

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(7):949-958; 4 July 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140486

鲍曼不动杆菌耐药持留菌的特征及 II 型毒素-抗毒素系统的多样性

马亚男^{1,2}, 朱玉莹³, 李维城⁴, 刘飞², 律娜², 李晶², 朱宝利^{2*}, 胡永飞^{2*}

¹安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039

²中国科学院微生物研究所, 北京 100101

³中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071

⁴北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100101

摘要:【目的】研究鲍曼不动杆菌持留菌的特征, 分析鲍曼不动杆菌 II 型毒素-抗毒素 (TA) 系统的多样性及分布, 探讨 TA 系统与持留菌形成的潜在关联。【方法】采用分属于 6 大类中的 6 种不同抗生素分别筛选的方法分离并定量鲍曼不动杆菌的持留菌; 应用 PSI-BLAST 及 TBLASTN 程序分析 721 株鲍曼不动杆菌中的 II 型 TA 系统; 通过聚合酶链式反应 (PCR) 方法检测 44 株临床多重耐药 (MDR) 的鲍曼不动杆菌中 5 个 II 型 TA 系统的分布。【结果】我们发现不同抗生素处理得到的鲍曼不动杆菌持留菌的数量并不相同; 对多数抗生素而言, 浓度越高, 得到的持留菌数量越少; 处于生长平台期的菌株中相对数期含有更多的持留菌; 多粘菌素 B 及妥布霉素均具有杀灭部分持留菌的能力; 鲍曼不动杆菌所有菌株中均含有 II 型 TA 系统, HTH/GNAT 类型在菌株中分布最为广泛; 所有 700 余株鲍曼不动杆菌基因组中共含有 15 个潜在的 II 型 TA 系统; 三类普遍存在于已知基因组中的明确功能的 II 型 TA 系统在临床多重耐药菌株中同样分布广泛, 且 HigB/HigA 的表达量在标准株的持留菌中显著增高。【结论】鲍曼不动杆菌的持留菌水平与菌株的生长状态、抗生素的种类及浓度密切相关。II 型 TA 系统在鲍曼不动杆菌已知基因组和临床多重耐药菌株中普遍存在, 其中, HTH/GNAT、GP49/Cro (HigB/HigA) 及 DUF497/COG3514 三种类型的 II 型 TA 系统可能在鲍曼不动杆菌持留菌的形成中扮演重要角色。

关键词: 抗生素耐药, 持留菌, II 型毒素-抗毒素系统, 鲍曼不动杆菌

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 07-0949-10

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 是一种需氧非发酵型革兰氏阴性细菌, 被认为是诱发院内

获得性肺炎及菌血症的首要原因^[1], 已成为我国乃至世界范围内最重要的病原菌之一。鲍曼不动杆菌

基金项目: 国家自然科学基金 (81401701, C010503); 北京市自然科学基金 (5152019); 国家“973 计划”项目 (2015CB554200)

* 通信作者。胡永飞, Tel/Fax: +86-10-64807438, E-mail: huyf@im.ac.cn; 朱宝利, Tel/Fax: +86-10-64807362, E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

作者简介: 马亚男 (1991-), 女, 安徽亳州人, 硕士研究生, 主要从事细菌耐药研究。E-mail: mayn@im.ac.cn

收稿日期: 2014-10-12; **修回日期:** 2015-01-07

具有强大的获得耐药基因和克隆传播的能力^[2],多重耐药(MDR)甚至全耐药(PDR)菌株不断出现,给临床抗感染治疗带来了极大挑战^[3]。

近年来,随着人们对细菌耐药研究的不断深入,除了耐药菌之外,药物敏感菌(正常细菌)中一部分可以耐受高致死浓度抗生素的细胞亚群引起了人们的广泛关注^[4-7]。这类细胞亚群被称为耐药持留菌(persister)。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*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)等细菌中均证实了持留菌的存在^[8-11]。借助微流体装置及荧光检测技术, Balaban 及 Rotem 等甚至在单细胞水平上观察并监测到了持留菌^[12-13]。持留菌的耐药表型不被遗传;当抗生素压力去除后,细菌重新繁殖并对抗生素敏感^[11]。

持留菌形成的分子机制极为复杂,很多因素比如全局转录调控因子、毒素-抗毒素系统(TA 系统)、密度信号感应系统(QS)、抗氧化反应等都在持留菌形成中扮演了重要的角色^[14-15]。其中,研究较为深入的是 TA 系统介导的持留菌形成机制。典型的 TA 系统是由具有相互作用的毒素(蛋白)和抗毒素(蛋白或非编码 RNA)所组成^[16];当外界环境改变时,抗毒素快速降解,释放出与之配对的毒素蛋白;毒素蛋白进而作用于 DNA 复制、细胞壁合成、细胞分裂等重要的细胞进程,导致细胞生长受到抑制,细胞从而进入休眠状态并耐受抗生素。目前共发现 5 种不同类型(Type I-V)的 TA 系统^[17],其中与持留菌形成密切相关的主要是 II 型 TA 系统^[18-19]。将大肠埃希菌 II 型 TA 的毒素基因敲除或过表达均能显著影响细胞持留菌水平,证明 II 型 TA 系统能够调控细菌的持留现象^[10,20-22]。

持留菌及其形成机制之所以引起广泛关注,是因为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。鲍曼不动杆菌作为一种重要院内感染致病菌,其广泛耐药,感染复发及病程的迁延等临床特性不容忽视;而形成这些特性的根源很可能归因于鲍曼不动杆菌持留菌的存在。然而,目前国内外对鲍曼不动杆菌持留菌的了解十分有限,鲍曼不动杆菌持留菌的生物学特征也

尚未被揭示。因此,本研究首先分离了鲍曼不动杆菌的持留菌,并在各种不同的抗生素压力条件下分析了持留菌的变化规律,并对其生物学特性进行了表征;然后利用生物信息学对 700 余株鲍曼不动杆菌基因组中含有的 II 型 TA 系统进行了分析;最后对 44 株多重耐药的临床鲍曼不动杆菌中含有的具有潜在功能的 II 型 TA 系统进行了检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 19606,由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供;44 株多重耐药的鲍曼不动杆菌分离自中国人民解放军第 306 医院临床检验科的非重复临床标本;721 株鲍曼不动杆菌基因组信息从 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网站上下载后用于生物信息学分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.1.2 主要仪器和试剂:AlphaImager EP(通用型)凝胶成像仪购于美国 Alpha Innotech 公司;Z216 MK 型离心机购于德国 HERMLE 公司;分光光度计 V-1200 购于上海美谱达仪器公司;HPX-9272 MBX 型恒温培养箱购于上海博迅公司等。细菌总 RNA 提取试剂盒购于德国 QIAGEN 公司;反转录试剂盒购于美国 Invitrogen 公司。实验所用抗生素详细情况及鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 19606 对 13 种抗生素的药敏性实验结果参见表 1。

1.2 鲍曼不动杆菌标准株生长曲线测定

从 -80℃ 冰箱中将冻存的鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 19606 复苏,挑取单菌落接种到 5 mL LB 培养基中,置于恒温摇床上 37℃、200 r/min 过夜培养 12 h,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,每隔一小时测定一次菌液的 OD_{600} 值,测定鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 培养 24 h 的生长曲线,确定对数期与平台期的培养时间。

1.3 抗生素作用于鲍曼不动杆菌最低抑菌浓度(MIC 值)的测定

多种抗生素作用于鲍曼不动杆菌标准株 MIC 值的测定参考美国临床实验室标准化协会 CLSI M07-A9 的标准方法来确定最低抑菌浓度(MIC 值)。44 株临床鲍曼不动杆菌使用细菌分析仪进行

菌种鉴定和抗生素敏感性测定。所有菌株均为多重耐药菌,我们前期报道了其中 38 株菌基因组中与耐药相关的整合子结构^[23]。

1.4 持留菌的分离及定量

鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 19606 复苏后以 1:100 的比例接种到 5 mL 试管里,37 °C 培养箱中 200 r/min 培养。当菌液长到对数期或平台期时加入 5 × MIC、10 × MIC、20 × MIC、50 × MIC 的 6 种不同抗生素(四环素、妥布霉素、环丙沙星、多粘菌素 B、头孢他啶、亚胺培南),37 °C 孵育 5 h 以上。转移 1 mL 培养液到 1.5 mL 离心管中 8000 × g 离心 5 min 后弃上清。用 1 mL 的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,混匀。根据抗生素浓度,清洗 2-4 次确保抗生素被完全清除。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^[24]。

1.5 持留菌耐药表型的遗传性测定

挑取经抗生素处理后分离得到的持留菌单克隆(N > 1000),将其接种到含有(50 × MIC)抗生素的固体 LB 培养基中,不加抗生素的 LB 培养基做对照。根据持留菌在加抗生素的培养基上的生长状况来确定持留菌耐药表型的遗传性。

1.6 鲍曼不动杆菌 TA 系统多样性分析

利用目前已知的毒素-抗毒素蛋白序列作为参考序列,通过 PSI-BLAST 及 TBLASTN 对 721 株已经测序的鲍曼不动杆菌基因组可能的毒素-抗毒素系统(TAs)进行蛋白同源性分析;使用在线搜索引擎 RASTA (Rapid Automated Scan for Toxins and Antitoxins in Bacteria)^[25] 工具及数据库 TADB (Toxin-antitoxin Database)^[26] 对 TA 系统进行归类 and 比较分析,蛋白的相似性及精确性通过 EMBOSS^[27] 工具确认。

1.7 临床鲍曼不动杆菌中 TA 系统的检测

我们从生物信息分析所得的 TA 系统中挑选出 5 个功能已知的 II 型 TA 系统^[28],并分析其在 44 株临床多耐药鲍曼不动杆菌中的分布情况。梯度 PCR 确定引物的退火温度,PCR 反应条件如下:94 °C 10 min;94 °C 变性 30 s、按梯度 PCR 确定退火温度并保持 45 s、72 °C 延伸 1 min,循环 30 次;72 °C 最终延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测有无及片段大小,测序验证产物的准确性。

1.8 Real-time PCR 定量 II 型 TA 系统

将鲍曼不动杆菌标准株及用头孢他啶 CAZ 处理后分离的持留菌取样后立即冻存在细菌 RNA 保护剂中,使用 QIAGEN RNA 提取试剂盒提取细菌总 RNA,并立即反转录成 cDNA。随后以 cDNA 为模板,Real-time PCR 同时扩增 16S rRNA 及 5 类 II 型 TA 系统基因,5 对 II 型 TA 系统引物参考文献^[29],每次扩增设置 3 次平行实验,分析耐药持留菌形成前后 II 型 TA 系统的表达变化。具体反应条件如下:95 °C 10 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,40 个循环;熔解曲线:95 °C 15 s;60 °C 1 min;95 °C 15 s。使用 7300 system software 软件对反应结果进行分析。

1.9 统计学处理

鲍曼不动杆菌 16S rRNA 及 II 型 TA 系统的相对定量的结果用 Student's *t* test (*T* 检验)进行显著性差异分析,显著性水平选择 5 % 即: $P \leq 0.05$ 时表明差异显著, $P \leq 0.01$ 表明差异极显著。

2 结果和分析

2.1 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的耐药性及抗生素 MIC 值

在研究鲍曼不动杆菌持留菌的特征之前,我们首先对准菌株 ATCC 19606 的抗生素抗性谱进行了测定。我们选择了 7 大类抗生素中的 13 种代表抗生素,参照 CLSI 标准进行抗生素敏感性实验并测定了每种抗生素的最低抑菌浓度。鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 19606 对头孢噻肟(CPM),氨苄青霉素(AMP)和头孢吡肟(CPM)耐药;对头孢噻肟(CTX),头孢曲松(CTR)耐药性处于中介状态;对其它 9 种抗生素均敏感(表 1)。

2.2 鲍曼不动杆菌持留菌的特征

2.2.1 鲍曼不动杆菌持留菌水平依赖于抗生素的种类:

为了研究不同抗生素条件下,鲍曼不动杆菌持留菌的形成水平,我们挑选出分属 6 大类抗生素中的 6 种不同抗生素,分别用 50 × MIC 的抗生素处理处于对数生长期的菌株并收集存活的持留菌。高浓度的抗生素能够杀死几乎所有的敏感细胞,而持留菌能够耐受高浓度抗生素,我们推测抗生素处理鲍曼不动杆菌后会得到与其他细菌类似的二相型的死亡曲线^[7,27]。从图 1-A 可知不同抗生素处理初期细菌的 CFU 急剧下降,对于大部分抗生素而言,大约

表 1. 鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 19606 的抗生素抗性谱

Table 1. Antimicrobial susceptibility profile of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606

Antibiotic classes	Antibiotic drugs	abbreviation	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S/I/R ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Aminoglycoside	Kanamycin	KAN	16	S (16/32/64)
	Tobramycin	TOB	4	S (4/8/16)
	Amikacin	AMK	16	S (16/32/64)
Carbapenems	Imipenem	IMP	4	S (4/8/16)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CIP	0.5	S (1/2/4)
	Levofloxacin	LEV	0.125	S (2/4/8)
Extended-spectrum cephalosporins	Cefotaxime	CTX	16	I (8/16 – 32/64)
	Ceftriaxone	CTR	16	I (8/16 – 32/64)
	Ceftazidime	CAZ	4	S (8/16/32)
Polymyxins	Cefepime	CPM	32	R (8/16/32)
	Polymyxin B	PB	2	S (2/ – /4)
tetracyclines	Tetracycline	TET	1	S (4/8/16)
Penicillins	Ampicillin	AMP	64	R (16/32/64)

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

1 h之前是第一阶段曲线,这一阶段曲线的快速下降说明菌群中大部分对抗生素敏感的正常细胞接触高浓度的抗生素后快速死亡;1 h后进入第二段曲线,这段曲线趋于稳定,表明一部分缓慢生长并对抗生素耐受的细胞亚群最终存活下来(持留菌);这一结果和预期一致。

有意思的是,不同抗生素处理后,鲍曼不动杆菌的持留菌水平并不一致(图 1-A)。其中多粘菌素 B 及妥布霉素处理后,细胞存活率急剧下降,2 h 之后存活的细胞便迅速降低至 10^2 左右。其余 4 种抗生素处理后,虽然都呈现出典型的二相型的死亡曲线,但持留菌的比例也并不相同,大约维持在 $10^4 - 10^6$

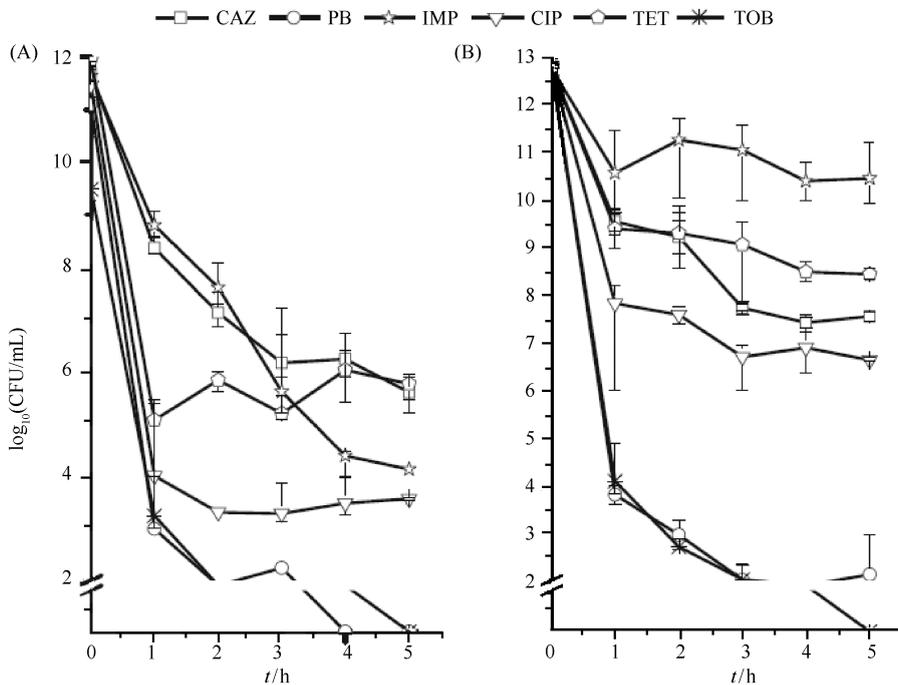


图 1. 不同的抗生素处理后,鲍曼不动杆菌标准株 ATCC 19606 的死亡曲线

Figure 1. Killing kinetics of ATCC 19606 exposed to different antibiotics. Exponential (A) or stationary (B) grown ATCC 19606 was treated with $50 \times \text{MIC}$ of indicated antibiotics over time. The limit of detection was defined as 100 CFU/mL throughout all killing experiments. The lower bacterial numbers were considered as not detectable. Standard deviation is shown for three replicates.

左右。这些结果说明鲍曼不动杆菌持留菌水平依赖于抗生素的种类。

2.2.2 鲍曼不动杆菌持留菌水平与细菌的生长状态相关: 为了进一步确认鲍曼不动杆菌的持留菌水平是否与菌株的生长状态有关, 我们用 6 种抗生素处理处于平台期的菌株。总体上, 平台期处理后的细胞死亡曲线与对数期非常相似(图 1-B): 多粘菌素 B 及妥布霉素能够迅速杀死细胞, 其余 4 种抗生素呈现二相型死亡曲线; 最明显的差异是 4 种不同抗生素处理后, 平台期持留菌的数量显著高于对数期。亚胺培南处理后平台期的持留菌甚至是对数期的 10^6 倍, 其余 3 种抗生素(头孢他啶、环丙沙星、四环素)处理约是对数期持留菌量的 10^2 倍。这些结果说明鲍曼不动杆菌的持留菌水平与菌株的生长状态密切相关, 生长至平台期的菌株中含有数量更多的持留菌。此外, 综合对数期和平台期结果, 多粘菌素 B 及妥布霉素均能够显著降低细胞的存活率, 很可能是因为这两种抗生素具有杀死静止状态细胞(持留菌)的能力。

2.2.3 鲍曼不动杆菌持留菌水平依赖于抗生素的浓度: 上述结果表明鲍曼不动杆菌的持留菌水平与抗生素的种类和菌株的生长状态相关; 然而上述实验中我们使用的是 $50 \times \text{MIC}$ 的抗生素处理菌株。为了确认鲍曼不动杆菌的持留菌水平是否与抗生素浓度有关, 我们用 $5 \times$ 、 $10 \times$ 、 $20 \times$ 、 $50 \times \text{MIC}$ 的抗生素分别处理对数期的菌液并计算持留菌的数量。结果表明不同倍数 MIC 值的抗生素处理后, 最终持留菌形成的数量并不相同(图 2)。以四环素为例, 不同倍数 MIC 值处理初期, 细菌的 CFU 都急剧下降, 但到达死亡平台期的时间有一定差异; $20 \times$ 、 $50 \times \text{MIC}$ 的四环素在处理后的 1 h 内就急速下降到死亡平台期, 而 $5 \times$ 、 $10 \times \text{MIC}$ 的四环素则在处理后的 4 h 后才达到稳定状态。此外, 不同倍数 MIC 处理后的持留菌水平也略有差别; $5 \times$ 、 $10 \times$ 、 $20 \times$ 、 $50 \times \text{MIC}$ 处理后 4 h 后, 持留菌水平分别为 $10^{-4.0}$ 、 $10^{-4.5}$ 、 $10^{-5.5}$ 、 $10^{-6.0}$; 继续延长处理时间至 20 h, 持留菌水平依然维持在上述数值(图 2)。跟四环素

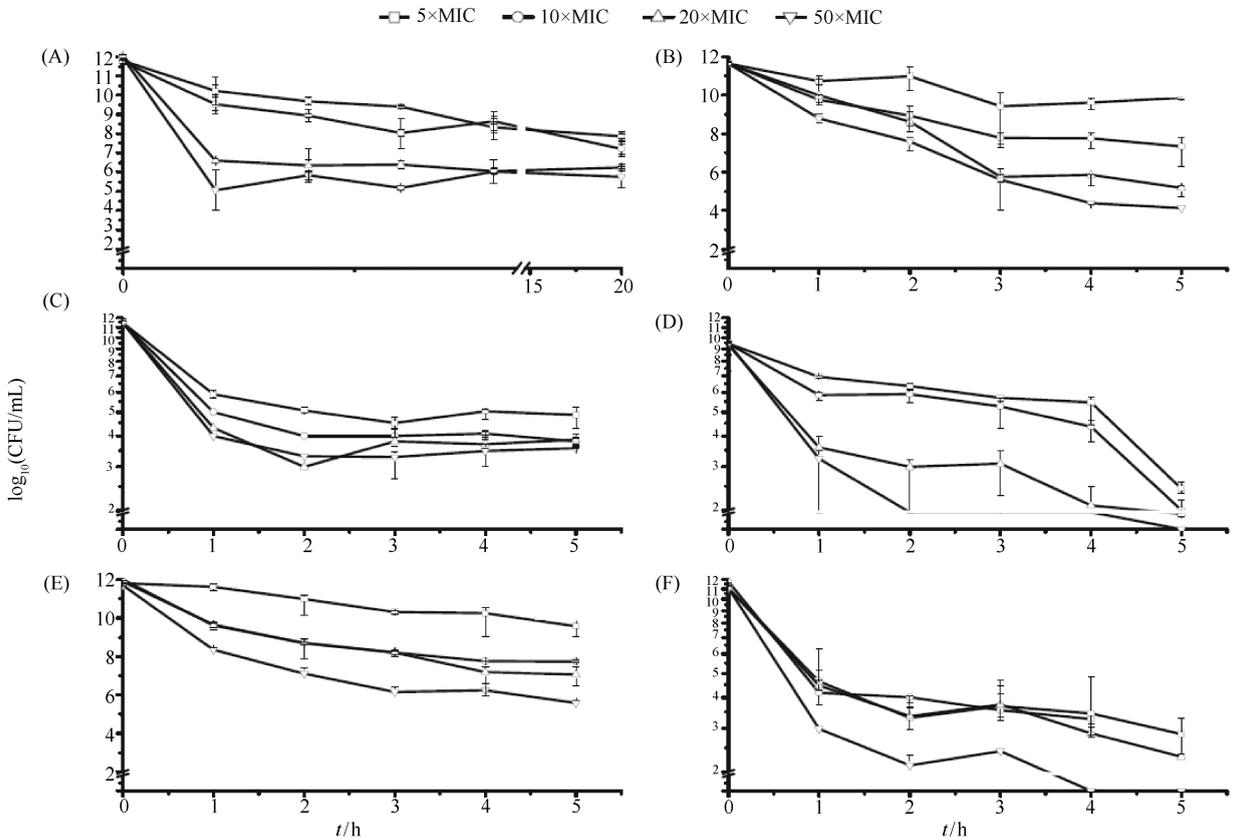


图 2. 不同 MIC 值 ($5 \times$ 、 $10 \times$ 、 $20 \times$ 、 $50 \times \text{MIC}$) 抗生素的杀菌实验

Figure 2. Killing of *A. baumannii* ATCC 19606 by varying concentrations of drugs ($5 \times$ 、 $10 \times$ 、 $20 \times$ 、 $50 \times \text{MIC}$). The lower bacterial numbers were considered as not detectable. Standard deviation is shown for three replicates. A: TET; B: IMP; C: CIP; D: TOB; E: CAZ; F: PB.

类似,不同浓度的亚胺培南、头孢他啶、环丙沙星及多粘菌素 B 处理后,到达死亡平台期的时间及最终持留菌的量各有差别。仅妥布霉素处理后不完全遵循二相型死亡曲线的走势,在处理后的第 5 h 曲线急速下降。总之,无论使用哪种抗生素处理,所用的浓度越高,最终持留菌的量就越低。综合上述结果说明鲍曼不动杆菌持留菌的形成不仅是抗生素种类和菌株生长状态依赖的,同时与抗生素的浓度具有负相关性。

2.2.4 鲍曼不动杆菌持留菌的耐药表型不可遗传:

基因突变是另一种细菌获得耐药表型的方式,而突变后的表型将会遗传给下一代细胞;因此,为了验证上述实验中出现的细菌耐药表型是真正的持留耐药还是由突变引起的,我们将高浓度抗生素 ($50 \times \text{MIC}$) 处理后剩余的细菌涂布平板,随机挑选 1000 个菌落,分别划线于加入相应抗生素 ($50 \times \text{MIC}$) 的培养基和不加抗生素的对照培养基。结果表明所有菌落都能够在不加抗生素的 LB 培养基上生长,而无法在抗性培养基上生长,即持留菌在传代时重新变成了敏感菌。说明持留菌的耐药表型不能够被遗传,并不是因为菌株的突变或者获得耐药基因引起

的。在其它细菌中已证实:与抗性突变不同,持留菌在重新生长时仍然对抗生素敏感^[13];我们在鲍曼不动杆菌中进一步证实了这一现象,说明耐药表型不被遗传是持留菌的基本特性。

2.3 鲍曼不动杆菌 II 型 TA 系统的多样性

由于 II 型 TA 系统在细菌持留菌的形成过程中起到重要作用,因此我们对目前所有已知的鲍曼不动杆菌的基因组(包括完成图和草图共 721 株)进行了 II 型 TA 系统的同源性搜索。我们首先收集了目前已知序列的主要的 II 型 TA 系统的蛋白序列,然后利用蛋白同源分析的方法搜索 721 株鲍曼不动杆菌的基因组。我们从所有菌株中共搜索到 15 对 II 型 TA 系统(图 3),包括 RelB/RelE、HicA/HicB 及 HigB/HigA 等目前已得到功能验证的 II 型 TA 系统的同源基因。其中,HTH/GNAT(HTH 结构域/GCN5 相关的乙酰转移酶超家族)只存在于染色体上,是鲍曼不动杆菌中发现的分布最为广泛的一类 TA 系统:在 721 株菌株中,714 株(99%)均含有此系统,说明该 TA 系统很可能在鲍曼不动杆菌持留菌的形成中可能起到主导作用。此外,GP49/Cro(HigB/HigA 的同源基因)、DUF497/COG3514 这两

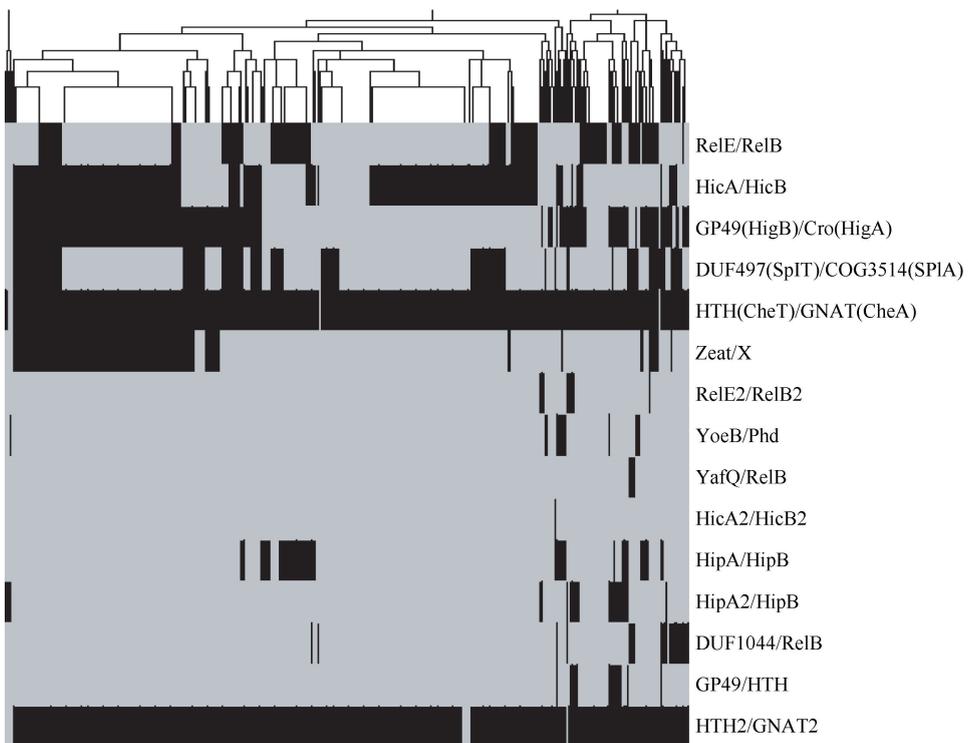


图 3. 721 株鲍曼不动杆菌中 II 型 TA 系统的聚类分析

Figure 3. Cluster analysis of type II TA system in 721 *A. baumannii*.

对只存在于质粒上的 TA 系统及 Zeta/X TA 系统在鲍曼不动杆菌中分布也较为广泛, 分别占总菌株数的 51%、34% 及 33%。对 II 型 TA 系统在已知基因组中的分布统计显示 (图 4), 不同菌株中含有的 II 型 TA 系统的数目差异较大 (1-9 种之间), 其中含有 3-6 种 II 型 TA 系统的菌株占总菌株数的 85%, 且没有任何一个菌株中不含 II 型 TA 系统; 说明 II 型 TA 系统在鲍曼不动杆菌中广泛存在, 且多样性十分丰富。

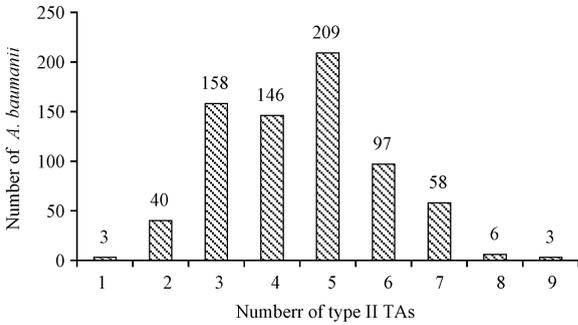


图 4. 721 株鲍曼不动杆菌基因组中 II 型 TA 系统数量的分布

Figure 4. Distribution of TA loci in 721 *A. baumannii*.

2.4 临床耐药鲍曼不动杆菌中 II 型 TA 系统的检测

临床环境中的耐药鲍曼不动杆菌, 由于长期受到抗生素的选择性压力, 某些 TA 系统的功能很可能比较活跃, 并且分布可能不同于其它来源的菌株。为了初步分析 II 型 TA 系统在临床耐药菌株中的分布, 我们挑选了 5 个功能已知的 II 型 TA 系统, 利用 PCR 扩增的方法检测它们在 44 株多重耐药临床菌株中的分布情况, 并通过测序验证扩增产物 (图 5)。结果表明存在于染色体上的 II 型 TA 系统 HTH/GNAT 在临床耐药菌株中的分布同样最为广泛, 含有该系统的菌株占总菌株数的 61%; 存在于质粒上的 GP49/Cro (HigB/HigA) 与 DUF497/COG3514 均占到临床耐药菌株的三分之一以上; 这些结果与上述生物信息学的分析结果较为一致。值得注意的是, RelB/RelE 在临床耐药菌株中的比例偏高 (56%), 而 HicA/HicB 则偏低 (35%), 它们在所有已知基因组中的比例分别为 32% 和 60%; 这一结果说明这两对 TA 系统很可能与临床鲍曼不动杆菌的在抗生素压力下的菌株进化相关。

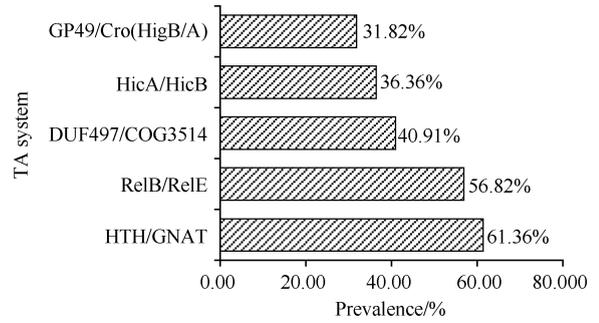


图 5. 5 个 II 型 TA 系统在 44 株多重耐药临床鲍曼不动杆菌菌株中的分布

Figure 5. Occurrence of 5 functional type II TA systems in 44 clinical MDR *A. baumannii* isolates.

2.5 三类 II 型 TA 系统在鲍曼不动杆菌持留菌中的表达量显著增高

基因组学分析及临床菌株检测结果均表明 II 型 TA 系统在鲍曼不动杆菌中多样性十分丰富。为了进一步验证 II 型 TA 系统与持留菌形成的潜在关联, 我们对耐药持留菌形成前后 5 类 II 型 TA 系统在标准菌株中的表达量变化进行了分析 (图 6)。结果表明, 与基因组学和临床菌株的分析结果非常吻合, 三类广泛分布的 TA 系统 HTH/GNAT、GP49/Cro (HigB/HigA) 及 DUF497/COG3514 在持留菌中的表达量均高于非持留菌 (抗生素处理前的正常菌) 3 倍以上, 差异显著 ($P < 0.05$)。这一结果有力证实了这三类 II 型 TA 系统与鲍曼不动杆菌持留菌的形成密切相关。此外, RelB/RelE 与 HicA/HicB II 型 TA 系统的表达量在统计学上差异不显著, 提示其可能在鲍曼不动杆菌持留菌的形成中不起主导作用。

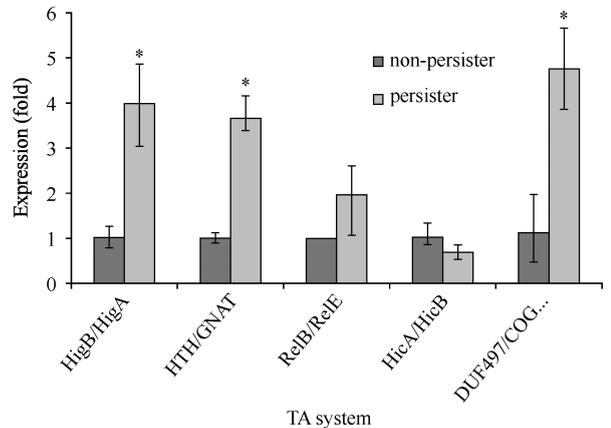


图 6. 5 个 II 型 TA 系统在鲍曼不动杆菌持留菌及非持留菌中的表达差异

Figure 6. The different expression of five type II TA system in *A. baumannii* (non-persister) and the persister of *A. baumannii*.

3 讨论

细菌具有多种耐药机制,如编码抗生素水解酶、外排泵,药物靶点突变,膜通透性改变等,这些机制能够帮助细菌在恶劣的环境中存活^[13]。一种与上述机制不同且不涉及基因组变异但十分有效的耐药方式逐渐被人们所熟知,即产生异质化的持留菌。这是细菌应对不良环境的两面下注策略:让一小部分细菌进入类似休眠状态,从而耐受高浓度的抗生素^[7]。这种能够在敏感细菌中产生耐药表型的持留现象普遍存在于细菌和真菌中。

鲍曼不动杆菌持留菌的形成很可能是导致临床抗生素治疗失败的重要原因之一,研究鲍曼不动杆菌持留菌的特征及形成机制具有重要的理论和临床意义。本研究发现鲍曼不动杆菌的持留菌水平与菌株的生长状态密切相关:平台期的细菌菌群中含有的持留菌比例显著高于对数生长期;我们推测主要原因可能是平台期状态下细菌的营养的匮乏(如氨基酸或葡萄糖匮乏)、密度信号感应效应及生物膜形成等压力信号可诱发持留菌的形成。我们今后将对不同生长状态下形成的持留菌的转录组进行测序,分析基因表达的差异及代谢途径的变化等来深入揭示这一问题。此外,我们同时发现,鲍曼不动杆菌的持留菌水平是抗生素种类和浓度依赖的。最值得注意的是不管菌株的生长状态如何,多粘菌素 B 与高浓度的妥布霉素均具有杀死部分持留细胞的能力(图 1, 2)。这一结果对抗生素的临床使用具有重要指导意义,即可以优先利用这两种抗生素治疗鲍曼不动杆菌持留菌引发的感染。另一方面,目前临床上主要通过菌株的药敏实验来指导用药,而敏感菌的耐药持留问题并不在考虑范围。然而我们的研究表明虽然我们使用的鲍曼不动杆菌标准株对 6 种抗生素均为敏感表型,然而耐受高剂量抗生素的持留细胞普遍存在。因此,今后如果能在抗生素使用前检测菌株的持留菌水平来指导用药,将极大提高抗细菌感染的临床治疗效果。

TA 系统在细菌和古菌中普遍存在,虽然其具体的生理功能还不完全清楚,但通常被认为与程序性细胞死亡(PCD)或细胞生长停滞相关。近来,有学者认为 TA 系统在不良环境下通过释放毒素产生类似休眠状态的细胞亚群来调控细菌的持留菌^[11],当

毒素的活性被抗毒素所抑制时,缓慢生长的细菌能够重新进入快速生长分裂的状态。根据毒素及抗毒素的相互作用,TA 系统被分成 5 种类型(I-V),其中 II 型 TA 系统的出现频率很高,且被证实与持留菌的形成相关。鲍曼不动杆菌作为一种条件致病菌,II 型 TA 系统存在较为广泛;我们从 721 株鲍曼不动杆菌基因组中发现了 15 个可能的 II 型 TA 系统;85 % 单个鲍曼不动杆菌基因组中 TA 系统的数目在 3-6 种之间,且没有任何菌株不含 TA 系统。有研究表明结核分枝杆菌作为一种导致严重感染的致病菌,是目前已知的含有 TA 系统数目最多的细菌,共有 88 个不同的 TA 系统;而对生存条件要求严格的乳酸乳球菌基因组中则暂未发现任何 TA 系统^[30]。除持留菌的耐药表型之外,是否 TA 系统在致病菌感染(如形成持留菌导致潜伏感染)中扮演重要角色有待深入研究。

我们预测到的鲍曼不动杆菌的 15 个可能的 II 型 TA 系统中,RelB/RelE、HicA/HicB 及 HigB/HigA 等的同源基因在其它细菌同样存在且功能已被验证;剩余的 12 对可能的 TA 系统的功能活性有待进一步验证。值得关注的是 HTH/GNAT、GP49/Cro (HigB/HigA)及 DUF497/COG3514 这 3 个 II 型 TA 系统在持留菌中的表达水平显著高于非持留菌,说明了它们在鲍曼不动杆菌持留菌形成过程中的主导作用。其中,HTH/GNAT 型 TA 系统在 99 % 的已知鲍曼不动杆菌基因组均存在,该系统在临床多重耐药的鲍曼不动杆菌中的检出率同样是最高的。深入研究这一系统的功能将对今后筛选和设计相关药物从而抑制鲍曼不动杆菌持留菌形成提供重要依据。

参考文献

- [1] Goic-Barisic I, Tonkic M. The review of carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Acta Medica Croatica; Casopis Hrvatske Akademije Medicinskih Znanosti*, 2009, 63: 285-296.
- [2] Imperi F, Imperi F, Antunes LC, Blom J, Villa L, Iacono M, Visca P, Carattoli A. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2011, 63: 1068 -1074.
- [3] Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, MacDonald IJ, Martin KM,

- Russo T, Campagnari AA, Hujer AM, Bonomo RA, Gill SR. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190: 8053-8064.
- [4] Helaine S, Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends in Microbiology*, 2014, 22: 417-424.
- [5] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2004, 230: 13-18.
- [6] Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews. Microbiology*, 2007, 5: 48-56.
- [7] Willenborg J, Willms D, Bertram R, Goethe R, Valentin-Weigand P. Characterization of multi-drug tolerant persister cells in *Streptococcus suis*. *British Medical Council Microbiology*, 2014, 14: 120.
- [8] Dhar N, McKinney JD. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10: 30-38.
- [9] 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: 6191-6199.
- [10] Maisonneuve E, Shakespeare LJ, Jorgensen MG, Gerdes K. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 13206-13211.
- [11] Levin BR, Rozen DE. Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 2006, 4: 556-562.
- [12] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107: 12541-12546.
- [13] Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 2004, 305: 1622-1625.
- [14] Gerdes K, Maisonneuve E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annual Review of Microbiology*, 2012, 66: 103-123.
- [15] Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2012, 211: 121-133.
- [16] Starosta AL, Lassak J, Jung K, Wilson DN. The bacterial translation stress response. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 2014, doi: 10.1111/1574-6976.12083.
- [17] Brantl S. Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biology*, 2012, 9: 1488-1490.
- [18] Leplae R, Geeraerts D, Hallez R, Guglielmini J, Dreze 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: 5513-5525.
- [19] Syed MA, Levesque CM. Chromosomal bacterial type II toxin-antitoxin systems. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58: 553-562.
- [20] Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 8172-8180.
- [21] Kim Y, Wood TK. Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 391: 209-213.
- [22] Vazquez-Laslop N, Lee H, Neyfakh AA. Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 3494-3497.
- [23] Zhu Y, Yi Y, Liu F, Lv N, Yang X, Li J, Hu Y, Zhu B. Distribution and molecular profiling of class 1 integrons in MDR *Acinetobacter baumannii* isolates and whole genome-based analysis of antibiotic resistance mechanisms in a representative strain. *Microbiological Research*, 2014, 2: 811-816.
- [24] Hazan R, Maura D, Que YA, Rahme LG. Assessing *Pseudomonas aeruginosa* Persister/antibiotic tolerant cells. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1149: 699-707.
- [25] Sevin EW, Barloy-Hubler F. RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes. *Genome Biology*, 2007, 8: R155.
- [26] Shao Y, Harrison EM, Bi D, Tai C, He X, Ou HY, Rajakumar K, Deng Z. TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: D606-611.
- [27] Itaya H, Oshita K, Arakawa K, Komita M. GEMBASSY: an EMBOSS associated software package

for comprehensive genome analyses. *Source Code for Biology and Medicine*, 2013, 8: 17.

[28] Keren I, Minami S, Rubin E, Lewis K. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *mBio*, 2011, 2: 100-111.

[29] Markuckas MA, Suzieda E. Identification and

characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriol*, 2013, 195(14): 3165.

[30] Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: 966-976.

Characteristics of persister cells and the diversity of type II toxin - antitoxin system in *Acinetobacter baumannii*

Yanan Ma^{1,2}, Yuying Zhu³, Weicheng Li⁴, Fei Liu², Na Lv², Jing Li², Baoli Zhu^{2*}, Yongfei Hu^{2*}

¹ College of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, Anhui Province, China

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong Province, China

⁴ College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100101, China

Abstract: [**Objective**] To study the biological features of the *Acinetobacter baumannii* persisters and the correlation between Type II toxin-antitoxin systems (TAs) and the persisters. [**Methods**] Different antibiotics were used to isolate the persisters; BLAST programs were adopted to analyze candidate TAs; PCR was used to detect the distribution of TAs. [**Results**] The number of persisters was different when treated by different antibiotics. For most antibiotics, the higher the concentration used, the lower the persister number was obtained. Persister numbers in exponential phase populations were lower than that in stationary phase. Polymyxin B and tobramycin could kill persisters. [**Conclusion**] The persistence level of *A. baumannii* is related to the growth state of the strains, the class and concentration of antibiotics.

Keywords: antibiotic resistance, persister cell, type II TA system, *Acinetobacter baumannii*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81401701, C010503), by the Beijing Natural Science Foundation (5152019) and by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2015CB554200)

* Corresponding author. Yongfei Hu, Tel/ Fax: +86-10-64807438, E-mail: huyl@im.ac.cn; Baoli Zhu, Tel/ Fax: +86-10-64807362, E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

Received: 12 October 2014/Revised: 7 January 2015