wide tolerance[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1785
- [74] Xu YY, Liu S, Zhang Y, Zhang WH. DNA adenine methylation is involved in persister formation in *E. coli*[J]. Microbiological Research, 2021, 246: 126709
- [75] Hou YM, Masuda I, Foster LJ. tRNA methylation: an unexpected link to bacterial resistance and persistence to antibiotics and beyond[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2020, 11(6): e1609
- [76] Defoirdt T, Boon N, Bossier P. Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption?[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(7): e1000989
- [77] 潘奕欣, 马宁宁, 赵婧, 赵梓含, 庞燕, 高娟, 韩俭. 4种病原菌体外培养对抗菌药物持留形成特征[J]. 兰州大学学报(医学版), 2017, 43(4): 6-10
- Pan YX, Ma NN, Zhao J, Zhao ZH, Pang Y, Gao J, Han J. Characteristics of persistence formation of four pathogens against antimicrobial agents under cultural condition[J]. Journal of Lanzhou University: Medical Sciences, 2017, 43(4): 6-10 (in Chinese)
- [78] Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation[J]. Nature Chemical Biology, 2012, 8(5): 431-433
- [79] Sulaiman JE, Lam H. Proteomics in antibiotic resistance and tolerance research: mapping the resistome and the tolerome of bacterial pathogens[J]. Proteomics, 2022:

- 2100409
- [80] Huemer M, Shambat SM, Pereira S, Gestel LV, Zinkernagel AS. Ser/Thr phospho-regulation by PknB and Stp mediates bacterial quiescence and antibiotic persistence in *Staphylococcus aureus*[J]. BioRxiv, 2021
- [81] Verstraeten N, Knapen WJ, Kint CI, Liebens V, Van Den Bergh B, Dewachter L, Michiels JE, Fu Q, David CC, Fierro AC, et al. O₂ and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance[J]. Molecular Cell, 2015, 59(1): 9-21
- [82] Grant SS, Kaufmann BB, Chand NS, Haseley N, Hung DT. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals[J]. PNAS, 2012, 109(30): 12147-12152
- [83] 刘小龙, 杨万霞, 马延龄, 王丹, 陈昊. 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
- Liu XL, Yang WX, Ma YL, Wang D, Chen H. Research progress in the formation mechanism and treatment of persister[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2020, 19(2): 184-188 (in Chinese)
- [84] Manoharan RK, Mahalingam S, Gangadaran P, Ahn YH. Antibacterial and photocatalytic activities of 5-nitroindole capped bimetal nanoparticles against multidrug resistant bacteria[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 188: 110825
- [85] Khan F, Park SK, Bamunuarachchi NI, Oh D, Kim YM. Caffeine-loaded gold nanoparticles: antibiofilm and anti-persister activities against pathogenic bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(9): 3717-3731
- [86] Bahar AA, Liu ZG, Garafalo M, Kallenbach N, Ren DC. Controlling persister and biofilm cells of Gram-negative bacteria with a new 1,3,5-triazine derivative[J]. Pharmaceuticals: Basel, Switzerland, 2015, 8(4): 696-710
- [87] Kim JS, Heo P, Yang TJ, Lee KS, Cho DH, Kim BT, Suh JH, Lim HJ, Shin D, Kim SK, et al. Selective killing of bacterial persisters by a single chemical compound without affecting normal antibiotic-sensitive cells[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(11): 5380-5383
- [88] Liu Y, Yang KN, Jia YQ, Shi JR, Tong ZW, Wang ZQ. Cysteine potentiates bactericidal antibiotics activity against Gram-negative bacterial persisters[J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 2593-2599
- [89] Wang XX, Kim Y, Hong SH, Ma Q, Brown BL, Pu MM, Tarone AM, Benedik MJ, Peti W, Page R, et al. Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(6): 359-366
- [90] Al Hussein LB, Maleki A, Al Marjani MF. Antisense mqsR-PNA as a putative target to the eradication of *Pseudomonas aeruginosa* persisters[J]. New Microbes and New Infections, 2021, 41: 100868
- [91] Yee R, Yuan YT, Tarff A, Brayton C, Zhang Y. A drug combination approach targeting both growing bacteria and dormant persisters eradicate persistent *Staphylococcus aureus* biofilm infection[J]. BioRxiv, 2019
- [92] Magin V, Garrec N, Andrés Y. Selection of bacteriophages to control *in vitro* 24 h old biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking and thermal water[J]. Viruses, 2019, 11(8): 749
- [93] Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(6): 278-284