铜绿假单胞菌生物膜形成机制及中药对其调控作用研究进展

何莎莎^{1,2,3} 赵京霞^{1,2,3} 徐霄龙^{1,2,3} 郭玉红^{1,2,4} 刘清泉^{1,2,3,4}

(1 首都医科大学附属北京中医医院,北京,100010; 2 中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室,北京,100010;

3 北京市中医研究所,北京,100010; 4 北京中医医院顺义医院,北京,101300)

摘要 铜绿假单胞菌是一种能引起机体急性或慢性感染的条件致病菌,极易形成生物膜是其产生耐药的一个重要因素。近年来研究表明,中药对铜绿假单胞菌生物膜形成具有明显的抑制作用。作者就铜绿假单胞菌生物膜形成周期、生物膜形成的主要调控信号系统以及中药对生物膜形成的影响进行综述。

关键词 铜绿假单胞菌;生物膜;中药

Research Progress of *Pseudomonas Aeruginosa* Biological Film Formation Mechanism and Its Chinese Material Medica Regulations

He Shasha^{1,2,3}, Zhao Jingxia^{1,2,3}, Xu Xiaolong^{1,2,3}, Guo Yuhong^{1,2,4}, Liu Qingquan^{1,2,3,4}

(1 *Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated with Capital Medical University, Beijing 100010, China;*

2 *Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China;* 3 *Beijing Key Laboratory of Basic*

Research with Traditional Chinese Medicine on Infectious Diseases, Beijing 100010, China;

4 *Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Shunyi Branch, Beijing 101300, China)*

Abstract *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogenic bacterium that causes acute or chronic infection, one of its drug resistance factor is to form biological film easily. According to recent studies, Chinese material medica has significant inhibitory effect on *pseudomonas aeruginosa* biological film formation. The author reviewed the biological film formation cycle of *pseudomonas aeruginosa*, the major regulatory signal system for biofilm formation and the impact of Chinese material medica on it.

Key Words *Pseudomonas aeruginosa*; Biological film; Chinese material medica

中图分类号:R378.99+1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.003

铜绿假单胞菌是医院获得性感染的重要致病菌,能引起各种不同的急性或慢性感染。目前,临床上对铜绿假单胞菌感染的治疗不太理想,主要原因是该菌具有多重耐药性。铜绿假单胞菌的耐药机制比较复杂,主要包括有以下途径^[1]:1)细胞膜通透性降低;2)主动外排泵;3)钝化酶产生;4)染色体突变和质粒转导获得耐药基因;5)形成生物膜。其中形成生物膜是铜绿假单胞菌耐药的一个非常重要的途径。与浮游细菌相比,生物膜中的细菌能够耐受抗生素和宿主的免疫反应,具有极强的耐药性。因此,研究铜绿假单胞菌生物膜形成的调控机制和研发抗生物膜形成药物十分重要。我国中药资源十分丰富,中医药在治疗耐药细菌感染方面具有独特优势,在临床上也常用中药联合抗生素治疗难治性铜绿假单胞菌感染性疾病^[2]。我们对铜绿假单胞菌生物膜

形成机制及中药对其调控作用的相关研究进行综述,为运用中药治疗铜绿假单胞菌感染疾病提供参考。

1 铜绿假单胞菌生物膜形成周期

细菌生物膜是指细菌黏附于接触表面,被自身分泌的胞外聚合物(EPS)包裹形成的细菌聚集的膜状结构^[3]。与浮游细菌相比,生物膜形成时病原菌的抗药性比在游离状态下高50~5000倍^[1]。细菌生物膜形成是一个动态过程,主要由细菌和细菌自身分泌的胞外聚合物(EPS)组成,其中EPS占细菌生物膜总体积的85%^[4-5]。EPS主要由胞外多糖、胞外DNA、多肽、脂类等组成,为细菌生物膜形成提供稳定性支架,并形成凝聚力调节细菌黏附至接触表面^[6]。由于铜绿假单胞菌极易形成生物膜,已成为研究细菌生物膜的模式菌株。

基金项目:北京市医院管理局重点医学专业发展计划专项(编号:ZYLX201611);国家科技重大专项课题(编号:2013ZX09102026)

作者简介:何莎莎,女,硕士,研究方向:耐药菌

通信作者:刘清泉,男,中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室主任,研究方向:中西医结合急危重症,联系方式:(010)52176522, E-mail:liuqingquan2003@126.com

胞外多糖是 EPS 的主要组成部分,铜绿假单胞菌至少产生 3 种不同的胞外多糖: alginate, Pel 和 Psl,它们决定了生物膜结构的稳定性^[7]。黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌合成的胞外多糖种类不同,其中黏液型铜绿假单胞菌主要合成 alginate,而非黏液型主要合成 Pel 和 Psl^[8-9]。Alginate 是由 D-甘露糖醛酸和 L-古罗糖醛酸组成的无支链聚合物^[10], 主要维持细菌生物膜结构的稳定和所需的水分及营养物质^[11]。Pel 是一种葡萄糖含量丰富的多糖,其结构尚未确定^[12]。Psl 是由五糖重复单元组成,包括 D-甘露糖、L-鼠李糖和 D-葡萄糖^[13]。Pel 和 Psl 为生物膜发育提供主要的骨架结构,并且参与生物膜形成的早期阶段^[14]。

铜绿假单胞菌的不同菌株或者在不同的营养条件下,会出现不同的生物膜结构^[15]。在葡萄糖培养基中,铜绿假单胞菌 PAO1 生物膜形成周期主要分为以下 5 个步骤^[16]: 1)“可逆”的浮游细菌吸附在适合生长的接触表面; 2)“可逆”的浮游细菌变成“不可逆”,更稳定的吸附在接触表面; 3)“不可逆”的浮游细菌在 EPS 基质包裹下形成微菌落; 4)生物膜的成熟和大菌落的形成; 5)生物膜释放浮游细菌扩散吸附至其他接触表面。由此可见,细菌生物膜的形成是一个连续的循环过程。

2 铜绿假单胞菌生物膜形成的调控机制

生物膜不是细菌随意堆积形成的,而是具有相互协调作用的高度分化结构的群体。从浮游菌到细菌生物膜的形成,涉及到多种信号传导通路。生物膜内细菌通过菌间信号传导调节细菌内的不同基因表达,相互协调来维持生物膜的空间结构和功能。参与铜绿假单胞菌生物膜形成的调控信号转导系统主要有:群体感应系统(Quorum Sensing, QS)、双组分调节系统(Two-component Regulatory Systems, TCS)及第二信使 c-di-GMP 系统^[17-19]。

2.1 群体感应系统与生物膜的形成

群体感应系统是细菌密度依赖调控系统,主要是通过感知扩散的化学分子信号,引起细菌一些特定基因的表达,从而调控细菌毒力因子的产生、细菌运动性和生物膜的形成^[20-21]。铜绿假单胞菌根据信号受体蛋白不同将 QS 分为 2 类:一类是高丝氨酸内酯(Acyl Homoserine Lactone, AHL)-依赖的细胞间信号系统: Las 系统和 Rhl 系统;和一个非 AHL-依赖的细胞间信号分子-喹诺酮信号(PQS)系统。其中 Las 和 Rhl 系统分别由信号分子合成酶(LasI/RhII)和转录因子(LasR/RhlR)组成。LasI 和 RhII 分别指导 3-氧代十

二烷基-L-高丝氨酸内酯(3-oxo-C12-HSL)和 N-丁酰基-高丝氨酸内酯(C4-HSL)的合成,然后与各自的转录激活受体蛋白 LasR/RhlR 结合形成转录复合物,逐级调控下游基因的表达^[22]。

QS 系统在铜绿假单胞菌生物膜形成周期中发挥重要作用。Davies 等在 1998 年研究发现,铜绿假单胞菌 LasI 突变组生物膜明显变平、出现未分化和容易从接触表面脱离的现象,表明 Las 系统在铜绿假单胞菌生物膜的形成和成熟中发挥重要作用^[23]。Gilbert 等报道 QS 系统转录因子 LasR 可以结合到 Psl 操纵子的启动子区域,调节胞外多糖 Psl 的表达^[24]。Sakuragi 等研究发现, Rhl 系统通过增强 Pel 多糖的合成调节铜绿假单胞菌生物膜的形成。PQS 系统与铜绿假单胞菌生物膜形成过程中的胞外 DNA 释放相关, lasI, rhII, pqsA 和 fliMpiA 突变菌株生物膜中胞外 DNA 含量比野生型菌株明显减少,并且突变菌株生物膜相对于野生型对十二烷基硫酸钠更敏感^[25]。

2.2 双组分调控系统与生物膜形成

双组分调控系统可感应外界环境(pH、渗透压、温度、营养等)变化,并作出适应性调整以更好的适应环境。铜绿假单胞菌的基因组编码了 129 个 TCS 蛋白, GacS/GacA 双组份调控系统是目前研究最透彻的 TCS^[26],近年来与急性和慢性感染相关的 RetS 和 LadS 传感激酶也成为研究热点^[27]。

GacS/GacA 双组分系统是 QS 系统的上游调控系统,调控多种毒力因子的合成和生物膜的形成。GacS/GacA 双组分调控系统通常是由跨膜蛋白传感器 GacS 和应答调控因子 GacA 组成。GacS 感受外界传递的信号分子,与 GacS 配体结合部位结合,激活 GacS,使其自身磷酸化,然后将磷酸基团传递给 GacA,从而上调小 RNA (RsmZ 和 RsmY) 的表达, RsmZ 和 RsmY 可以捕获小 RNA 结合调节蛋白 RsmA,抑制 psl 基因 (pslA-L) 的转录后调控^[28-30]。GacS/GacA 系统还能通过抑制 RsmA 的活性负调控 C4-HSL 和 3-OXO-C12-HSL 的合成,从而控制 Las 系统和 Rhl 系统。

近年来研究表明, GacS/GacA 双组分调控系统受到具有相反活性的 RetS 和 LadS 激酶的影响。RetS 和 LadS 通过调节 GacS 磷酸化水平抑制或促进 GacA 的磷酸化,从而调控 GacS/GacA 系统功能^[31-32]。组氨酸激酶 Rets 可以抑制生物膜的形成,而组氨酸激酶 Lads 可以抵消 Rets 的抑制作用。Goodman 等研究表明, Rets 突变株相对于野生型

PAO1 更容易产生生物膜,在急性和慢性感染中发挥重要作用^[33]。Mikkelsen 等研究发现,先天性 Lads 基因缺失的 PA14 菌株相对于 PA14 LadS + 菌株,生物膜的形成和 III 型分泌系统(T3SS)的表达都受到抑制^[34]。

2.3 c-di-GMP 调控生物膜形成 3'-5' 环二鸟苷酸(bis-(3'-5'))-cyclic dimeric guanosine monophosphate, c-di-GMP)是广泛存在于细菌内的第二信使,是细菌生存和代谢过程中的关键调节因子,主要参与调节细菌生物膜的形成、细菌运动能力和细菌毒力^[35]。细胞内合成的 c-di-GMP 要发挥调控作用,必须与受体相结合,通过改变受体蛋白的构象来调控不同的信号通路。

Alg44 蛋白与胞外多糖 alginate 的合成相关,c-di-GMP 能够结合到受体蛋白 Alg44 的 PilZ 结构域上,通过蛋白之间相互作用激活其他蛋白的活性,进而调节 alginate 的合成和生物膜的形成^[36]。同时,转录调节因子也能结合到第二信使上调节基因的转录过程。FLeQ 是第一个被发现的可以调节基因转录的 c-di-GMP 受体,通过与 c-di-GMP 结合调控铜绿假单胞菌中 pel 基因的转录,进而调控胞外多糖 Pel 的合成和生物膜的形成^[37]。高浓度的 c-di-GMP 能够促进胞外多糖(alginate、Pel)的合成和细菌生物膜的形成^[38]。而低浓度的 c-di-GMP 能够促进细菌运动性,抑制细菌生物膜的形成^[39]。

3 中药及其有效成分对铜绿假单胞菌生物膜的影响

3.1 金银花及其有效成分 金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花,具有清热解毒、疏散风热的功效。覃雪军等研究发现,金银花水煎液能明显抑制铜绿假单胞菌生物膜形成,并能抑制铜绿假单胞菌对固体表面的黏附能力,其抑制效果与红霉素相当;并且金银花水煎液在体外能增强头孢他啶对早期及成熟生物膜内铜绿假单胞菌的杀菌能力,这种协同效果在成熟生物膜内比红霉素更明显^[40]。袁秀丽等研究发现,金银花水煎液 125 g/L 与庆大霉素 1:1 联合用药对铜绿假单胞菌生物膜形成有明显抑制作用^[41]。

绿原酸是金银花的主要抗菌有效成分。陈一强等研究发现,体外 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的绿原酸可抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成和延缓生物膜的成熟;大鼠腹腔注射 40 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 绿原酸连续 3 d 和 7 d 能够抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成,且 QS 系统在大鼠体内铜绿假单胞菌生物膜形成中起重要作用^[42]。吴海英等研究发现,体外 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的

绿原酸能够显著抑制黏液性铜绿假单胞菌生物膜的形成,绿原酸和左氧氟沙星联合用药可增强左氧氟沙星对生物膜内黏液性铜绿假单胞菌的抗菌性^[43]。

3.2 鱼腥草及其有效成分 鱼腥草为三白草科植物蕺菜干燥地上部分,具有清热解毒、利尿消肿的功效。程惠娟等研究表明,鱼腥草水提液对铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度为 250 g/L ,与阿奇霉素联合用药具有明显的抗菌增强作用,并能抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成^[44]。

鱼腥草素钠是鱼腥草的主要有效成分,也是临床常用药物鱼腥草注射液的主要成分。王艳等研究发现,鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌的最小抑菌浓度是 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制铜绿假单胞菌生物膜 50% 的浓度(SMIC50)在 9.37 ~ 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,SMIC80 在 37.5 ~ 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间^[45]。朱玲玲等研究表明,头孢他啶抑制铜绿假单胞菌生物被膜 SMIC50、早期、成熟期形成的用药浓度分别是 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$;而鱼腥草素钠与头孢他啶联合用药时,其对铜绿假单胞菌 SMIC50、早期、成熟期生物膜形成的抑制浓度都下降至原来的一半,说明鱼腥草素钠与头孢他啶具有协同抗菌作用^[46]。另有研究发现,鱼腥草素钠和左氧氟沙星对铜绿假单胞菌的 MIC 分别为 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;1/2 MIC 鱼腥草素钠和 2 MIC 左氧氟沙星联合用药能够抑制 70% 的生物膜形成,并且最高降低了 92% 的 alginate 浓度,扫描电镜观察到联合用药组更多的死亡细胞和清除的 EPS,说明鱼腥草素钠与左氧氟沙星联合用药可能成为对抗铜绿假单胞菌生物被膜感染的有效抗菌剂^[47]。

3.3 黄连及其有效成分 黄连为毛茛科黄连属多年生草本植物,有清热燥湿、泻火解毒之功效。王平等研究发现,黄连在 12.5 mg/mL 和 6.25 mg/mL 浓度下对铜绿假单胞菌分泌有显著的抑制作用,在 25 mg/mL 和 6.25 mg/mL 浓度下对生物膜形成有显著的抑制,并且能显著抑制各组弹性蛋白酶表达,提示黄连可能是铜绿假单胞菌群体感应系统的抑制剂^[48]。进一步研究发现,黄连乙酸乙酯提取物和氯仿提取物在 3.12 mg/mL 浓度时,对铜绿假单胞菌增殖、绿脓菌素分泌、弹性蛋白酶分泌、生物膜形成能力都有明显的抑制作用,并且在 12.5 mg/mL 浓度时能够明显上调 QS 系统中 lasR 和 rhlR 的转录水平,抑制 lasB 转录水平^[49]。

黄连素又称小檗碱,是黄连的主要生物碱活性成分。研究发现黄连素不仅具有抗菌作用,而且在

治疗腹泻、心血管疾病、抗肿瘤、糖尿病等多方面具有药理作用^[50]。贾子中等研究发现,黄连素对铜绿假单胞菌生物膜形成的 MIC 为 8 692 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 MIC 对细菌生物膜有抑制作用,说明黄连素是一种有效延缓铜绿假单胞菌生物膜形成的生物碱^[51]。

3.4 黄芩及其有效成分 黄芩为唇形科黄芩属多年生草本,以根入药,有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效。研究表明,黄芩及其有效成分有显著的体内外抗菌作用,对治疗日渐增加的耐药细菌感染意义重大^[52]。田芳等研究表明,黄芩水煎液对铜绿假单胞菌生物膜形成有明显的抑制作用,其生物膜最低抑菌浓度为 31.25 mg/mL ,黄芩水煎液在浓度高于 3.93 mg/mL 时与硫酸庆大霉素联用具有协同抑菌作用^[53]。

黄芩的抗菌有效成分为黄酮类化合物,主要包括黄芩苷、黄芩素等。谢林利等研究发现,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄芩苷和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄芩素能够明显抑制铜绿假单胞菌的黏附性和生物被膜的形成^[54]。菅凌燕等研究显示,黄芩苷浓度大于 5 mg/mL 时,铜绿假单胞菌生物膜内活菌数显著减少,黄芩苷与左氧氟沙星联用可显著增强其抗菌活性,降低细菌耐药^[55]。王贵年等研究发现,16.65 mg/mL 黄芩苷对体外铜绿假单胞菌生物膜有较强的抑制作用^[56]。另有研究表明,黄芩苷分别与头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦联合用药时,都能显著增强其对铜绿假单胞菌生物膜的清除能力^[57-58]。

4 结语

铜绿假单胞菌生物膜的形成能够有效地抵御抗生素和机体免疫系统攻击,并易产生多重耐药,给临床上治疗铜绿假单胞菌感染性疾病带来很大困难。因此,研究铜绿假单胞菌生物膜形成的调控机制和研发抗生物膜药物十分必要。目前国内外对调控绿假单胞菌生物膜形成的分子机制研究比较深入,主要包括群体感应系统、双组分调节系统及第二信使 c-di-GMP 系统。大量研究表明,中药在抗细菌生物膜形成方面具有独特优势,其中金银花、鱼腥草、黄连、黄芩等中药及其有效成分对铜绿假单胞菌生物膜形成具有明显的抑制作用,但其主要在体外试验进行研究,缺乏对抗生物膜形成的机制研究。因此今后应在体外试验基础上加强中药及其有效成分对生物膜形成的机制研究,特别是药物如何调控群体感应系统、双组分调节系统及第二信使 c-di-GMP 系统等研究,为临床治疗耐药铜绿假单胞菌感染提供理论依据。

参考文献

- [1] 齐志丽,段美丽,李昂.铜绿假单胞菌耐药机制研究现状[J].山东医药,2014,54(4):83-86.
- [2] 周至品,杨兴秀,叶晓雪.传统药物对铜绿假单胞菌生物被膜作用研究进展[J].中药药理与临床,2015,31(6):230-235.
- [3] Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 881-890.
- [4] Chicurel M. Bacterial biofilms and infections. Slimebusters [J]. Nature, 2000, 408(6810): 284-286.
- [5] Flemming H C, Neu T R, Wozniak D J. The EPS matrix; the "house of biofilm cells" [J]. J Bacteriol, 2007, 189(22): 7945-7947.
- [6] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(9): 623-633.
- [7] Ghafoor A, Hay I D, Rehm B H. Role of exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and architecture [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(15): 5238-5246.
- [8] Ma L, Wang J, Wang S, et al. Synthesis of multiple Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated [J]. Environ Microbiol, 2012, 14(8): 1995-2005.
- [9] Ma L, Conover M, Lu H, et al. Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(3): e1000354.
- [10] Rehm B H, Valla S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48(3): 281-288.
- [11] Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework [J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 1): 3-9.
- [12] Franklin M J, Nivens D E, Weadge J T, et al. Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl [J]. Front Microbiol, 2011, 2: 167.
- [13] Byrd M S, Sadovskaya I, Vinogradov E, et al. Genetic and biochemical analyses of the Pseudomonas aeruginosa Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production [J]. Mol Microbiol, 2009, 73(4): 622-638.
- [14] Colvin K M, Gordon V D, Murakami K, et al. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of Pseudomonas aeruginosa [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(1): e1001264.
- [15] Shrout J D, Chopp D L, Just C L, et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation is nutritionally conditional [J]. Mol Microbiol, 2006, 62(5): 1264-1277.
- [16] Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, et al. The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 759348.
- [17] de Kievit T R. Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms [J]. Environ Microbiol, 2009, 11(2): 279-288.
- [18] Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa [J]. Environ Microbiol, 2011, 13(7): 1666-1681.
- [19] Ha D G, O'Toole G A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a Pseudomonas Aeruginosa Review [J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(2): 2013-2014.
- [20] Jimenez P N, Koch G, Thompson J A, et al. The multiple signaling systems regulating virulence in Pseudomonas aeruginosa [J]. Microbi-

- ol Mol Biol Rev,2012,76(1):46-65.
- [21] Solano C, Echeverez M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing [J]. Curr Opin Microbiol, 2014, 18:96-104.
- [22] 郭俏. 铜绿假单胞菌致病因子抑制剂及喹诺酮信号分子介导的调节途径研究[D]. 西安:西北大学, 2013.
- [23] Davies D G, Parsek M R, Pearson J P, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm[J]. Science, 1998, 280(5361):295-298.
- [24] Gilbert K B, Kim T H, Gupta R, et al. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR [J]. Mol Microbiol, 2009, 73(6):1072-1085.
- [25] Allesen-Holm M, Barken K B, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms[J]. Mol Microbiol, 2006, 59(4):1114-1128.
- [26] Gooderham W J, Hancock R E. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(2):279-294.
- [27] Kong W, Chen L, Zhao J, et al. Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS [J]. Mol Microbiol, 2013, 88(4):784-797.
- [28] Brencic A, McFarland K A, McManus H R, et al. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs [J]. Mol Microbiol, 2009, 73(3):434-445.
- [29] Brencic A, Lory S. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA [J]. Mol Microbiol, 2009, 72(3):612-632.
- [30] Irie Y, Starkey M, Edwards A N, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA [J]. Mol Microbiol, 2010, 78(1):158-172.
- [31] Goodman A L, Merighi M, Hyodo M, et al. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen [J]. Genes Dev, 2009, 23(2):249-259.
- [32] Records A R, Gross D C. Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors [J]. J Bacteriol, 2010, 192(14):3584-3596.
- [33] Goodman A L, Kulasekara B, Rietsch A, et al. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Dev Cell, 2004, 7(5):745-754.
- [34] Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in ladS [J]. PLoS One, 2011, 6(12):e29113.
- [35] Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(4):263-273.
- [36] Benach J, Swaminathan S S, Tamayo R, et al. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains [J]. EMBO J, 2007, 26(24):5153-5166.
- [37] Hickman J W, Harwood C S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor [J]. Mol Microbiol, 2008, 69(2):376-389.
- [38] Nakhmchik A, Wilde C, Rowe-Magnus D A. Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(13):4199-4209.
- [39] Merighi M, Lee V T, Hyodo M, et al. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Mol Microbiol, 2007, 65(4):876-895.
- [40] 覃雪军. 金银花水煎液以及联合头孢他啶对绿脓杆菌生物膜作用的体外研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2003.
- [41] 袁秀丽, 吕嘉彬, 程慧娟. 金银花水煎液抗绿脓杆菌生物膜作用及其与庆大霉素的协同作用[J]. 西北药学杂志, 2010, 25(3):201-203.
- [42] 陈一强. 绿原酸对铜绿假单胞菌生物膜抑制作用及其机制的体内外研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2010.
- [43] 吴海英. 绿原酸对粘液型铜绿假单胞菌生物膜的干预以及对左氧氟沙星增效作用的研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2011.
- [44] 程惠娟, 汪长中, 汪海波, 等. 鱼腥草水提液对铜绿假单胞菌生物被膜的影响及与阿奇霉素的抗菌协同作用[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7):1600-1602.
- [45] 王艳, 程惠娟, 朱玲玲, 等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(11):173-176.
- [46] 朱玲玲, 孙振新, 程惠娟, 等. 鱼腥草素钠对头孢他啶抗铜绿假单胞菌生物被膜的增强作用及抗菌协同作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(10):2353-2355.
- [47] Shao J, Cheng H, Wang C, et al. A phytoanticipin derivative, sodium houttuynin, induces in vitro synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Molecules, 2012, 17(9):11242-11254.
- [48] 王平, 夏飞, 叶丽华, 等. 黄连对铜绿假单胞菌生物学特性的影响及机制[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2):83-86.
- [49] 王平, 夏飞, 贺立群, 等. 黄连提取物及小檗碱对铜绿假单胞菌密度感应系统的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2015, 44(6):686-690.
- [50] 钟祥, 李应东. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(3):185-186.
- [51] 贾子中. 黄连素对烧伤创面铜绿假单胞菌生物膜干预试验及自制中药临床应用观察[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2015.
- [52] 施高翔, 邵菁, 汪天明, 等. 黄芩及其有效成分抗菌作用新进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19):3713-3718.
- [53] 田芳. 黄芩水煎液及联合硫酸庆大霉素对铜绿假单胞菌生物膜的体外影响[J]. 药物与人, 2014, 27(7):72.
- [54] 谢林利, 周密, 陈勇川, 等. 黄芩苷、黄芩素抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的研究[J]. 中国药房, 2010, 21(39):3651-3653.
- [55] 菅凌燕, 何晓静, 于莹. 黄芩苷联合左氧氟沙星对铜绿假单胞菌生物膜的影响及相关机制[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(14):1097-1100.
- [56] 王贵年, 范莹, 王龙梓, 等. 黄芩苷对铜绿假单胞菌生物膜的影响[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(1):131-132.
- [57] 王贵年, 王龙梓. 黄芩苷联合头孢他啶对铜绿假单胞菌生物膜的影响[J]. 中国全科医学, 2011, 14(8):890-891.
- [58] 董必英, 陈一强, 孔晋亮, 等. 黄芩苷联合头孢哌酮/舒巴坦对铜绿假单胞菌生物膜破坏作用的体外研究[J]. 中国现代医药杂志, 2016, 18(1):1-4.