

鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌群感效应系统影响的研究

李 芳^{1,2,3}, 黄卫锋³, 段强军³, 吴大强³, 程惠娟^{3*}

1. 亳州市产品质量监督检验所, 安徽 亳州 236800

2. 国家中药材产品质量监督检验中心(安徽), 安徽 亳州 236800

3. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038

摘要: 目的 研究鱼腥草素钠(SH)对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)群感效应系统的影响,以期阐明SH抗PA的作用机制。方法 微量稀释法测定SH和阿奇霉素(AZM)对PA的最小抑菌浓度(MIC);紫外分光光度法测定SH对PA LasA蛋白酶活性和绿脓菌素生成的影响;平板法观察PA的形态;半定量PCR法和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测群感效应相关的基因*lasI*、*rhlI*、*lasR*、*rhlR*、*phzM*、*pqsA*、*pslA*、*lasA*、*lasB*、*toxA*表达量的变化。结果 SH和AZM对PA的MIC分别为512 μg/mL和64 μg/mL;紫外分光光度法结果显示SH能够抑制LasA蛋白酶的活性和绿脓菌素的合成;SH能够显著影响PA的形态;半定量PCR和qRT-PCR结果显示在SH作用下*lasI*、*rhlI*、*lasR*、*lasA*、*pslA*、*phzM*基因表达显著发生变化。结论 SH具有抗PA群感效应属性,通过抑制PA的群感效应系统发挥抗菌作用。

关键词: 鱼腥草素钠;铜绿假单胞菌;群感效应;LasA蛋白酶;绿脓菌素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)24-4388-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.24.016

Effect of sodium houttuifonate on quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*

LI Fang^{1,2,3}, HUANG Wei-feng³, DUAN Qiang-jun³, WU Da-qiang³, CHENG Hui-juan³

1. Bozhou Product Quality Supervision and Testing Institute, Bozhou 236800, China

2. National Chinese Medicinal Materials Products Quality Supervision and Inspection Center (Anhui), Bozhou 236800, China

3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of sodium houttuifonate (SH) against *Pseudomonas aeruginosa* (PA) targeting quorum sensing system. **Methods** The microdilution method was adopted to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of SH and azithromycin (AZM) for PA; The effects of SH on LasA proteases activity and pyocyanin production were detected by UV spectrophotometry; The semi-quantitative PCR and qRT-PCR were used to detect the expression changes of quorum sensing regulatory genes (*lasI*, *rhlI*, *lasR*, *rhlR*, *phzM*, *pqsA*, *pslA*, *lasA*, *lasB*, and *toxA*). **Results** The MIC of *P. aeruginosa* for SH and AZM was 512 μg/mL and 64 μg/mL, respectively; SH could significantly inhibit the activity of LasA proteases, and pyocyanin of bacteria; The morphology of *P. aeruginosa* was observed by agar plates; Furthermore, semi-quantitative PCR and qRT-PCR results indicated that the expression of *lasI*, *rhlI*, *lasR*, *lasA*, *pslA*, and *phzM* was significantly impact by SH. **Conclusion** The results of present study suggest that SH possesses anti-quorum sensing properties and plays a role against infection by anti-quorum sensing activity.

Key words: sodium houttuifonate; *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing; LasA proteases; pyocyanin

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种革兰阴性条件致病菌,广泛分布在自然界和医院环境中,且是医院内感染的重要病原菌之一^[1-2]。PA能够引起伤口、眼睛和肺部等一系列器官的感染,

尤其是非特异性免疫力较低的人群(烧伤患者、接受化疗癌症患者、囊性纤维化患者等)容易感染^[1,3-5]。PA对抗生素具有高度的多重耐药性,往往引起难以治愈的严重感染,对患者生命造成巨大

收稿日期: 2016-06-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173629);亳州市科技攻关项目(BK2015005);安徽中医药大学人才引进基金(2013RC003);安徽中医药大学青年科学研究基金(2014qn007)

作者简介: 李 芳,女,硕士研究生。Tel: (0558)5626795 E-mail: lfahuang@163.com

*通信作者 程惠娟,女,教授,硕士生导师。Tel: (0551)65169204 E-mail: chenghuijuan53@126.com

威胁^[2,6-7]。PA产生的多种致病物质(如绿脓菌素、LasA蛋白酶等)受到群感应系统调控。群感应系统是依赖信号分子密度识别的一种细胞之间相互交流的通讯机制,可以通过协调基因的表达决定细菌的多种行为^[8-10]。因此,抑制群感应系统就能够抑制微生物的致病性。

鱼腥草素钠(sodium houttuynonate, SH)是传统中药鱼腥草的有效成分鱼腥草素与亚硫酸氢钠的加成产物,具有抗炎消肿、抗化脓感染的功效,在临床上有着广泛的应用^[11-16]。以往的研究表明,SH对PA有显著的抑制作用^[17-22],但其作用机制仍然没有阐明,有待进一步研究。本实验主要观察SH对PA群感应系统的影响,以期阐明SH对PA抑制作用的机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 菌株

PA(ATCC27853)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)均购于中国食品药品检定研究院。

1.2 药品、试剂和仪器

SH(批号100247-199601)、阿奇霉素(AZM,批号130352-201007),均购于中国食品药品检定研究院。LB培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司);pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS,武汉博士德生物科技有限公司);Total RNA提取试剂、逆转录试剂盒(TIANGEN公司);PCR试剂盒(TaKaRa公司);实时荧光定量PCR(qRT-PCR)反应试剂(QIAGEN公司)。DPH-9162型恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);NRY-200型台式恒温摇床(上海南荣实验室设备有限公司);SpectraMax M2[®]多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];GL-20G-II高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);Eppendorf 5417R高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Tgradient PCR仪(德国Biometra公司);ABI 7000荧光定量PCR仪(美国生物应用系统公司);FluorChem M凝胶成像分析系统(美国Protein Simple公司)。

2 方法

2.1 菌液配制

将PA接种至液体LB培养基中,37℃摇床培养箱过夜培养,离心收集菌体,再用无菌PBS重悬并稀释至600 nm波长处吸光度(A_{600})值为0.05,备用^[17]。

2.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定

采用微量稀释法测定SH和AZM对PA的

MIC。两药的质量浓度梯度均为2 048、1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 。在96孔板中每个药物浓度设8个复孔,每孔分别加入100 μL 含药物的培养液和100 μL 菌液。混合后置于37℃下静置培养24 h,测定 A_{600} ,与对照组比较,抑制率达80%的最低药物质量浓度为MIC。实验重复3次。

2.3 绿脓菌素定量实验

将PA接种至6 mL含有SH(1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC、1 MIC)和AZM(1 MIC)的液体LB培养基试管中(接种量为1%),37℃摇床培养。不加药的培养基为阴性对照。培养24、72 h后,将菌液12 000 r/min离心1 min,量取上清液5 mL并加入3 mL氯仿充分混合振荡,4 500 r/min离心10 min。氯仿层转移到另一试管中,加入1 mL 0.2 mol/L HCl,液体由粉红色变为深红色,4 500 r/min离心10 min。测定其在520 nm处 A_{520} 。绿脓菌素的量以 $A_{520} \times 17.072^{[23]}$ 计算。每个浓度均设3个重复。

2.4 LasA蛋白酶活性的测定

PA接种及药物处理同“2.3”项,用不同药物浓度作用72 h的PA上清液和在沸水中煮沸10 min的金黄色葡萄球菌的菌体[用10 mmol/L Na_2HPO_4 (pH 4.5)重悬菌液至 A_{600} 为0.8]按照1:9(体积比)混匀,测定其在混合后0、5、10、20、30、45、60 min时的 A_{600} ,从而计算出每毫克LasA蛋白酶活性变化^[24-26]。每个浓度均设3个重复。

2.5 菌落形态学观察

将PA接种到LB液体培养基中,37℃摇床振荡培养至指数生长后期,取10 μL 菌液转接到含有40 $\mu\text{g/mL}$ 刚果红、15 $\mu\text{g/mL}$ 考马斯亮蓝和含不同浓度药物的胰蛋白胍固体培养基中。药物浓度及分组同“2.3”项,培养5 d后,观察菌落形态^[27-28]。

2.6 SH对PA群感应相关基因表达的影响

2.6.1 总RNA的提取 0.2 mL(7.5×10^5 CFU/mL)PA菌液转接到5 mL含有不同浓度药物的LB培养基中,37℃作用72 h后,10 000 r/min离心2 min,收集菌体,用无菌PBS冲洗3次后进行总RNA提取,调节RNA浓度,使菌体模板量一致。操作方法按照RNA提取试剂说明书进行。药物浓度及分组同“2.3”项,每个浓度均设3个重复。

2.6.2 引物的设计与合成 所需基因序列由NCBI基因库查得,Premier 5.0软件设计引物,委托上海生工生物工程有限公司合成,各引物序列见表1。

表 1 PA 群感效应相关基因引物序列

Table 1 Related gene primer sequences for quorum sensing system of *P. aeruginosa*

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
lasI	TTGCTCGCCGCACATC	GGCACGGATCATCATCTT
rhII	ATCCGCAAACCCGCTAC	GCAGGCTGGACCAGAATAT
lasR	CATCGTCGGCAACTACCC	GCGCACCAGTCAACACT
rhIR	TCGGAAATGGTGGTCTGG	CGCTCGAAGCTGGAGATG
phz	GACATGGTGCTGTTCTACGG	TGGAATGCCAGGTTGCTC
pqsA	TGGTGGTGCGTGAAGCC	GGAACCCGAGGTGTATTGC
pslA	TACCGGGCTGGATGA	CGGCAGCGAGTTGTAGTT
lasA	CTACAGCATCAACCCGAAAG	TAGCGCCGCGACAAC
lasB	GTTCTATCCGCTGGTGTCG	CGCTGCCCTTCTTGATG
toxA	GCGTGCTGCACTACTCCAT	AGCCAGTTCAGCGACCAA
rpoD	AGGCCGTGAGCAGGGAT	GGTGGTGCGACCGATGT

2.6.3 逆转录为 cDNA 根据逆转录试剂盒说明书进行。8 μ L RNA 变性 (42 $^{\circ}$ C, 3 min; 4 $^{\circ}$ C, 5 min), 加入 Mix 试剂 (10 $\times$ Fast RT Buffer 2 μ L, RT Enzyme Mix 1 μ L, RQ-RT Primer Mix 2 μ L, ddH₂O 5 μ L) 混合后按如下条件进行逆转录: 42 $^{\circ}$ C, 15 min; 95 $^{\circ}$ C, 3 min; 4 $^{\circ}$ C, 5 min。反应完成后将 cDNA 稀释 10 倍, 置于-80 $^{\circ}$ C 备用。

2.6.4 半定量 PCR 和 qRT-PCR 反应 半定量 PCR 反应采用 Takara 公司的 LA Taq 试剂盒。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 扩增定量程序 35 个循环: 变性 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 每个样品均设置 3 个重复, 实验重复 3 次。将合成得到的 DNA 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 然后成像。qRT-PCR 反应采用 QIAGEN 公司的 Realtime PCR Master Mix (SYBR[®] Green) 试剂盒。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 60 s; 扩增定量程序 40 个循环: 变性 95 $^{\circ}$ C, 40 s; 退火 56 $^{\circ}$ C, 15 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 熔解曲线: 60~95 $^{\circ}$ C, 加热速率为 0.1 $^{\circ}$ C/s。qRT-PCR 分别测定目的基因 lasI、rhII、lasR、rhIR、phzM、pqsA、pslA、lasA、lasB、toxA 及内参 rpoD 的 C_t 值, 实验平行重复 3 次, 实验结果取其平均值。基因表达水平用倍数变化来表示 (2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法) [29]。

2.7 统计学方法

SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 药物的 MIC

采用微量稀释法测得 SH 和 AZM 对 PA 的 MIC 分别为 512 μ g/mL 和 64 μ g/mL。

3.2 对绿脓菌素的影响

绿脓菌素是 PA 产生的一种重要的毒力因子, 其参与微生物的竞争、抑制植物病原体、对人体和宿主动物有着极大的伤害作用^[30]。绿脓菌素最重要的特点是呈现绿色或蓝绿色, 如图 1 所示在培养相同时间下, 对照组平板颜色最深为深绿色, 说明产生的绿脓菌素最多; 在培养 24 h 时 1 MIC SH 和 AZM 组颜色几乎差不多, 只有少量的绿色; 随着 SH 质量浓度的增加培养基颜色逐渐变浅, 说明绿脓菌素的合成受到了 SH 的抑制并呈现剂量依赖性特点。随着培养时间的延长绿脓菌素的量也不断的增加, 培养 72 h 的绿脓菌素合成量要显著高于 24 h, 但各用药组的绿脓菌素增加量要显著小于对照组, ($P < 0.05$)。结果表明 SH 能够有效抑制绿脓菌素的合成, 并呈现剂量依赖性。

3.3 对 LasA 蛋白酶活性的影响

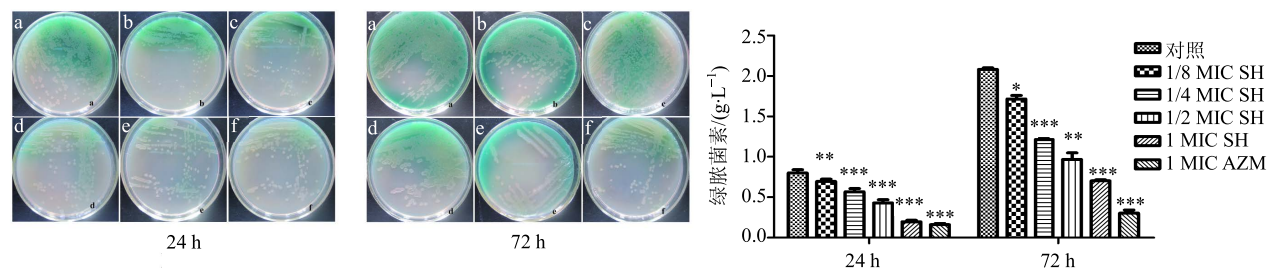
PA 除了能够大量合成绿脓菌素之外, 还能产生其他的毒力因子, 如 LasA 蛋白酶在致病中起着重要的作用, 尤其在急性感染过程中^[31]。采用紫外分光光度法测定 SH 对 LasA 蛋白酶活性的影响。由表 2 可见, 与对照组比较, 1/8 MIC SH、1/4 MIC SH、1/2 MIC SH 和 1 MIC SH 组 LasA 蛋白酶活性分别被抑制了 58.4%、80.5%、87.7% 和 90.3%, 并呈现剂量依赖性的特点。此外, 1 MIC AZM 组的 LasA 蛋白酶活性也受到了显著的抑制 (92.5%)。各药物组与对照组比较, 差异均非常显著 ($P < 0.001$)。结果表明 SH 对 LasA 蛋白酶活性有显著的抑制作用。

3.4 SH 对菌落形态的影响

如图 2 所示, 对照组形成了粉红色且有褶皱的菌落, AZM 组形成了紫色干燥的菌落, 各 SH 组的菌落形态和颜色也显著不同。随着 SH 药物质量浓度的增加菌落中间的褶皱部分不断的减少, 如 1 MIC SH 组菌落变得光滑无褶皱。

3.5 对 PA 群感效应相关基因表达的影响

图 3 为 SH 对 PA 群感效应相关基因表达影响的半定量 PCR 结果。进一步利用 qRT-PCR 技术检测了 SH 对群感效应相关基因表达的影响 (表 3)。与对照组比较, 1/8~1 MIC SH 组和 AZM 组 lasI 基因表达下调倍数分别为 2.500、7.407、8.130、9.090、4.910;



a-对照 b-1/8 MIC SH c-1/4 MIC SH d-1/2 MIC SH e-1 MIC SH f-1 MIC AZM, 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
a-control b-1/8 MIC SH c-1/4 MIC SH d-1/2 MIC SH e-1 MIC SH f-1 MIC AZM, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 1 SH 对 PA 合成绿脓菌素的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of SH on production of pyocyanin in *P. aeruginosa* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 SH 对 LasA 蛋白酶活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Inhibition of SH against LasA activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	LasA 活性/($A_{600} \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$)
对照	0.308 ± 0.084
1/8 MIC SH	$0.128 \pm 0.047^{***}$
1/4 MIC SH	$0.060 \pm 0.008^{***}$
1/2 MIC SH	$0.038 \pm 0.009^{***}$
1 MIC SH	$0.030 \pm 0.002^{***}$
1 MIC AZM	$0.023 \pm 0.005^{***}$

与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

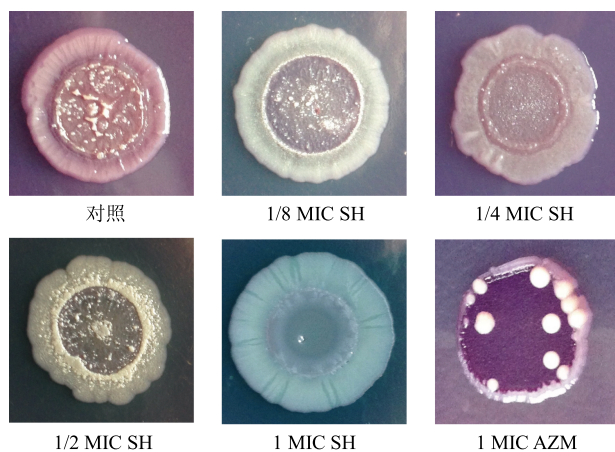


图 2 SH 对 PA 菌落形态的影响

Fig. 2 Effect of SH on colony morphology of *P. aeruginosa*

lasR 基因下调倍数分别为 1.037、3.610、4.219、8.403、8.772; lasA 基因下调倍数分别为 1.611、3.635、6.177、8.938、9.092; pslA 基因下调倍数分别为 1.171、1.764、4.926、10.282、2.137; phzM 基因下调倍数分别为 1.541、2.609、5.366、6.612、8.474。然而, SH 对 rhII 基因表达却呈现了上调作用, 对 rhIR、pqsA、lasB、toxA 基因无显著影响。

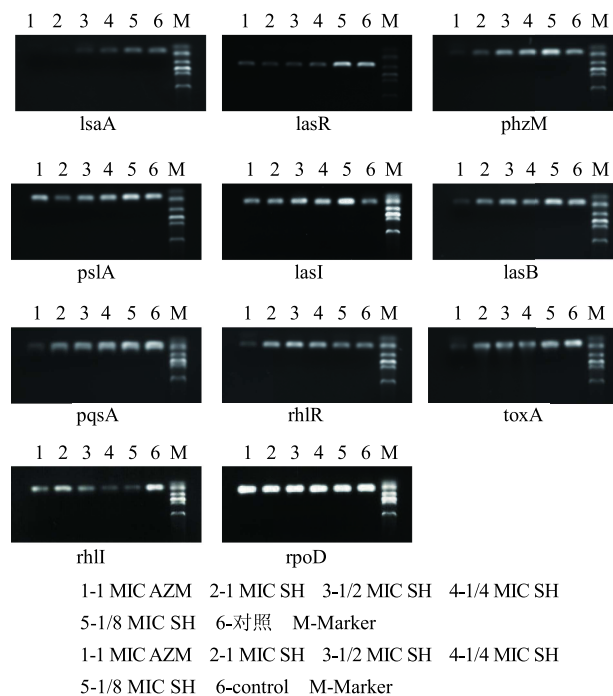


图 3 群感效应相关基因半定量 PCR 结果

Fig. 3 RT-PCR of quorum sensing and related genes

4 讨论

PA 是 ESKAPE 病原体 (*Enterococcus faecium*、*Staphylococcus aureus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa* 等) 之一, 因为它们能够逃避 (escape) 多种抗生素的治疗^[32]。PA 能够产生许多毒力因子形成多重耐药性, 给治疗其感染带来很大的困难^[33]。

群感效应是 PA 多重耐药性的重要调控系统^[34]。因此, 在抗假单胞菌领域中寻找群感效应抑制药物是热点项目之一^[35]。AZM 是一种临床上常用的大环内酯类抗生素, 具有良好的抑制 PA 作用, 其抗菌机制已被证明与抑制菌群传感调控系统, 与抑制毒力因子、生物膜形成、运动能力有关^[36]。因此,

表 3 SH 对 PA 群感应基因表达的影响
Table 3 Effect of SH on *P. aeruginosa* quorum sensing gene

组别	基因表达倍数变化				
	lasI	lasR	lasA	pslA	phzM
1/8 MIC SH	2.500±0.314 ↓	1.037±0.129 ↓	1.611±0.190 ↓	1.171±0.193 ↓	1.541±0.249 ↓
1/4 MIC SH	7.407±0.694 ↓	3.610±0.381 ↓	3.635±0.329 ↓	1.764±0.268 ↓	2.659±0.321 ↓
1/2 MIC SH	8.130±0.960 ↓	4.219±0.382 ↓	6.177±0.512 ↓	4.926±0.326 ↓	5.366±0.698 ↓
1 MIC SH	9.090±0.908 ↓	8.403±0.319 ↓	8.938±0.887 ↓	10.282±0.887 ↓	6.612±0.789 ↓
1 MIC AZM	4.910±0.505 ↓	8.772±0.481 ↓	9.092±0.712 ↓	2.137±0.174 ↓	8.474±1.024 ↓

组别	基因表达倍数变化				
	rhlI	rhlR	lasB	pqsA	toxA
1/8 MIC SH	1.085±0.090 ↑	—	—	—	—
1/4 MIC SH	1.240±0.152 ↑	—	—	—	—
1/2 MIC SH	2.736±0.515 ↑	—	—	—	—
1 MIC SH	5.720±0.645 ↑	—	—	—	—
1 MIC AZM	0.816±0.094 ↓	4.347±0.724 ↓	6.531±0.552 ↓	2.375±0.213 ↓	5.106±0.547 ↓

↓-基因表达下调; ↑-基因表达上调; —-基因表达未受影响

↓-gene expression was down-regulated; ↑-gene expression was up-regulated; —-gene expression was not affected.

在本实验中, 1 MIC 浓度的 AZM 处理被设置为阳性对照。

PA 中主要存在 2 种相互关联的群感应调控系统, 分别是 Las 和 Rhl^[37], 并且两者存在先后顺序, Las 在前并一定程度上调控 Rhl。Las 系统包括转录调节基因 lasR 和信号分子合成基因 lasI, Rhl 系统包括转录调节基因 rhlR 和信号分子合成基因 rhlI^[38-39]。Las 和 Rhl 属于 Lux 型家族信号系统, 负责信号分子的合成。lasR 是 PA Las 系统的关键调控因子。

根据以往的研究表明 SH 能够通过下调藻酸盐合成相关基因和鞭毛基因的表达, 抑制藻酸盐产生和运动能力, 进而干扰 PA 生物被膜的形成抑制其生长繁殖^[17-19]。本实验结果证明 SH 能够有效地抑制 PA 群感应控制的毒力因子(如绿脓菌素、LasA 蛋白酶等)的生成, 并能够显著影响 PA 菌落的形态并呈剂量依赖性。结果还发现 SH 能够特异地并呈剂量依赖性地抑制 Las 群感应系统的信号分子合成基因 lasI 和转录调节基因 lasR。半定量 PCR 和 qRT-PCR 结果表明受到 lasR 正向调控的 lasA 和 pslA 基因的表达在 SH 作用下显著下调并呈剂量依赖性的特点^[40-41], 而 lasA 和 pslA 基因分别调控 LasA 蛋白酶的合成和生物被膜的形成。绿脓菌素的合成基因 phzM 的表达也受到了 SH 的强烈抑制作用, 且 phzM 也受到 lasR 的正向调控。与此相反的是, SH 对 rhlI 基因的表达却呈现了上调作用, 对

rhlR、pqsA、lasB 和 toxA 基因没有影响, 说明 SH 具有特异地抑制 Las 系统及其相关基因的表达, 而 AZM 则是通过影响多种基因的转录从而影响 Las 和 Rhl 系统^[36]。菌落的形态和生物被膜有很大的关系, 生物被膜的形成又和多种毒力因子(如绿脓菌素等)、运动能力有着密切的联系, 而这些又受到群感应效应的调控^[42]。

综上所述, 本实验结果表明 SH 抗 PA 的机制可能是特异性地抑制 PA 群感应 LasA 系统, 从而影响了群感应调控的相关基因和蛋白的表达, 抑制了 PA 的生长繁殖和生物被膜的形成, 从而发挥了抗菌作用, 说明 SH 能够成为一个新的有潜力的抗群感应药物应用于临床。然而, SH 抗 PA 群感应的具体机制仍然不清楚, 需要进一步研究。本研究提示天然植物特别是中药可能成为抗群感应药物的重要来源。

参考文献

- [1] Migula W. *System der Bakterien* [M]. Jena: Germany Gustav Fischer, 1900.
- [2] Palleroni N J. The *Pseudomonas* story [J]. *Environ Microbiol*, 2011, 12(6): 1377-1383.
- [3] Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey G P, et al. Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: retrospective analysis of 245 episodes [J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160(4): 501-509.
- [4] Gang R K, Bang R L, Sanyal S C, et al. *Pseudomonas*

- aeruginosa* septicaemia in burns [J]. *Burns*, 1999, 25(7): 611-616.
- [5] Jones A M, Dodd M E, Morris J, *et al.* Clinical outcome for cystic fibrosis patients infected with transmissible *Pseudomonas aeruginosa*: an 8-year prospective study [J]. *Chest*, 2010, 137(6): 1405-1409.
- [6] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9): 623-633.
- [7] Nathan E H, Hongwei Y. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 133-144.
- [8] Fuqua C, Greenberg E P. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1(2): 183-189.
- [9] Whitehead N A, Barnard A M, Slater H, *et al.* Quorum-sensing in gram-negative bacteria [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, 25(4): 365-404.
- [10] Patzelt D, Wang H, Buchholz I, *et al.* You are what you talk: quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobacter shibae* [J]. *ISME J*, 2013, 7(12): 2274-2286.
- [11] Gao J P, Chen C X, Wu Q, *et al.* Effect of sodium houttuynate on inhibiting ventricular remodeling induced by abdominal aortic banding in rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(7): 693-701.
- [12] Wang D, Yu Q, Eikstadt P, *et al.* Studies on adjuvanticity of sodium houttuynate and its mechanism [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(10): 1411-1418.
- [13] Shi J, Zhang H, Zhang Z, *et al.* Synergistic effects of tetrandrine on the antifungal activity of topical ketoconazole cream in the treatment of dermatophytoses: A clinical trial [J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(7): 499-504.
- [14] Yoshino H, Imai N, Nabae K, *et al.* Thirteen-week oral toxicity study of dokudami extract (*Houttuynia Cordata* Thunb.) in F344/DuCrj rats [J]. *J Toxicol Pathol*, 2005, 18(4): 175-182.
- [15] Gao J P, Chen C X, Wang Y, *et al.* Effect of sodium houttuynate on myocardial hypertrophy in mice and rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(5): 677-683.
- [16] Ye X, Li X, Yuan L, *et al.* Interaction of houttuynate homologues with the cell membrane of gram-positive and gram-negative bacteria [J]. *Coll Surf A: Physicochem Eng Aspects*, 2007, 301(1/3): 412-418.
- [17] Shao J, Cheng H, Wang C, *et al.* Sodium houttuynate, a potential phytoanticipin derivative of antibacterial agent, inhibits bacterial attachment and pyocyanine secretion of *Pseudomonas aeruginosa* by attenuating flagella-mediated swimming motility [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(12): 2373-2378.
- [18] Shao J, Cheng H, Wang C, *et al.* A phytoanticipin derivative, sodium houttuynate, induces *in vitro* synergistic effects with levofloxacin against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 11242-11254.
- [19] 程惠娟, 张昌峰, 汪长中, 等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜藻酸盐合成的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 455-460.
- [20] 程惠娟, 汪长中, 卢文波, 等. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌黏附的清除作用及对生物被膜形成的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3297-3301.
- [21] 程惠娟, 汪长中, 胡跃龙. 鱼腥草素钠对铜绿假单胞菌生物被膜的清除作用 [J]. 中成药, 2012, 34(12): 2274-2277.
- [22] 李芳, 黄卫锋, 段强军, 等. 鱼腥草素钠联合 EDTA- Na_2 对生物被膜菌的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3585-3589.
- [23] Essar D W, Eberly L, Hadero A, *et al.* Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications [J]. *J Bacteriol*, 1990, 172(2): 884-900.
- [24] Kessler E, Safrin M, Olson J C, *et al.* Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(10): 7503-7508.
- [25] Diggle S P, Winzer K, Lazdunski A, *et al.* Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(10): 2576-2586.
- [26] Kong K F, Jayawardena S R, Indulkar S D, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of ampe and poxb β -lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4567-4575.
- [27] Friedman L, Kolter R. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(14): 4457-4465.
- [28] Romling U, Bian Z, Hammar M, *et al.* Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(3): 722-731.

- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] Lau G W, Hassett D J, Ran H, *et al.* The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(12): 599-606.
- [31] Kharazmi A. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* proteases with the cells of the immune system [J]. *Antibiot Chemother*, 1989, 42: 42-49.
- [32] Boucher H W, Talbot G H, Bradley J S, *et al.* Badbugs, nodrugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48(1): 1-12.
- [33] Zelenitsky S A, Harding G K, Sun S, *et al.* Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52(4): 668-674.
- [34] Van Delden C, Iglewski B H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. *Emerg Infect Dis*, 1998, 4(4): 551-560.
- [35] Fothergill J L, Winstanley C, James C E. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2012, 10(2): 219-235.
- [36] Imperi F, Leoni L, Visca P. Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5(2): 178.
- [37] Latifi A, Foglino M, Tanaka K, *et al.* A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 21(6): 1137-1146.
- [38] Passador L, Cook J M, Gambello M J, *et al.* Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication [J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1127-1130.
- [39] Bleves S, Soscia C, Nogueira-Orlandi P, *et al.* Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(11): 3898-3902.
- [40] 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.
- [41] Jimenez P N, Koch G, Thompson J A, *et al.* The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76(1): 46-65.
- [42] Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2004, 28(3): 261-289.