

•综述•

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2017.03.02

病原菌非编码 sRNA 的功能及研究新方法

李娜, 张智, 王岱*

(厦门大学公共卫生学院分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室 福建 厦门 361102)

摘要 细菌中的非编码小 RNA (small RNA, sRNA) 作为一种靶向调控分子在细胞生理代谢过程中具有重要作用。sRNA 作用于特定靶标, 调控基因的表达。大肠杆菌大约有 100 种 sRNA, 其中 1/3 sRNA 需要伴侣蛋白 Hfq 的介导。病原细菌中 sRNA 分子如何调控致病基因的表达, 目前研究仍处于初级阶段。本文将从生物膜形成、细菌耐药性以及对宿主的影响等方面, 结合新颖的 sRNA 的研究方法, 综述 sRNA 在调控代谢网络及控制病原菌致病性方面的作用。

关键词 非编码 sRNA; 生物膜形成; 细菌耐药性; 双 RNA-Seq; Ligation of interacting RNA followed by high-throughput sequencing

中图分类号 Q522; R378

Functions of Non-coding Small RNA in Pathogenic Bacteria and Its New Methodology

LI Na, ZHANG Zhi, WANG Dai*

(State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China)

Abstract The small non-coding RNA as a special targeting regulator plays a key role in cell metabolism process for bacteria. sRNAs interplay with specific targets to regulate gene expression. In *Escherichia coli*, there are about 100 sRNAs have been experimentally confirmed, in which approximately one-third interact with sRNA chaperone Hfq. For pathogenic bacteria, regulation of the expression of virulence genes mediated by sRNAs is still in its initial stage to date and it needs to study deeply and pertinently. Based on this, the article focus on the roles of sRNAs in biofilm formation, bacterial resistance, physiology and the effect on hosts, and is combined with novel methods simultaneously to elaborate the function of sRNAs in the regulation of the metabolic network and the control of bacterial pathogenesis.

Key words non-coding small RNA; biofilm formation; bacterial resistance; dual RNA-seq; Ligation of interacting RNA followed by high-throughput sequencing

细菌感染伴随着人类社会的发展而滋生和蔓延, 给人类生活各方面造成了沉重负担。病原细菌的致病力取决于致病因子的表达。在很大程度上, 致病因子的表达决定了病原细菌的生存能力。在病原菌与宿主的长期相互作用中, 病原菌通过感应其所处环境刺激(如温度、pH 值、氧含量、渗透性等)快速调节基因的表达, 以适应宿主内环境并在宿主体内存活^[1-3]。近年研究表明, 细菌内也存在类似于真核生物中的 microRNA、长度为 45 ~ 500 nt 的调控 RNA—非编码小 RNA (small RNA, sRNA)^[4]。目前, 在大肠杆菌中已发现约 100 种 sRNA, 其中

收稿日期: 2016-10-28; 修回日期: 2016-12-19; 接受日期: 2016-12-19
国家自然科学基金(No. 81473251, No. 81301474, No. 31370166)和福建省自然科学基金(No. 2014J01139, No. 2015J01345)项目资助

* 联系人 Tel: 0592-28800630; E-mail: daiwang@xmu.edu.com

Received: October 28, 2016; Revised: December 19, 2016; Accepted: December 19, 2016

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81473251, No. 81301474, No. 31370166) and Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2014J01139, No. 2015J01345)

* Corresponding author Tel: 0592-2880630;

E-mail: daiwang@xmu.edu.com

50.5%的sRNA已知其功能^[5,6]其余sRNA功能尚未确定。已知sRNA的作用方式有2种^[7,8]:(1)与相应的靶标mRNA进行碱基互补配对,阻碍(或促进)蛋白质的翻译或影响mRNA的稳定性,达到调控基因表达的目的;(2)与调控蛋白质直接结合,使其无法与目标mRNA结合,从而调控基因表达^[9]。迄今为止,大约有1/3的sRNA需要伴侣蛋白Hfq的介导^[10]。

病原菌进入宿主体内后,sRNA响应宿主微环境的变化,调控细菌代谢尤其是毒力基因的表达。目前,已发现多种sRNA与细菌致病性和毒力相关,sRNA在调控转录因子和毒力基因的表达、调节外膜蛋白的合成、脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)的修饰、生物膜的形成和群体感应等方面具有十分重要的作用^[11-13]。然而,国内外关于sRNA调控代谢网络和影响致病性方面的研究仍然处于初级阶段。基于此,本文将从生物膜形成、细菌耐药性以及宿主影响等方面,结合新颖的sRNA研究方法,对细菌sRNA的作用进行综述,为病原菌毒力调控领域提供理论依据。

1 sRNA对生物膜形成及其相关表型的调控

微生物以多种方式适应生存环境的变化^[14]。对于细菌而言,形成生物膜(biofilm,BF)是非常重要的环境适应机制。当细菌受到压力刺激时,为了抵抗不利环境,细菌将自身合成的水合多聚物粘附在固体表面,以固着方式生长从而形成生物膜。生物被膜的存在使细菌在生理、代谢、对底物的降解或利用、对环境的抵抗能力等方面具有独特优势,对抗生素和宿主免疫防御的抵抗性增强^[15,16]。细菌生物膜的形成是复杂的生理过程。与生物膜形成相关的基因已通过基因芯片及系统的基因敲除研究得到证实^[17,18]。与鞭毛相关的运动迁移性、细胞表面的附属物(如I型菌毛或curli菌毛、脂多糖)以及表多糖等都是细菌起始粘附和生物膜成熟过程中的重要因素。

生物膜的形成依时间或特定环境信号的改变而受到严格的调控。sRNA响应特定的环境刺激因子并且对逆境胁迫调节相关的基因起调控作用^[19]。因此,sRNA可能参与环境因子调控生物膜形成的网络。已有文献报道影响*flhDC*、*rpoS*及*csuD*表达的sRNA会影响生物膜的形成^[20,21]。Bak等^[5]构建了99个sRNA过表达质粒,分析它们对生物膜形成及相关表型的影响。发现33个sRNA显著影响

生物膜的形成、细菌的迁移性(swimming及swarming)、I型菌毛或curli菌毛的形成,其中5个sRNA既抑制I型菌毛形成也抑制生物膜形成,其余sRNA只对其中一种表型产生影响(Table 1)。有些sRNA作用于生物膜相关基因*csuD*、*flhD*或*pagA*而直接或间接地影响生物膜的形成。但是,sRNA调控生物膜形成相关表型的作用机制尚不清楚,需要更进一步地研究分析去阐明sRNA在生物膜形成过程中的作用机制。

2 sRNA对细菌耐药性的作用

抗菌药物不合理使用导致细菌耐药性频频出现,严重威胁着人类健康和生活质量^[22,23]。因此,开发新型抗生素治疗耐药细菌感染迫在眉睫。细菌外排泵(efflux pump)是重要的细菌耐药机制。大肠杆菌存在5类多药物外排泵,使得菌体对一系列抗生素和化合物具有很强抗性^[24]。尽管细菌外排泵的结构、组装及功能已为人知,其转录水平的调控机制也已部分探明。但是,外排泵转录后调控机制仍鲜为人知。非编码sRNA在基因表达的转录后调控中起着至关重要的作用。Parker等^[23]发现,依赖Hfq的sRNA(SdsR)对细菌AcrAB-TolC外排泵相关的基因具有调控作用。SdsR与*tolC*mRNA的5'-UTR碱基互补配对,下调*tolC*的表达,导致TolC蛋白的减少,增强菌株对抗生素的敏感性。另外,在大肠杆菌及沙门氏菌的多重耐药菌株中,过表达SdsR将减弱菌株对喹诺酮类抗生素的耐药性,如左氧氟沙星、萘啶酮酸、诺氟沙星等药物。Nishino等^[22]指出,过表达DsrA能够减弱细菌对苯唑西林、氯唑西林、红霉素、罗丹明6G和新生霉素的敏感性。其作用机制可能是依赖RpoS-DsrA-HNS通路激活MdtEF多药排出泵相关基因的表达,从而调控细菌对多种药物的敏感性。Kim等^[25]在大肠杆菌及沙门氏菌中利用26个sRNA针对5大类抗生素作系统筛选分析。其中,9种sRNA(ChiX,CyaR,MicC,MicF,OxyS,RseX,RybD,RyeB,SgrS)过表达菌株对抗生素表现为耐药或敏感(Table 2);然而,8种sRNA过表达菌株(ArcZ,GcvB,IS118,MicA,RprA,RybB,RydC,Spot42)对某些抗生素耐药,同时对另一些抗生素敏感(Table 2),具体的作用机制还有待验证。综上所述,研究sRNA对细菌外排泵的作用将有利于促进新型抗生素增效剂的研发。

Table 1 The effect of sRNA on biofilm formation and related phenotypes

sRNA	Biofilm*	Swimming*	Swarming*	Type I*	Curli*	Hfq**	Function***
GlmY		-					Y
ArcZ	-	-	-				Y
Och5	+	-	-				N
DicF	-	-	-			+	Y
RyfB		-	-				N
DsrA	-	-	-	-		+	Y
IS118	-	-	-	-	-		N
OxyS		-	-		-	+	Y
OmrA	-	-	-		-	+	Y
RyfD	-		-				N
RdlC			-				Y
MicC			-			+	Y
GadY			-			+	Y
CsrB			-		+		Y
CsrC	+		-		+		Y
SdsR	-		-				Y
RyeF			-			+	N
GcvB	+		-			+	Y
MicA	-	+	-	-		+	Y
RdlB			-		-		Y
RprA			-		-	+	Y
RyfA	-		-		-		N
RseX	+		-		-		Y
SgrS	+		-		-	+	Y
RydC			-		-	+	Y
RyhB			-		-	+	Y
RybB	-			-		+	Y
MicM	-			-	-	+	Y
CyaR					-	+	Y
OmrB					-	+	Y
McaS	-		+		-		Y
FnrS	+					+	Y
SroC	-					+	N

* - represents repression; * + represents activation; ** + means sRNAs interacted with Hfq;

***: Y is Yes; means that functions of sRNAs are known; N is No; means that functions of sRNAs are unknown

3 sRNA 对宿主细胞的影响

3.1 细菌外膜囊泡的 sRNA 介导病原菌与宿主之间的相互作用

目前,细菌 sRNA 的研究主要集中于它们对于细菌自身的作用,sRNA 在种间的作用尚不清楚。细菌外膜囊泡(outer membrane vesicles,OMVs)介导的蛋白质传递是宿主与病原菌相互作用的重要机制,它以特殊的作用方式影响宿主细胞^[26]。OMVs 是革兰氏阴性菌分泌的直径为 50~250 nm 的球状颗粒,包含脂质、蛋白质、脂多糖和 DNA,参与群体感应,向宿主细胞传递毒力因子、毒素,并介导宿主

细胞的免疫反应。越来越多的研究表明,OMVs 包含许多 sRNA,可能对宿主的 mRNA 功能或稳定性起作用。绿脓假单胞菌属于革兰氏阴性菌,与其他革兰氏阴性菌一样产生外膜囊泡。Koeppen 等^[27]发现,绿脓假单胞菌分泌的 OMVs 中包含 sRNA52320,能够被传递到宿主细胞并影响宿主细胞的靶 mRNA 表达。sRNA52320 是源于铜绿假单胞菌蛋氨酰 tRNA 的一种 sRNA,其在 OMVs 中含量很高。当 sRNA52320 从 OMVs 转移到宿主细胞时,将减少原代培养的人呼吸道上皮细胞中由 LPS 和 OMVs 诱导的 IL-8 的分泌,同时 sRNA52320 也会减弱 OMVs 诱导的 KC(keratinocyte-derived

chemokine) 细胞因子的分泌以及小鼠肺组织中性粒细胞的浸润。OMVs 介导的 sRNA 向宿主细胞的传递可能在所有革兰氏阴性菌中是共通的。志贺杆菌 (*Shigella*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 和克雷伯菌 (*Klebsiella*) 等临床菌株在感染宿主的过程中可能会

通过此机制获得感染优势。OMVs 中的 sRNA 也可能介导细菌与同一生态位的其它微生物竞争。未来的研究需将进一步阐述 OMVs 中的 sRNA 在微生物-宿主以及微生物-微生物之间的相互作用, 为开发新的抗感染制剂提供新思路。

Table 2 sRNA-mediated stress responses to the different antibiotics

	GEN	MEM	CEF	CFM	CTX	CXM	LVX	LOM	NAL	NOR	MIN	APR	STR	FUX	NEO
R	MicF		R		R	R				R	R			R	
	OxyS		R												
	RseX		R												
S	RybD	R													
	ChiX		S	S			S	S	S	S					
	CyaR			S						S					
	MicC								S						
	RyeB						S		S	S					
	SgrS		S		S			S							
R + S	ArcZ	R									S		R		R
	GcvB	R		S			S		S	S					
	IS118	R	R	S											
	MicA	R							S	S			R		
	RprA		R	R								S			
	RybB	R	S	R					S					R	
	RydC	R		S		S		S	S	S					
	Spot42	R		S	S										

S represents susceptibility; R represents resistance; CEF, cefalotin; CFM, cefixime; CTX, cefotaxime; CXM, efuroxime; GEN, gentamicin; LVX, levofloxacin; LOM, lomefloxacin; MEM, meropenem; MIN, minocycline; NAL, nalidixic acid; NOR, norfloxacin; APR, apramycin; STR, streptomycin; FUX, cefuroxime; NEO, neomycin

3.2 sRNA 影响宿主细胞的免疫反应

在病原菌与宿主相互作用时, sRNA 除了对病原菌相应的靶标起调控作用, 还会使宿主细胞内的基因表达谱发生变化^[28]。在细菌粘附于宿主细胞表面并进入细胞内部的过程中, sRNA PinT 与伴侣蛋白 Hfq 相结合, 调控 SPI-1 所编码效应蛋白及 SPI-2 编码毒力因子的时序性表达, 促进细菌从侵染的原发病灶转移至胞内进行增殖, 从而逃避宿主免疫的杀灭。同时, PinT 活性也影响宿主的免疫反应。比较缺失 *pinT* 基因的沙门氏菌感染与野生型沙门氏菌感染的宿主细胞的转录本差异, 发现细胞内许多基因表达水平发生改变, 比如, 长链非编码 RNAs (long noncoding RNAs, lncRNAs), 线粒体基因超活化, 参与先天免疫通路的蛋白质(例如, 白介素-8)的 mRNA 丰度增加, SOCS3 蛋白(能够调控炎症反应 JAK-STST 信号通路的蛋白质)的活化得到增强。炎症反应 JAK-STST 信号通路的动态平衡对沙门氏菌在宿主中获得最佳感染非常重要。

3.3 sRNA 影响病原菌的定植能力

越来越多的研究表明, sRNA 在细菌的生理学

及致病机制中具有重要作用。在霍乱弧菌中, 受 σ^E 调控的 sRNA *VrrA* 通过影响外膜囊泡 OMVs 的释放来调控病原菌的致病性^[11]。*VrrA* 与外膜蛋白 *ompA* mRNA 5'端(包括核糖体结合位点以及部分编码区)的不完全碱基互补配对导致 *OmpA* 的表达水平下降, 进而减弱霍乱弧菌在小鼠小肠中的定植能力。同时 *OmpA* 的下降又会促使细菌释放大量的外膜囊泡, 来保护细菌免受外界环境, 诸如 UV 等的伤害^[29,30]。研究还发现, *VrrA* 的过表达降低毒素共调菌毛蛋白 *TcpA* 的表达, 减弱霍乱弧菌的毒力, 而 *VrrA* 的缺失将促使大量霍乱弧菌定植在小鼠肠道中。Le Pabic 等^[31]发现, 致病性金黄色葡萄球菌的 sRNA *SprC* 与编码细菌自溶素(autolysin, ATL)的 *atl* mRNA 相互作用, 阻止核糖体的进入、抑制自溶素的表达。小鼠感染模型的实验表明, *SprC* 的诱导表达减弱细菌毒力, 同时降低其在细胞中传播及其它部位的定植。在金黄色葡萄球菌侵染进入宿主细胞后, 随着感染时间的延长, *SprC* 的表达水平下降, 进而增强细菌对宿主免疫细胞的抵抗能力。除此之外, 沙门氏菌中的 sRNA *SgrS* 对毒力因子的调控能

够介导其感染宿主细胞^[32];霍乱弧菌的 sRNA TarA 介导病原体在幼鼠体内的定植^[33];在大肠杆菌及沙门氏菌中,sRNA Chix(也叫 RybC,或 MicM,或 SorB)也可影响细菌在宿主体内的毒性^[34,35]。综上所述,sRNA 通过影响特定的靶标参与细菌致病性、宿主免疫系统的调控,诠释了 sRNA 在毒力调控方面的作用。

4 sRNA 调控作用的研究方法

目前,非编码 sRNA 的研究十分火热,如何深入研究非编码 sRNA 的功能是大家关心的问题。现有的方法存在耗时长、灵敏度低、应用范围小、只适用于单一物种等缺点,导致 sRNA 调控病原致病机制的研究报道较少。因此,有效可靠的研究 sRNA 调控作用的方法将大大推动该领域的发展。

4.1 双 RNA-seq

Westermann 等^[28]利用双 RNA-seq(dual RNA-seq)的方法研究了非编码 sRNA 在宿主与病原菌相互作用中的作用。双 RNA-seq 是一种在感染过程中同时研究细菌与宿主 sRNA 的新技术,可以揭示感染初期阶段和后期阶段两者转录谱的改变。研究者利用该技术分析评价人的 HeLa 细胞及沙门氏菌在感染过程中基因表达的变化。并重点关注细菌感染细胞的过程中表达水平发生变化的 mRNAs 及有调控作用的 RNAs。细菌非编码 sRNA 的表达受到环境信号的严格调控,在细菌受到外界刺激时发挥作用,包括响应宿主细胞的变化等。当沙门氏菌进入宿主细胞后,随着微环境的改变,sRNA 的表达发生变化。PinT 是其中变化较大的 sRNA,它是 1 个含有 80 个碱基的 sRNA,在感染宿主细胞时被诱导表达,同时被细菌的 PhoP/Q 系统激活。PinT 能够与伴侣蛋白 Hfq 结合调控靶 mRNA 的时序性表达,对于沙门氏菌在宿主体内的生存是非常重要的。同时 PinT 还调控肠道沙门氏菌的其它基因;可能影响宿主转录模式,导致 lncRNAs 改变以及激活宿主细胞相关信号通路开放。双 RNA-seq 的应用揭示了细菌 sRNA 的功能。sRNA PinT 暂时性地控制与入侵相关效应子表达、病原体在细胞内存活所需的毒性基因表达,也改变宿主的编码转录体和非编码转录体的表达。这一高通量筛选方法的应用,有助于揭示感染过程中的关键致病机制。双 RNA-seq 技术不仅在 RNA 研究上为胞内病原菌与宿主的互作研究提供了很好的范例,同时也为病原菌中一些未知功能基因的研究提供新的线索。

4.2 LIGR-seq

另外,Sharma 等^[36]发明了一种可以研究不同 RNA 分子之间相互作用的新技术——LIGR-seq(LIGATION of interacting RNA followed by high-throughput sequencing)。当 2 个 RNA 分子有相匹配的序列时,会像尼龙搭扣一样粘在一起。然后,将对的 RNA 结构从细胞移除,并采用最先进的测序方法进行分析,以精确地确定粘在一起的 RNA。此技术在真核细胞上进行,具体操作方法:(1)细胞与 AMT(4'-aminomethyltrioxalen)(可以嵌入 RNA 二倍体)一起孵育,365 nm 的紫外光辐射;(2)RNA 提取后使用 DNaseI 处理,去除 rRNA;(3)使用 S1 核酸酶消化 RNA 生成的末端可以与 circRNA 连接酶的连接反应兼容;(4)使用 RNase R 富集交联的 RNA,并应用 254 nm 的紫外光辐射逆转交联;(5)利用“Aligater”分析方法对 RNA-RNA 嵌合阅读框进行检测和评价。平行处理的对照样本以不添加 AMT 或者连接酶的方式处理。LIGR-seq 的检测优势主要体现在:(1)可以观察活细胞内的 RNA 相互作用;(2)不需要通过芯片等常规方法预选 RNA,就可以观察细胞在整体水平发生的变化及它们是怎样影响细胞功能的,并利用这些信息开展新的研究。

5 问题与展望

非编码 sRNA 调控致病因子的研究是病原菌毒力表达调控和细菌 sRNA 研究领域的交叉前沿之一,也是近年来许多科研团队所致力发展的主要方向。虽然已经预测并得到实验验证的 sRNA 多达百余种,但其具体的作用靶标、作用机制仍需科学、系统的研究方法去证实。另一方面,在病原菌与宿主的相互作用中,sRNA 在种间的调控作用以及 sRNA 与宿主之间的关系需进一步地研究,以便研究者能够清楚 sRNA 在病原菌感染宿主过程中的调控作用,为新型抗菌药物的筛选提供潜在的作用靶点和相关信息。

参考文献(References)

- [1] Pepe JC, Badger JL, Miller VL. Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the Yersinia enterocolitica inv gene[J]. Mol Microbiol, 1994, 11(1): 123-135
- [2] Raivio TL. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis[J]. Mol Microbiol, 2005, 56(5): 1119-1128
- [3] Bertin Y, Girardeau JP, Chaucheyras-Durand F, et al. Enterohaemorrhagic Escherichia coli gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content[J]. Environ Microbiol, 2011, 13(2): 365-377
- [4] Vogel J. A rough guide to the non-coding RNA world of

- Salmonella[J]. *Mol Microbiol*, 2009, **71**(1): 1-11
- [5] Bak G, Lee J, Suk S, *et al.* Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli* [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 15287
- [6] Argaman L, Hershberg R, Vogel J, *et al.* Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli* [J]. *Curr Biol*, 2001, **11**(12): 941-950
- [7] Urban JH, Vogel J. Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(3): 1018-1037
- [8] Gottesman S. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2004, **58**: 303-328
- [9] Vakulskas CA, Leng Y, Abe H, *et al.* Antagonistic control of the turnover pathway for the global regulatory sRNA CsrB by the CsrA and CsrD proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(16): 7896-7910
- [10] Chao Y, Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2010, **13**(1): 24-33
- [11] Song T, Sabharwal D, Gurung JM, *et al.* *Vibrio cholerae* utilizes direct sRNA regulation in expression of a biofilm matrix protein [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(7): e101280
- [12] Thomason MK, Fontaine F, De Lay N, *et al.* A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2012, **84**(1): 17-35
- [13] Udekwi KI. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the *Escherichia coli* luxS mRNA; involvement of the sRNA MicA [J]. *PLoS One*, 2010, **5**(10): e13449
- [14] Dudin O, Geiselmann J, Ogasawara H, *et al.* Repression of flagellar genes in exponential phase by CsgD and CpxR, two crucial modulators of *Escherichia coli* biofilm formation [J]. *J Bacteriol*, 2014, **196**(3): 707-715
- [15] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(2): 95-108
- [16] Chen C, Liao X, Jiang H, *et al.* Characteristics of *Escherichia coli* biofilm production, genetic typing, drug resistance pattern and gene expression under aminoglycoside pressures [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2010, **30**(1): 5-10
- [17] Ren D, Bedzyk LA, Thomas SM, *et al.* Gene expression in *Escherichia coli* biofilms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**(4): 515-524
- [18] Niba ET, Naka Y, Nagase M, *et al.* A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli* [J]. *DNA Res*, 2007, **14**(6): 237-246
- [19] Udekwi KI, Wagner EG. Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(4): 1279-1288
- [20] Bordeau V, Felden B. Curli synthesis and biofilm formation in enteric bacteria are controlled by a dynamic small RNA module made up of a pseudoknot assisted by an RNA chaperone [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(7): 4682-4696
- [21] De Lay N, Gottesman S. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2012, **86**(3): 524-538
- [22] Nishino K, Yamasaki S, Hayashi-Nishino M, *et al.* Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, **66**(2): 291-296
- [23] Parker A, Gottesman S. Small RNA regulation of TolC, the outer membrane component of bacterial multidrug transporters [J]. *J Bacteriol*, 2016, **198**(7): 1101-1113
- [24] Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, **28**(2): 337-418
- [25] Kim T, Bak G, Lee J, *et al.* Systematic analysis of the role of bacterial Hfq-interacting sRNAs in the response to antibiotics [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, **70**(6): 1659-1668
- [26] McBroom AJ, Kuehn MJ. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response [J]. *Mol Microbiol*, 2007, **63**(2): 545-558
- [27] Koeppen K, Hampton TH, Jarek M, *et al.* A Novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles [J]. *PLoS Pathog*, 2016, **12**(6): e1005672
- [28] Westermann AJ, Forstner KU, Amman F, *et al.* Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions [J]. *Nature*, 2016, **529**(7587): 496-501
- [29] Song T, Mika F, Lindmark B, *et al.* A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles [J]. *Mol Microbiol*, 2008, **70**(1): 100-111
- [30] Song T, Wai SN. A novel sRNA that modulates virulence and environmental fitness of *Vibrio cholerae* [J]. *RNA Biol*, 2009, **6**(3): 254-258
- [31] Le Pabic H, Germain-Amiot N, Bordeau V, *et al.* A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(19): 9232-9248
- [32] Balasubramanian D, Vanderpool CK. Deciphering the interplay between two independent functions of the small RNA regulator SgrS in *Salmonella* [J]. *J Bacteriol*, 2013, **195**(20): 4620-4630
- [33] Richard AL, Withey JH, Beyhan S, *et al.* The *Vibrio cholerae* virulence regulatory cascade controls glucose uptake through activation of TarA, a small regulatory RNA [J]. *Mol Microbiol*, 2010, **78**(5): 1171-1181
- [34] Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, *et al.* Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target [J]. *Genes Dev*, 2009, **23**(17): 2004-2015
- [35] Mandin P, Gottesman S. A genetic approach for finding small RNAs regulators of genes of interest identifies RybC as regulating the DpiA/DpiB two-component system [J]. *Mol Microbiol*, 2009, **72**(3): 551-565
- [36] Sharma E, Sterne-Weiler T, O' Hanlon D, *et al.* Global Mapping of Human RNA-RNA Interactions [J]. *Mol Cell*, 2016, **62**(4): 618-626