

肉桂醛诱导酿酒酵母 *Persisters* 细胞的形成

沈青山, 周威, 王淼焱, 莫海珍, 胡梁斌

(河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003)

摘要: 本文研究了肉桂醛对酿酒酵母 *persisters* 细胞形成的影响。通过 96 孔板微量法测定肉桂醛对酿酒酵母生长的最小抑制浓度 (MIC) 为 0.4 mM; 采用流式细胞仪以及梯度稀释滴平板计数法研究了肉桂醛处理后酿酒酵母 *persisters* 细胞的形成情况。结果表明, 肉桂醛可以抑制酿酒酵母生长, 且能够诱导酿酒酵母细胞形成 *persisters* 状态, 该状态下的细胞对两性霉素 B 产生耐药性。进一步研究发现肉桂醛处理后可以使酿酒酵母细胞停滞在细胞周期的任何阶段, 而雷帕霉素诱导的细胞自噬只能停留在 G1 期, 所以酿酒酵母 *persisters* 与自噬状态存在区别。目前, 对于 *Persisters* 的研究集中在原核微生物, 对真核生物 *persisters* 的研究非常有限。由于 *persisters* 群体通常占总群体极小一部分, 这就给基因水平上研究 *persisters* 的形成机制带来很大的挑战。本研究发现肉桂醛处理酿酒酵母细胞后, 可以促使其大部分细胞形成 *persisters*。这就为从基因水平上认识真核生物 *persisters* 的形成机制提供了方法, 实验结果表明 *YGL* 基因也与酿酒酵母 *persisters* 的形成有很大关系。

关键词: 肉桂醛; 酿酒酵母; *persisters*; 诱导

文章篇号: 1673-9078(2016)07-53-59

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.009

Persisters Formation in *Saccharomyces cerevisiae* Induced by Cinnamaldehyde

SHEN Qing-shan, ZHOU Wei, WANG Miao-yan, MO Hai-zhen, HU Liang-bin

(Department of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The effects of cinnamaldehyde (CA) on *persisters* formation in *Saccharomyces cerevisiae* were investigated in this study. CA was found to effectively inhibit the growth of *S. cerevisiae* in a 96-well plate with a minimum inhibitory concentration value of 0.4 mM. The formation of *persisters* cells in *S. cerevisiae* cells after exposure to cinnamaldehyde was further explored by flow cytometry and serial dilution-drop plate counting methods. The results showed that CA inhibited the growth of *S. cerevisiae* cells, and *S. cerevisiae* cells were induced to form the *persisters* state showing amphotericin B resistance. Further studies showed that CA treatment led to growth arrest of *S. cerevisiae* cells at any stage in the cell cycle, whereas cells undergoing autophagy induced by rapamycin stopped during the G1 phase. Therefore, *persisters* in *S. cerevisiae* differed from cells in autophagy. Previous studies of *persisters* mainly focused on prokaryotic pathogens rather than eukaryotic cells. Additionally, the natural *persisters* population accounted for an extremely small proportion of the overall population, creating challenges in studies of the genetic mechanisms underlying their formation. The findings of this study showed that CA treatment induced *persisters* formation in most *S. cerevisiae* cells, providing a method for understanding the genetic mechanism underlying *persisters* formation in eukaryotes. Results also confirmed that the *YGL* gene was significantly associated with *persisters* formation in *S. cerevisiae*.

Key words: cinnamaldehyde; *Saccharomyces cerevisiae*; *persisters*; induction

肉桂醛 (cinnamaldehyde, CA) 是肉桂中具有生物活性作用的主要成分之一, 结构式如图 1 所示。目前, 肉桂醛在微生物污染控制及医药、食品领域都有广泛

收稿日期: 2015-08-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101231); 2012 年度河南省科技攻关项目 (122102310308); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-12-0694)

作者简介: 沈青山 (1989-), 男, 研究生, 研究方向病原微生物代谢与污染控制

通讯作者: 胡梁斌 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食源性病原物控制

的应用。在微生物污染控制方面, 肉桂醛作为一种挥发性植物精油不仅能够抑制多种病原细菌例如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、猪丹毒杆菌、肺炎链球菌的生长, 而且对假丝酵母、辣椒疫霉、黄曲霉菌等各种病原真菌也具有很强的抑制作用^[1-3]。在医药领域, 肉桂醛是重要的医药原料之一, 肉桂醛常用于外用药物以及合成药物中, 具有促进血液循环, 紧实皮肤组织的作用; 对皮肤的疤痕、纤维瘤的软化与清除具有一定的功效; 并且能有效抗溃疡, 促进胃肠蠕动; 还可抑制肿瘤的发生^[4]; 对于血管的扩张及降低

血压有特效,尤其是对肾上腺皮质性高血压的降压效果显著^[5-6]。在食品行业,目前来讲肉桂醛作为一种安全的食源性抗菌剂和食品添加剂已广泛应用于食品的防腐保鲜^[7]。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),又称面包酵母或出芽酵母。酿酒酵母是与人类关系最广泛的一种酵母,传统上它用于制作面包和馒头等食品及酿酒,在现代分子和细胞生物学中用作真核模式生物,其作用相当于原核的模式生物大肠杆菌。在食品和发酵工业中具有重要的研究价值。早在1944年,Joseph Bigger就发现金黄色葡萄球菌即使在很高浓度的氨基青霉素的作用下仍然有极少数能够存活下来,生存比例为1:10⁶~1:10⁴⁸⁻⁹。这一极少部分存活下来的细胞虽然对氨基青霉素具有抗性,但是这种抗性并不具有遗传性;当移除抗生素后这部分细胞就会重新恢复生长并且恢复其对抗生素的敏感性^[10],这种对抗生素具有暂时的抗性细胞被称作 persister。很多病原性细菌微生物如大肠杆菌、结核杆菌、铜绿假单胞菌以及真菌中的白色念珠菌等都可以形成 persister^[11]。目前,该领域中普遍学者对于 persister 形成的认识存在两大观点:诱导机制,环境条件胁迫诱导细胞处于一种非生长状态而形成 persister^[12-13],有研究报告吡啶可以诱导大肠杆菌形成 persister^[14];随机产生, persister 本身可以随机存在于大量的群体之中^[9]。大多数学者都以细菌等原核微生物为研究载体,虽然有报道称白色念珠菌(*Candida species*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)可以形成生物膜和 persister 细胞^[15-16]以及最近发现利用酪氨酸激酶抑制剂治疗人体肿瘤细胞时肿瘤细胞产生耐药性细胞^[17],但是与原核微生物相比对这些真核微生物 persister 的研究相对较少。Persister 细胞仅存在于大量群体中小部分,很难在基因水平上进行深层次的研究。本文以真核生物酿酒酵母为目标菌株,发现肉桂醛诱导其 persister 的形成。研究表明肉桂醛处理酿酒酵母后,可以导致大部分细胞成为 persister,这就为从基因水平上认识真核生物 persister 的形成机制提供了方法。

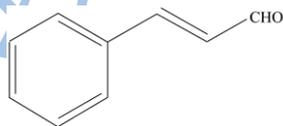


图1 肉桂醛的结构式

Fig.1 Chemical structure of cinnamaldehyde

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株:野生型酿酒酵母(*S. cerevisiae*) By4741,酿酒酵母突变体:YGL167c(PMR1 突变体,PMR1负责将钙离子从细胞质运到内质网),YOR087w(YVC1 突变体,YVC1负责将钙离子从线粒体运到细胞质),M4374(PMC1 突变体,PMC1负责将钙离子从细胞质运到线粒体)均购自于Invitrogen公司。

试剂:肉桂醛(CA,99%)购于Aldrich(St. Louis, MO, 美国),二甲基亚砜(DMSO),两性霉素B(AB),碘化丙啶(PI)荧光染料,阿尔马蓝,雷帕霉素,酵母提取物,蛋白胨,葡萄糖,平板计数琼脂。以上试剂及试验中所用到的其他试剂均为化学纯。

1.2 仪器与设备

流式细胞仪(BD FACSCalibur, 美国BD公司),多功能酶标仪(Varioskan Flash, Thermo公司),荧光显微镜(ECLIPSE, TE2000-S, Nikon),UV-7200可见分光光度计(龙尼可,上海),智能恒温培养箱(SHP-160,上海),智能恒温摇床(HZQ-F160,太仓),磁力搅拌器。

1.3 实验方法

1.3.1 肉桂醛和 YPD 培养基的配置以及菌株的活化培养

肉桂醛:由于肉桂醛不溶于水,因此采用DMSO为溶剂,吸取一定量的肉桂醛于DMSO中,配置合适的浓度于4℃条件下避光保存备用。

YPD培养基:称取酵母提取物10.0g,蛋白胨20.0g,葡萄糖20.0g,琼脂15.0g,加水至1000mL于磁力搅拌器上充分溶解,自然pH值,分装三角瓶于121℃高压灭菌20min。(注:YPD液体培养基不需要加平板计数琼脂)

菌株活化培养:将挑取原始菌株单克隆于YPD液体培养基中30℃,150r/min振荡培养24h,涂板获得单克隆备用。

1.3.2 肉桂醛对酿酒酵母生长的影响

MIC值:挑取已活化的野生型酿酒酵母单克隆于液体YPD培养基中在30℃,150r/min振荡培养至OD₆₀₀=2.0,用液体YPD培养基稀释至OD₆₀₀=0.01,于96孔板中,每孔加入菌液200μL,用肉桂醛处理,终浓度分别为0、0.2、0.4、0.6、0.8mM,每个处理做三个平行,观察肉桂醛对野生型酿酒酵母生长的抑菌效果从而得到最小抑制浓度MIC值。

细胞活力检测:96孔板中酿酒酵母细胞用不同浓度的肉桂醛处理同时加入阿尔马蓝染色,染色浓度为10%(V/V),用多功能酶标仪于激发光波长535nm,

发射光波长 615 nm 条件下检测各个处理的荧光强度。

稀释滴板：待稀释滴板的处理样经 5000 r/min 离心 5 min 除去药剂，用生理盐水重悬菌体，梯度稀释，每个稀释度下吸取 10 μ l 滴在 YPD 固体培养基上于恒温培养箱中 30 $^{\circ}$ C 静置避光培养 24 h，计数统计菌落生长情况。

1.3.3 流式细胞仪及荧光检测前处理

检测前处理：将处理好的酿酒酵母样品 5000 r/min 离心 5 min 除去药剂处理，用生理盐水重悬，PI 工作浓度为 1 μ g/mL 避光静置染色处理 30 min，同样离心条件下除去多余的 PI，生理盐水重悬使酵母细胞均匀分散，300 目尼龙滤网过滤，用于流式细胞仪及荧光显微镜的检测。

1.3.4 酿酒酵母 persister 细胞检测

挑取已活化的野生型酿酒酵母和各个突变体酵母单克隆 30 $^{\circ}$ C，150 r/min 条件下振荡培养至 OD₆₀₀=2.0，取 1 mL 菌液于 2 mL 的离心管中用 0.6 mM 肉桂醛处理 3 h，处理做三个平行，再用 100 μ g/mL 的两性霉素 B 处理 24 h，梯度稀释滴板，30 $^{\circ}$ C 静置避光培养 24 h，计数统计菌落生长情况。

1.3.5 肉桂醛处理后酿酒酵母的细胞周期分析

挑取已活化的野生型酿酒酵母和各个突变体酿酒酵母单克隆 30 $^{\circ}$ C，150 r/min 条件下振荡培养至 OD₆₀₀=2.0，取 1 mL 菌液于 2 mL 的离心管中分别用 0.8 mM 肉桂醛和 1 μ g/mL 雷帕霉素 (Rapa) 处理 0, 3, 6, 9 h，离心除去药剂，加入预冷 70% 乙醇，于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。离心收集细胞，以 1 mL 的 PBS 洗细胞一次，加入 500 μ l PBS 含 50 μ g/mL PI, 100 μ g/mL RNase A, 0.2% Triton X-100, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min，用流式细胞仪检测肉桂醛和雷帕霉素处理后细胞所处的细胞周期状态。

1.4 数据分析

所有数据运用 SPSS 12.0 数据处理系统，采用 Duncan's 新复极差法进行显著性分析，且实验结果为 3 次平行试验数据的平均值 \pm SD。

2 结果与分析

2.1 肉桂醛对酿酒酵母生长的抑制效果

酿酒酵母细胞经肉桂醛处理后其生长受到了抑制，随着处理浓度的增大这种抑制作用增强。当肉桂醛处理浓度达到 0.4 mM 时酿酒酵母生长受到了显著地抑制。因此，肉桂醛对酿酒酵母生长的最小抑制浓度 MIC 值为 0.4 mM (图 2.b)。经梯度稀释将 OD₆₀₀=1.0

酿酒酵母细胞菌液滴到含有不同浓度的肉桂醛平板上也可以看到其生长受到了显著地抑制作用 (图 2.a)。酿酒酵母细胞的生长虽然受到很大程度上的抑制但是肉桂醛并没有将其杀死，阿尔马蓝染色检测细胞活性，结果表示酿酒酵母细胞经肉桂醛处理后仍然保持一定的活力具有微弱的呼吸作用 (图 2.c)。

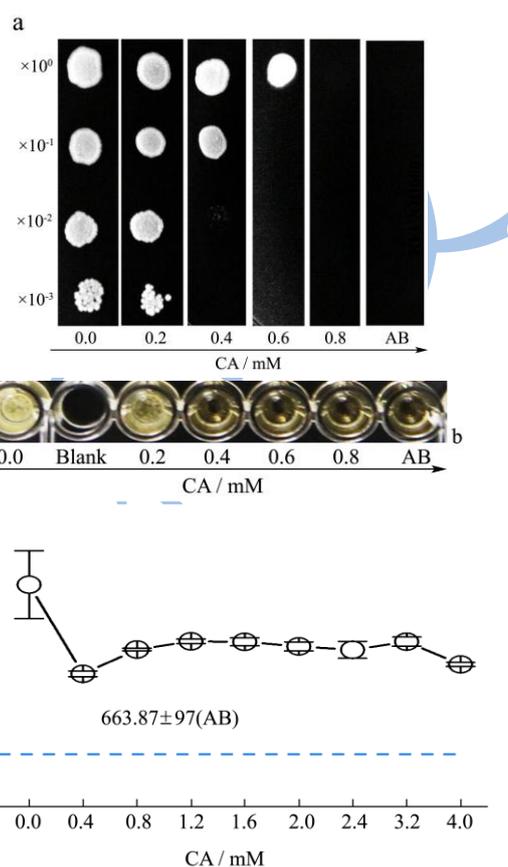


图 2 肉桂醛对酿酒酵母生长的抑制作用

Fig2 Inhibitory effects of CA on the growth of *S. cerevisiae*

注：a：在含有肉桂醛的平板上生长的酿酒酵母细胞受到抑制；b：96 孔板中酵母经肉桂醛处理后的生长状况；c：肉桂醛处理后通过阿尔马蓝染色检测的酵母细胞相对活力；AB (虚线) 为 100 μ g/mL 两性霉素 B 处理，作为阳性对照。

2.2 肉桂醛处理后酿酒酵母生长状态

PI 可以与双链核酸分子结合发出红色荧光，但是不能透过活细胞的细胞膜，因此经常被用来鉴定死亡细胞。本研究发现细胞经过 0.4 mM 和 0.6 mM 的肉桂醛处理后，酿酒酵母的生长虽然受到显著地的抑制作用，但是处理后的酿酒酵母没有发出强烈红色荧光 (图 3.b)，而阳性对照 100 μ g/mL 两性霉素 B 处理的细胞则发出强烈的红色荧光 (图 3.d)；通过流式细胞统计仪分析肉桂醛处理的细胞绝大多数都属于低荧光发射群体，与阴性对照相同 (图 3a、b、c)，说明肉桂醛并没有杀死酿酒酵母细胞。该结果与阿尔马蓝染色结

果吻合,即肉桂醛存在的条件下酿酒酵母处于一种非生长,并非死亡状态。

图; b: 各种处理的酿酒酵母细胞除去药剂后在平板上的恢复生长状况。其中+AB, -AB 分别表示酿酒酵母经 100 μg/mL 两性霉素 B 处理和未经其处理。

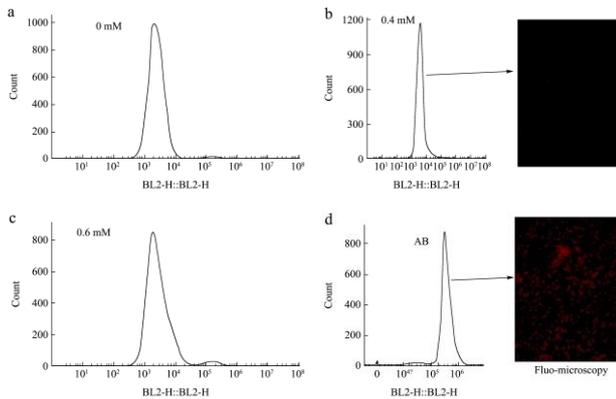


图 3 流式细胞仪统计的酵母细胞 PI 荧光强度分布

Fig 3 Distribution of fluorescence intensity in the *S. cerevisiae* cells after PI dyeing by flow cytometer

注: a,b,c,d:阴性对照; 0.4 mM 肉桂醛处理; 0.6 mM 肉桂醛处理; 100μg/mL 两性霉素 B 处理(阳性对照)。

2.3 肉桂醛诱导酿酒酵母产生 persister

2.4 酿酒酵母 persister 与自噬的区别

细胞自噬可以延缓细胞凋亡的发生促进细胞修复, Bayles 等^[18]提出真核细胞的自噬和原核生物的 persister 非常的类似。雷帕霉素作为一种常用的诱导剂可以诱导细胞处于自噬状态。如图 5 所示, 雷帕霉素处理后的酿酒酵母细胞会停滞在 G1 期, 而肉桂醛处理后酿酒酵母细胞可以停滞在细胞周期的任何一个时期。这些结果表明肉桂醛诱导真核生物酿酒酵母所形成的 persister 与细胞自噬明显不同。

2.5 肉桂醛诱导酿酒酵母不同突变体 persister

的产生

肉桂醛能够引起钙离子瞬间流动影响细胞生理状态^[19-20], 因此本研究以 By4741 野生型菌株为对照菌株, YOR0874w、YGL167c 以及 M4374 为突变菌株, 探究了 persister 的形成与钙离子的相关性。这些突变菌株均与钙离子运输相关, 其中 YGL167c 为 PMR1 突变体, PMR1 负责将钙离子从细胞质运到内质网; YOR087w 为 YVC1 突变体, YVC1 负责将钙离子从线粒体运到细胞质; M4374 为 PMC1 突变体, PMC1 负责将钙离子从细胞质运到线粒体。野生型和各种突变体经 0.6 mM 的肉桂醛相同处理后再用两性霉素 B 处理, 结果发现与野生型 By4741 相比 YOR 及 M4374 突变体依然可以正常形成 persister 而只有 YGL167 突变体不能形成 persister (图 6), 该菌株为 PMR1 突变菌株, 而 PMR1 主要负责把细胞质中的钙离子运输到内质网中, 其他两种突变菌株 YOR 和 M4374 中钙离子的运输虽然会受到影响但是却没有影响肉桂醛诱导酿酒酵母 persister 的形成。这就表明肉桂醛诱导酿酒酵母细胞 persister 的形成可能与内质网钙离子信号传递有关。

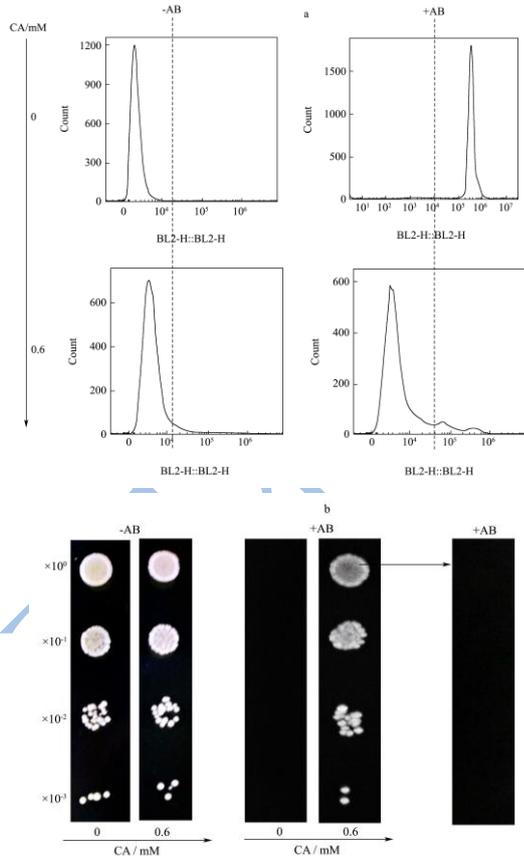


图 4 肉桂醛诱导酿酒酵母细胞形成能够抵抗两性霉素 B 的 persister

Fig.4 CA induced the persister formation in *S. cerevisiae* resistant to amphotericin B

注: a: 流式细胞仪统计酿酒酵母细胞的 PI 荧光强度分布

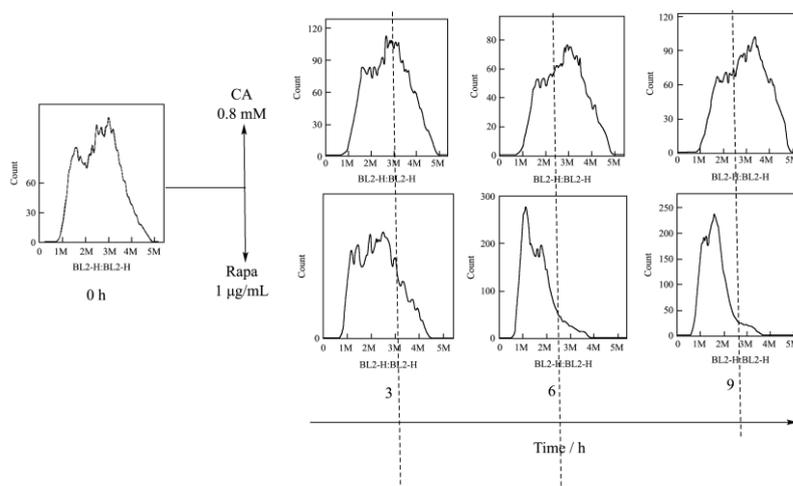


图5 肉桂醛和雷帕霉素处理后酿酒酵母细胞的周期分布

Fig.5 Cell cycle distribution of *S. cerevisiae* cells treated with CA or rapamycin

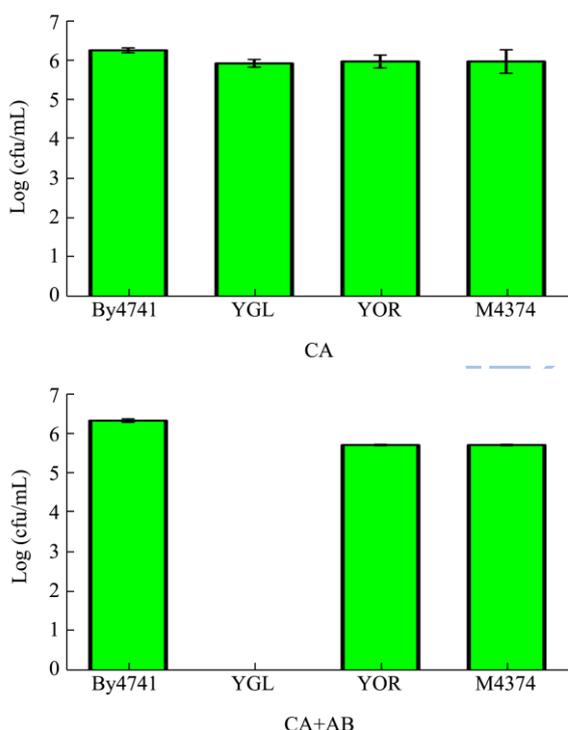


图6 肉桂醛诱导不同酿酒酵母突变体形成 persister

Fig.6 CA-induced persister formation by the mutation of different *S. cerevisiae* cells

3 讨论

多种途径都可以诱导细菌微生物形成 persister。例如, 饥饿、金属离子胁迫环境胁迫, 氧化胁迫, DNA 损伤等非致死条件都可以促使细菌微生物细胞的耐受性增强^[21-23], 研究发现 ppGpp (鸟苷四磷酸) 作为一种常见的胁迫应激反应的调控子, 它可以随机高水平地改变大肠杆菌存留细胞的形成^[24]。有报道指出 persister 的形成也可以受到基因的调控, 间歇性地用

高剂量抗生素处理细胞就可以分离出稳定的 hip 突变体^[25,26], 而 hip 基因的过表达可以通过 DNA 的复制翻译和转录的减弱来抑制细胞的生长并且增强细菌对抗生素的抗性^[27], 另外用药物处理同样可以诱导 persister 的形成, Vega 等^[14]发现呋喃处理大肠杆菌后就会诱导 persister 的形成。然而, 目前对于 persister 的研究大多是基于细菌等微生物, 对于真核生物 persister 研究相对较少。

肉桂醛作为一种植物精油具有一定的杀菌抑菌作用, 并且在食品医药行业都有广泛的应用。本文以酿酒酵母作为真核微生物 persister 形成的研究模型, 探索了药物在真核微生物中 persister 的诱导形成机制。肉桂醛处理浓度大于 0.4 mM 时, 就可以使酿酒酵母细胞的生长状态受到抑制。细胞自噬在真核生物中是一种很常见的细胞活动现象, 对于维持细胞微环境发挥着非常重要的作用^[28]。当细胞缺乏营养饥饿, 生长受到抑制以及低氧胁迫时就会发生自噬现象^[29], 细胞自噬与抗肿瘤的治疗、导致细胞程序性死亡也有很大关系^[30-33]。然而肉桂醛导致酿酒酵母细胞所形成的这种非生长状态与细胞自噬不同。雷帕霉素是一种有效的自噬诱导剂, 酿酒酵母细胞经过 1 µg/mL 的雷帕霉素处理后引起酿酒酵母细胞发生自噬使多数细胞都停滞在 G1 期, 而 0.8 mM 肉桂醛处理的酿酒酵母细胞与之不同 (如图 5)。因此, 进一步表明了肉桂醛的这种非生长状态是 persister 状态。已有研究表明大肠杆菌 persister 的形成会受到 hip 基因的调控^[25]。由于肉桂醛被报道能够影响钙离子信号传递, 本研究以 By4741 野生型酿酒酵母为对照菌株, 选用与钙离子代谢相关的 YGL167c、YOR087w、M4374 等缺陷型基因突变体为研究材料。分别用 0.6 mM 的肉桂醛处理

诱导这些突变体,发现 YGL167c 不能被肉桂醛诱导形成 persister。因为 PMR1 能够通过消耗 ATP 将钙离子运到内质网。所以推断肉桂醛诱导酿酒酵母 persister 的形成与内质网钙离子信号传递或者细胞的内质网附近 ATP 水平相关。由于肉桂醛能够将几乎所有的酿酒酵母细胞诱导形成 persister,这就为今后从基因水平上理解酿酒酵母乃至真核生物细胞 persister 形成的机制提供了方法。

4 结论

肉桂醛可以诱导酿酒酵母形成 persister。0.6 mM 的肉桂醛可以抑制酿酒酵母的生长使其处于一种特殊的非生长状态而躲避杀菌剂两性霉素 B 的致死作用;这种非生长状态即为 persister 细胞状态,该状态与细胞自噬不同;酿酒酵母 persister 的形成可能会受到与内质网钙离子相关基因 YGL 的调控。同时本研究为从基因水平上认识真核生物 persister 的形成机制提供了方法。

参考文献

- [1] Hu L B, Wang D D, Liu L, et al. Ca²⁺ efflux is involved in cinnamaldehyde-induced growth inhibition of *Phytophthora capsici* [J]. PloS One, 2013, 8(10)
- [2] Cheng S S, Liu J Y, Chang E H, et al. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 5145-5149
- [3] Li H, Shen Q, Zhou W, et al. Nanocapsular dispersion of cinnamaldehyde for enhanced inhibitory activity against aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [J]. Molecules, 2015, 20(4): 6022-6032
- [4] Zhou L, Lu Y, Yang G, et al. Research on tumorigenicity of cinnamaldehyde in melanoma cell lines and its mechanism [J]. Tumor Biology, 2014, 35(6): 5717-5722
- [5] Song F, Li H, Sun J, et al. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 150(1): 125-130
- [6] El-Bassossy H M, Fahmy A, Badawy D. Cinnamaldehyde protects from the hypertension associated with diabetes [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(11): 3007-3012
- [7] Balaguer M P, Lopez-Carballo G, Catala R, et al. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(3): 369-377
- [8] Bigger J W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization [J]. The Lancet, 1944, 244(6320): 497-500
- [9] Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters [J]. Cell, 2014, 157(3): 539-548
- [10] Keren I, Kaldalu N, Spoering A, et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 230(1): 13-18
- [11] Dhar N, McKinney J D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance [J]. Current Opinion in Microbiology, 2007, 10(1): 30-38
- [12] Bernier S P, Lebeaux D, DeFrancesco A S, et al. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin [J]. PLoS Genet, 2013, 9(1): e1003144
- [13] Amato S M, Orman M A, Brynildsen M P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli* [J]. Molecular cell, 2013, 50(4): 475-487
- [14] Vega N M, Allison K R, Khalil A S, et al. Signaling-mediated bacterial persister formation [J]. Nature Chemical Biology, 2012, 8(5): 431-433
- [15] Kucharová S, Tournu H, Lagrou K, et al. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin [J]. Journal of Medical Microbiology, 2011, 60(9): 1261-1269
- [16] Pettit R K, Repp K K, Hazen K C. Temperature affects the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents [J]. Medical Mycology, 2010, 48(2): 421-426
- [17] Sharma S V, Lee D Y, Li B, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations [J]. Cell, 2010, 141(1): 69-80
- [18] Bayles K W. Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox [J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(1): 63-69
- [19] Bautista D M, Jordt S E, Nikai T, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents [J]. Cell, 2006, 124(6): 1269-1282
- [20] Macpherson L J, Dubin A E, Evans M J, et al. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines [J]. Nature, 2007, 445(7127): 541-545
- [21] Leung V, Lévesque C M. 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
- [22] Mcker N, Dean C R, Tao J. *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
- [23] Wu Y, Vulić M, Keren I, et al. Role of oxidative stress in persister tolerance [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(9): 4922-4926
- [24] 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
- [25] Moyed H S, Bertrand K P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis [J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 155(2): 768-775
- [26] Wolfson J S, Hooper D C, McHugh G L, et al. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, 34(10): 1938-1943
- [27] Korch S B, Hill T M. Ectopic overexpression of wild-type and mutant *hipA* genes in *Escherichia coli*: effects on macromolecular synthesis and persister formation [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 3826-3836
- [28] Tanida I. Autophagy basics [J]. *Microbiology and immunology*, 2011, 55(1): 1-11
- [29] Rabinowitz J D, White E. Autophagy and metabolism [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1344-1348
- [30] Yang Z J, Chee C E, Huang S, et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2011, 10(9): 1533-1541
- [31] Li X, Lu Y, Pan T, et al. Roles of autophagy in cetuximab-mediated cancer therapy against EGFR [J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1066-1077
- [32] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2891-2906
- [33] Yang Y, Liang Z, Gao B, et al. Dynamic effects of autophagy on arsenic trioxide-induced death of human leukemia cell line HL60 cells [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2008, 29(1): 123-134