DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2015.01.001

·专家论坛·

细菌 sRNA 与抗菌药物的药理作用及耐药性

张　旺,李元建*
(中南大学药学院药理学系,湖南 长沙 410078)

专家简介: 李元建,男,药理学教授,博士生导师。享受政府特殊津贴,卫生部有突出贡献的中青年专家。兼任湖南省心血管研究重点实验室主任。《国际病理科学与临床杂志》主编,《中国药理学与毒理学杂志》、《中国动脉硬化杂志》、《中南大学学报—医学版》等杂志编委。主编与参编教材或专著 11 部。先后获卫生部青年科研基金、美国心脏学会博士后资助、教育部优秀年轻教师基金及重点跟踪资助、教育部跨世纪优秀人才培养计划基金、教育部重大项目、国家自然科学基金面上与重点项目、973 项目子课题、湖南省自然科学基金、湖南省重点实验室基金等 20 余项基金。科研方向为心血管药理,主要研究内容为心血管新药研发及药物作用机制。先后获省部级科研成果 16 项。指导的研究生获全国博士论文奖 1 人,全国优秀博士论文提名奖 5 人。发表科研论文 260 余篇,其中被 SCI 收录论文 210 篇。

李元建 教授

关键词: sRNA; 抗菌作用; 耐药性
中图分类号:R966　　**文献标识码:**A

非编码微小 RNA 即 microRNA 在细胞生长、增殖、分化、凋亡等生命过程中起重要的调控作用,几乎参与所有疾病的病理生理过程,为近年研究的热点课题。原核细胞也存在非编码 RNA,称为小 RNA(small non-coding RNA,sRNA)。sRNA 作为一种应答元件,通过与靶 mRNA 碱基互补配对抑制靶基因 mRNA 翻译或(和)降解 mRNA,在转录后水平调控细菌多种功能,影响细菌生长与繁殖[1,2]。虽然 sRNA的发现(1967 年)早于 microRNA(1993 年),但其功能研究却晚于后者。新近研究发现,细菌sRNA 与抗菌药物的作用和耐药性密切相关。

1　sRNA 的生物学特性

sRNA 是一类广泛存在于原核生物,长度为50 ~ 300 nt 的核苷酸。自 1967 年从大肠杆菌(Escherichia coli,E. coli)中分离出第一个sRNA(6SRNA)以来[3],经过半个世纪的研究,该细菌中已发现约 100 种 sRNA[4],随后的研究证明其他细菌如沙门氏菌(salmonella)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus,S. aureus)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa,P. aeruginosa)、单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes,L. monocytogenes)、幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori,H. pylori)等同样存在 sRNA[5-11]。

细菌 sRNA 的编码区主要位于基因间区(intergenic region,IGR),某些位于编码基因 5′和 3′非翻译区(untranslated regions,UTR)[12]。根据 sRNA 的调节作用不同可将 sRNA 分为 4 类:调节蛋白活性 sRNA,顺式非编码 sRNA(cis-encoded sRNA),反式非编码 sRNA(trans-coded sRNA)和规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPRs)[8,13,14]。目前研究较多的为顺式非编码 sRNA 和反式非编码 sRNA,其中顺式非编码 sRNA 由靶 mRNA 的反义链编码,存在一段序列与靶 mRNA 完全互补配对(配对碱基通常大于 75 nt),具有高特异性、高亲和力的特点,而反式非编码 sRNA 其编码基因与靶 mRNA 相距较远[10,13,14]。原核生物中的 sRNA 作用方式类似于真核生物 microRNA,通过不完全互补配对降解 mRNA 或(和)抑制 mRNA 的翻译[10,13,14],从而参与调节细菌的生长、繁殖。然而,细菌 sRNA 的结构、功能及作用机制与真核生物 miRNA 不完全相同(表 1)。

收稿日期:2014 - 08 - 26;**修回日期:**2014 - 09 - 20
基金项目:国家自然科学基金(81273513).
* **通讯作者,**E-mail:yuan_jianli@yahoo.com.

表 1 真核生物 miRNA 与细菌 sRNA 的比较

	真核生物 microRNA	细菌 sRNA	参考文献
长度	19 ~ 25 nt	50 ~ 500 nt	
来源	多以茎环结构存在于较长的 RNA 转录产物中,经胞液中 Dicer 核酸酶剪切	转录始于一段能折叠成稳定茎环结构的序列,终止于不依赖 Rho 的转录终止子	15 ~ 18
结构	前体茎环剪切加工而来	具有稳定的茎环结构,不需要加工	16,17,19
分类	顺式非编码 RNA,反式非编码 RNA	多为反式非编码 RNA,少数为顺式非编码 RNA	13,14
作用机制	形成核糖核蛋白体与靶 mRNA 配对,抑制 mRNA 的翻译,促进降解	Hfq 协助下与靶 mRNA 配对,抑制 mRNA 的翻译,促进降解	13 ~ 16,19,20
生物学功能	真核生物转录后基因调控,在细胞自身及细胞间发挥调节作用,几乎参与所有病理生理过程	原核生物转录后基因调控,调节细菌多种生理过程及应激反应	14,21 ~ 24

研究发现,细菌 sRNA 的主要生物学功能之一是感应外界环境刺激,通过调控细胞代谢及应激反应以适应环境变化。例如,鲍曼不动杆菌(Acinetobacterbaumannii, A. baumannii)对温度和渗透压刺激的反应可能受 AbsR25 调节[25],而大肠杆菌对低温(低于 25℃)刺激的反应则通过反式非编码的 sRNA DsrA 所调节[26];在 ryhB 基因敲除的伤寒沙门菌(Salmonella Typhimurium, S. Typhimurium), H_2O_2 诱导的氧化应激显著增强,并证明 OxyR 能直接与 ryhB相互作用,从而调节 ryhB 的表达[27]。有趣的是,sRNA 还能参与抗菌药物的作用,并与细菌的耐药性密切相关,如阿奇霉素(2 μg/mL)能直接和间接抑制铜绿假单胞菌 rsmY/Z 的表达,阻断细菌的群体感应及生物被膜的形成[28];鲍曼不动杆菌 AbsR25 能调节药物外流蛋白编码基因的表达[25]。

2 sRNA 介导抗菌药物的杀菌作用

抗菌药物可特异性地干扰细菌的生长代谢过程(包括阻断 DNA 复制和 RNA 合成,抑制蛋白合成与代谢酶活性),破坏其结构与功能,产生杀菌或抑菌效应。基于 sRNA 对细菌生长与繁殖起重要的调控作用,人们推测 sRNA 可能是寻找抗菌药物的新靶点。研究发现,洋葱伯克霍尔德杆菌(Burkholderia cenocepacia, B. cenocepacia) sRNA mtvR 过表达能显著降低阿米卡星和庆大霉素的最小抑菌浓度(分别降低了 7 倍和 4 倍)以及显著提高 β-内酰胺类抗生素(头孢他啶和亚胺培南)的敏感性(分别提高了 3 倍和 4 倍)[29]。大肠杆菌 sRNA ryhB 能促进 CirA 表达,后者与其配体大肠菌素 Ia 结合诱导靶细胞死亡;研究发现,ryhB 及 cirA 缺失突变菌株,大肠菌素 Ia 处理诱导细菌死亡的作用被取消[30]。在金黄色葡萄球菌,sRNA SprX 过表达显著提高金黄色葡萄球菌对糖肽类抗生素的敏感性,其机制是通过 L3 环调节第 V 阶段产孢蛋白 G(stage V sporulation protein G, SpoVG)而发挥作用[31]。阿奇霉素(2 μg/mL)能直接和间接抑制铜绿假单胞菌 rsmY/Z 的表达,阻断细菌的群体感应及生物被膜的形成,可能是该药的杀菌机制之一[29]。上述研究表明,某些抗菌药物通过影响细菌 sRNA 的表达而调控相关基因的表达,从而提高细菌对药物的敏感性,发挥抗菌作用。sRNA 介导抗菌药物的作用加深了对某些药物作用机制的认识,并为寻找抗菌药物提供新思路。例如,主要影响蛋白质合成的阿奇霉素也能下调 sRNA(RsmY/Z)的表达而损伤细胞膜的功能[29]。已知多种杀菌药物(氨苄西林,卡那霉素,诺氟沙星及万古霉素)杀菌机制涉及氧化应激反应[32],但其确切机制尚未明了。鼠伤寒沙门菌(Salmonella enterica sv. Typhimurium) sRNA ryhB-1 和 ryhB-2 缺失可导致细菌内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)水平增加[27]。治疗伤寒的氨苄西林等药物诱导氧化应激是否通过影响 sRNA 表达而发挥作用有待研究。抗菌药物依据作用机制不同分为干扰细菌细胞壁的合成,改变细胞膜通透性,抑制蛋白合成,影响核酸及叶酸代谢 5 大类,sRNA 是否独立于上述抗菌药物的作用机制,以及与这些抗菌机制的关系值得研究。

许多抗菌药物如抗生素为细菌的二级代谢产物,约 2/3 的天然抗生素从天蓝色链霉菌(Streptomyces coelicolor, S. coelicolor)中获得。另一方面,某些细菌的二级代谢产物能杀灭与其寄生于同一宿主的其他细菌,例如荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens, P. fluorescens)能分泌氰化氢、AprA 外切蛋白酶和 2,4-二乙酰基间苯三酚,这些二级代谢产物能杀灭寄生于同一植物根际的真菌。sRNA 能调控二级代谢产物的表达,可能是寻找抗菌药物的新途径。例如,在天蓝色链霉菌过表达 sRNA scr239 和 cnc2189.1 可显著减

少二级代谢抗生素放线紫红素的生成,而敲除菌株中生成则增加[33]。三羧酸循环的中间产物能有效调节荧光假单胞菌 GacS-GacA 二元信号系统依赖的 sRNA(RsmX、RsmY 和 RsmZ),进而调节二级代谢产物的生成和抗菌活性[34]。

3 sRNA 与细菌耐药性

无论是真核细胞还是原核细胞,对外界刺激产生适应性变化是其固有特性,而 sRNA 在调节细菌适应性中起重要作用。细菌耐药性是细菌对抗菌药物的自然反应,长时间高浓度接触抗菌药物,细菌可通过改变自身结构或状态(改变药物作用靶位结构,影响生物被膜通透性及提高药物转运蛋白活性)产生获得性耐药。sRNA 作为细菌广泛存在的调节元件,调节细菌对抗生素的适应性而介导细菌耐药。Jing Y,等[6]首次报道了抗菌药物对细菌sRNA表达的影响,基因芯片结果显示,利奈唑胺等四种药物处理多重耐药金黄色葡萄球菌(Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus,MRSA)后,39 个sRNA表达变化显著。其他学者也证明多种抗菌药物的耐药性与 sRNA 表达变化有关,如替加环素处理诱导伤寒沙门菌 sRNA 表达,其中 sYJ20 可能参与伤寒沙门菌对替加环素的耐药[5];生物信息学预测,鲍曼不动杆菌 sRNA AbsR25 的靶基因中有 3 个与药物转运相关[25]。在大肠杆菌中,sRNA ralR 及其靶基因 ralA 双缺失突变菌株对磷霉素的敏感性显著高于野生型菌株[35];两性霉素 B 的耐药涉及 PhoP/PhoQ 二元信号系统,后者通过 sRNA mgrR 负性调节耐药相关基因 eptB[36];氨苄西林诱导 sRNA sdsR 的表达,后者与 DNA 错配修复基因 mutS 碱基互补配对而抑制细菌的错配修复,从而导致大肠杆菌耐药[37]。然而,sRNA 调控某些细菌耐药的确切机制尚未完全阐明,且与已知的耐药机制之间的关系也尚待研究。

4 结　　语

新近研究表明细菌 sRNA 不但在细菌的生长、繁殖等生物学过程中发挥重要作用,也介导了抗菌药物的杀菌作用,这为进一步研究抗菌药物的作用机制及寻找抗菌新药提供了思路。另一方面,sRNA 在细菌对外界适应性变化中起重要调节作用,为阐明细菌耐药性提供了新的解释。然而,有关 sRNA 介导抗菌药物的作用及耐药性的研究目前仍处于起步阶段,还有许多问题有待深入探讨:① sRNA 介导抗菌药物的作用及细菌耐药机制尚未完全阐明,包括 sRNA 的种类及其上、下游的调控机制;② sRNA 的生物学效应依赖于分子伴侣 Hfq,sRNA 与 Hfq 相互作用的认识还有存在争议,Hfq 能促进 sRNA 与靶 mRNA 的结合并形成稳定 sRNA-mRNA 复合物,另有学者认为,Hfq 能与 sRNA 竞争结合靶 mRNA 而抑制靶 mRNA 的表达和翻译[30],阐明两者相互作用有助于认识 sRNA 的作用机制;③已知真核细胞能主动分泌 miRNA,发挥临近细胞与远程调节作用[22]。细菌也能分泌 sRNA[38,39],但分泌型 sRNA 的生物学意义尚不清楚。随着研究的深入,对sRNA 的生物学及药理学的认识必将获得更大进步。

参考文献:

[1] Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers[J]. Mol Cell, 2011,43(6):880-891.

[2] De Lay N, Schu DJ, Gottesman S. Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices[J]. J Biol Chem, 2013,288(12):7996-8003.

[3] Wassarman KM. 6S RNA: a small RNA regulator of transcription[J]. Curr Opin Microbiol, 2007,10(2):164-168.

[4] Lalaouna D, Simoneau-Roy M, Lafontaine D, et al. Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2013,1829(6-7):742-747.

[5] Papenfort K, Vogel J. Regulatory RNA in bacterial pathogens[J]. Cell Host Microbe, 2010,8(1):116-127.

[6] Yu J, Schneiders T. Tigecycline challenge triggers sRNA production in Salmonella enterica serovar Typhimurium [J]. BMC Microbiol, 2012,12(1):195-208.

[7] Howden BP, Beaume M, Harrison PF, et al. Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant staphylococcus aureus after antimicrobial exposure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013,57(8):3864-3874.

[8] Sonnleitner E, Romeo A, Bläsi U. Small regulatory RNAs in Pseudomonas aeruginosa[J]. RNA Biol, 2012,9(4):364-371.

[9] Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, et al. The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori[J]. Nature, 2010,464(7286):250-255.

[10] Wen Y, Feng J, Sachs G. Helicobacter pylori 5′ureB-sRNA, a cis-encoded antisense small RNA, negatively regulates ureAB expression by transcription termination[J]. J Bacteriol, 2013,195(3):444-452.

[11] Pernitzsch SR, Tirier SM, Beier D, et al. A variable homopoly-

meric G-repeat defines small RNA-mediated posttranscriptional regulation of a chemotaxis receptor in Helicobacter pylori[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(4): 501-510.

[12] Kawano M, Reynolds AA, Miranda-Rios J, et al. Detection of 5′-and 3′-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in Escherichia coli[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(3): 1040-1050.

[13] Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in Bacteria[J]. Cell, 2009, 136(4): 615-628.

[14] Michaux C, Verneuil N, Hartke A, et al. Physiological roles of small RNA molecules[J]. Microbiology, 2014, 160(Pt6): 1007-1019.

[15] Bartel DP. MicroRNAs: eenomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[16] 张炜,童贻刚,冯福民. 细菌非编码小 RNA 研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1025-1030.

[17] 生秀梅,徐顺高,张海方,等. 细菌小 RNA 的研究[J]. 生命的化学, 2010, 30(6): 815-820.

[18] Ishiguro H, Kimura M, Takeyama H. Role of microRNAs in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(19): 5694-5699.

[19] Olson EN. MicroRNAs as Therapeutic Targets and Biomarkers of Cardiovascular Disease[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(239): 239ps3.

[20] Brantl S, Brückner R. Small regulatory RNAs from low-GC Gram-positive bacteria[J]. RNA Biol, 2014, 11(5): 443-456.

[21] Chivukula RR, Shi G, Acharya A, et al. An Essential Mesenchymal Function for miR-143/145 in Intestinal Epithelial Regeneration[J]. Cell, 2014, 157(5): 1104-1116.

[22] Liang H, Zen K, Zhang J, et al. New roles for microRNAs in cross-species communication[J]. RNA Biol, 2013, 10(3): 367-370.

[23] 战嵛华,马尧,邓志平,等. 非编码 RNAs 在细菌代谢网络调控中的研究进展[J]. 生物技术进展, 2012, 1(6): 413-420.

[24] Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, et al. A dynamic and intricate regulatory network determines Pseudomonas aeruginosa virulence[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(1): 1-20.

[25] Sharma R, Arya S, Patil SD, et al. Identification of novel regulatory small RNAs in acinetobacter baumannii[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93833.

[26] Hämmerle H, Včerek B, Resch A, et al. Duplex formation between the sRNA DsrA and rpoS mRNA is not sufficient for efficient RpoS synthesis at low temperature[J]. RNA Biol, 2013, 10(12): 1834-1841.

[27] Calderón IL, Morales EH, Collao B, et al. Role of salmonella typhimurium small RNAs RyhB-1 and RyhB-2 in the oxidative stress response[J]. Res Microbiol, 2014, 165(1): 30-40.

[28] Pérez-Martínez I, Haas D. Azithromycin inhibits expression of the GacA-Dependent small RNAs RsmY and RsmZ in pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(7): 3399-3405.

[29] Ramos CG, Grilo AM, da Costa PJ, et al. MtvR Is a Global small noncoding regulatory RNA in burkholderia cenocepacia[J]. J Bacteriol, 2013, 195(16): 3514-3523.

[30] Salvail H, Caron MP, Bélanger J, et al. Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin[J]. EMBO J, 2013, 32(20): 2764-2778.

[31] Eyraud A, Tattevin P, Chabelskaya S, et al. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in Staphylococcus aureus[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(8): 4892-4905.

[32] Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics[J]. Cell, 2007, 130(5): 797-810.

[33] Vockenhuber MP, Suess B. Streptomyces coelicolor sRNA scr5239 inhibits agarase expression by direct base pairing to the dagA coding region[J]. Microbiology, 2012, 158(Pt2): 424-435.

[34] Takeuchi K, Kiefer P, Reimmann C, et al. Small RNA-dependent expression of secondary metabolism Is controlled by krebs cycle function in pseudomonas fluorescens[J]. J Biol Chem, 2009, 284(50): 34976-34985.

[35] Guo Y, Quiroga C, Chen Q, et al. RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin - antitoxin system in Escherichia coli[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(10): 6448-6462.

[36] Moon K, Gottesman S. A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of Escherichia coli to antimicrobial peptides[J]. Mol Microbiol, 2009, 74(6): 1314-1330.

[37] Gutierrez A, Laureti L, Crussard S, et al. β-lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1610-1618.

[38] Ando T, Suzuki H, Nishimura S, et al. Characterization of extracellular RNAs produced by the marine photosynthetic bacterium rhodovulum sulfidophilum[J]. J Biochem, 2006, 139(4): 805-811.

[39] 唐立,凌宗欣,文姝. 乳杆菌对数生长期培养基滤液核酸组分分析[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(2): 104-106.

(此文编辑:秦旭平)