维拉帕米对铜绿假单胞菌群体感应抑制作用的体外研究

胡庭刚[1]，晏子俊[2,3]，伍晓萍[2]，吴贤丽[3]，夏靓婧[4]，陈 彤[2*]

（1. 攀枝花市第三人民医院，四川 攀枝花 617002；2. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室，云南 昆明 650500；3. 攀枝花市中心医院，四川 攀枝花 617067；4. 山东第一医科大学（山东省医学科学院）药物研究所，山东 济南 271016）

摘 要 考察维拉帕米对铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*，PA）群体感应（Quorum sensing，QS）的抑制作用。测定维拉帕米最小抑菌浓度（Minimal inhibit concentration，MIC）；构建培养环境，考察维拉帕米对 PA 生长的影响，绘制生长曲线；毒力因子表达实验中，分别考察维拉帕米对 PA 弹性蛋白酶表达、蛋白水解酶表达和绿脓毒素表达的影响。结果表明，维拉帕米 MIC_{50} 为 128 μg/mL，MIC_{90} 为 512 μg/mL，最低抑菌质量浓度范围为 128～512 μg/mL 时，具有较好抑菌活性；生长曲线表明，维拉帕米质量浓度为 16 μg/mL 时，开始抑制 PA 的生长，随着浓度的增加，抑制作用逐渐增大；当维拉帕米质量浓度为 512、256、128、64、32、16 μg/mL 时，明显抑制弹性蛋白酶表达（$P<0.01$），质量浓度为 8 μg/mL 时，对弹性蛋白酶有一定抑制作用（$P<0.05$），维拉帕米质量浓度为 512、256、128、64、32 μg/mL 时，明显抑制蛋白水解酶的活性和绿脓毒素的表达（$P<0.01$），当质量浓度为 16 μg/mL 时，对蛋白水解酶活性和绿脓毒素的表达有一定抑制作用（$P<0.05$）；维拉帕米对 QS 的抑制有浓度依赖。维拉帕米对 PA 的 QS 有明显抑制作用，体外可明显抑制 PA 生长，可作为抗菌增效的潜在开发药物。

关键词 维拉帕米；铜绿假单胞菌；群体感应；抑制作用；体外研究；潜在药物

中图分类号 Q939.93 **文献标识码** A **文章编号** 1005－7021(2022)04－0093－06

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2022.04.012

In Vitro Inhibition of Verapamil Quorum Sensing against *Pseudomonas aeruginosa*

HU Ting-gang[1], YAN Zi-jun[2,3], WU Xiao-ping[2], WU Xian-li[3], XIA Liang-jing[4], CHEN Tong[2*]

(1. *The Third People's Hosp. of Panzhihua*, *Panzhihua* 617002; 2. *Schl. of Pharm. Sci. & Yunnan Key Lab. of Pharm. for Nat. Products*, *Kunming Med. Uni.*, *Kunming* 650500; 3. *Panzhihua Cent. Hosp.*, *Panzhihua* 617067; 4. *Inst. of Med.*, *Shandong First Med. Uni. & Shandong Acad. of Med. Sci.*, *Jinan* 271016)

Abstract Inhibition of verapamil on quorum sensing (QS) against *Pseudomonas aeruginosa* (PA) was observed. The minimal inhibit concentration (MIC) of verapamil was determined to establish its culture environment, observed the effect of verapamil on PA growth, and drew the growth curve; The expressions of PA elastase, proteolytic enzymes, and pyocyanin were observed respectively during virulence factor experiment. The results showed that *In vitro* verapamil showed good antibacterial activity against PA when MIC_{50} of verapamil was within 128 μg/mL and MIC_{90} 512 μg/mL; the MIC_{Range} was 128-512 μg/mL, suggested that it had comparative good inhibition activity; and the growth curve suggested that when the verapamil was at 16 μg/mL it started to present inhibition against PA growth, as

基金项目：国家自然科学基金地区科学基金项目（81760698）；云南省科学技术厅地方高校联合专项-面上项目（202001BA070001-041）；第七批云南省高校工程研究中心立项建设项目（[2019]-57）；四川省科技厅面上项目（18YYJC1856）；攀枝花市指导性科技计划项目（2019ZD-S-8）

作者简介：胡庭刚 男，副主任药师。研究方向为药学微生物学、临床药学。E-mail：108922589@qq.com

晏子俊 男，主管药师，博士研究生，硕士生导师。研究方向为药学微生物学、药物新型给药系统。E-mail：swallowyzj@163.com

胡庭刚和晏子俊为并列第一作者

＊ 通讯作者。女，教授，博士生导师。研究方向为植物活性多糖的研究开发及新型药物给药系统。E-mail：chentongdoc@163.com

收稿日期：2021-12-14

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the increment of the concentration, the inhibition was gradually increased; when the concentration of verapamil was at 512 μg/mL, 256 μg/mL, 128 μg/mL, 64 μg/mL, 32 μg/mL, and 16 μg/mL, the activity of elastase was significantly inhibited ($P<0.01$), and elastase had certain inhibition at 8 μg/mL ($P<0.05$). The concentration of verapamil was at 512 μg/mL, 256 μg/mL, 128 μg/mL, 64 μg/mL, and 32 μg/mL significantly inhibited the expression of pyotoxin and proteolytic enzymes ($P<0.01$), and it also had certain inhibition at 16 μg/mL ($P<0.05$). Inhibition of verapamil had concentration dependence against PA. Verapamil had significant effect on QS of PA growth *in vitro*, and can be developed as potential synergist medicine of antibacterial one.

Keywords verapamil; *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing (QS); inhibition; *in vitro* study; potential medicine

细菌耐药性已成为全球面临的问题,现有抗生素已无法满足临床治疗需求[1]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PA)是医院内重要的条件致病菌,可产生毒力因子及生物被膜而引起各种感染,现已被认作是医院的主要病原菌。2021年上半年中国 CHINET 耐药菌种分布结果显示,PA 占临床总分离率 7.47%,排在第 5 位。PA 具有超强耐药性[2-3],其耐药机制包括群体感应(Quorum sensing,QS)、产生修饰酶或灭活酶、主动外排、外膜孔蛋白缺失或通透性降低等[5-7],多重耐药 PA 的出现,使得临床治疗变得越来越棘手,严重威胁人类健康[4]。因此,探究抗菌新策略对治疗 PA 感染刻不容缓。QS 是细菌细胞密度依赖的一种基因表达现象[8],有受体蛋白、合成酶蛋白参与,合成酶蛋白产生 N-酰基高丝氨酸内酯(AHL)作为自体诱导物(AIs),当 AIs 密度达阈值时可与受体蛋白结合,启动相关基因转录[9],激活特定信号分子调控特定基因表达,促进细胞适应外界环境,协调细菌群体产生耐药性、免疫逃逸、生物被膜、毒力因子等,发挥致病作用[10]。Reuter 等[11]研究证实 PA 的 QS 与其致病力密切相关。王帅涛等[12]研究表明 PA 生物被膜受 QS 调控。Soukarieh 等[13]研究表明 PA 的 QS 与耐药性相关。因此,细菌 QS 可作为药物作用靶点,研发 QS 抑制剂从而发挥抗菌增效作用[14-16]。诸多学者一直致力于 QS 抑制剂的研发。现有 QS 抑制剂根据来源分为天然、合成化合物及临床已有药物,其中天然化合物有人参[17]、丁香油[18]等植物来源的提取化合物,合成化合物有呋喃酮类[19]、低分子量海藻酸盐低聚物[20]等,临床已有药物有多尼培南[21]、氯硝柳胺[22]等。研究发现,QS 抑制剂与传统抗菌药物不同,作用机制特殊,较少出现耐药,具有增效作用,有效缓解 PA 耐药[23-24]。维拉帕米作为一种钙离子拮抗药物,临床应用广泛,尝试将其开发作为 QS 抑制剂的潜在药物,可充分发挥老药新用的优势,减少未知风险的发生,对发现新的 QS 抑制剂有重要意义。因此,本研究首次以钙离子拮抗药中的维拉帕米作为 QS 抑制剂,对维拉帕米抑制 PA 的 QS 进行体外研究,以明确维拉帕米是否具有抗菌增效作用及其可能机制,为研发抗菌增效药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 铜绿假单胞菌(*Pseudomona aeruginosa*,PA)标准菌株(ATCC27853)购自四川省临床检验中心,由攀枝花市中心医院中心实验室保存。

1.1.2 培养基 ①LB 肉汤培养基(生工生物工程);②M-H 肉汤培养基(郑州安图生物)。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 维拉帕米(中国药品检验总所),纯度 >99.9%;脱脂奶粉(英国 oxoid);弹性酶-刚果红(ECR)(美国 Sigma-Aldrich);琼脂粉(英国 oxoid);DMSO(科隆化学品);其他试剂均为西亚试剂。细菌多点接种仪(MIT-P,日本 SAKUMA);比浊仪(DensiCHEK,法国生物梅里埃);酶标仪(SUNRISE,九州通医药集团);生化培养箱(HPS-400B,北京东联哈尔);万分之一分析天平(ESJ200-4,沈阳龙腾电子);电热鼓风干燥箱(101-4AS,北京市永光明医疗);超声波清洗机(SB25-12DT,宁波新芝生物科技)。

1.2 方法

1.2.1 体外药敏试验 参考谭丽等[25]方法测定最小抑制浓度(Minimal inhibit concentration,

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

MIC)。按照 CLSI M100-S21[26] 的要求,将 PA 转种平板,分离纯化,挑取过夜菌落接种,调整浊度至 0.5 麦氏浊度单位(1×10^8 cfu/mL),采用 M-H 肉汤将其稀释为 1×10^6 cfu/mL 菌液。选用倍比稀释法制备维拉帕米溶液,用 M-H 肉汤将其稀释至质量浓度分别为 0.5、1、2、4、8、16、32、64、128、256、512 μg/mL。将稀释的维拉帕米药液与 1×10^6 cfu/mL 的 PA 菌液按同等体积混匀,于 96 孔板中各加入 100 μL 上述混合液,作为实验孔。取 M-H 肉汤每孔 100 μL,各浓度组分别设置 3 个平行孔做为对照。将加样后的微孔板于振荡器混匀,生化培养箱 35 ℃培养 48 h。600 nm 处酶标仪测各孔吸光度值 A_{600}。PA 未生长的孔含有的药物浓度即为 MIC。

1.2.2　生长曲线的绘制　调整菌液浊度至 0.5 麦氏浊度单位,再用 M-H 肉汤稀释得 5×10^4 cfu/mL 菌液。倍比稀释法制备维拉帕米溶液,用 M-H 肉汤稀释质量浓度至 4、8、16、32、64、128、256、512 μg/mL。参照 1.2.1 中实验组设置方法,于加样后 0、1.5、3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h 测定 A_{600}。以时间(h)为横坐标,A_{600} 为纵坐标,绘制维拉帕米作用 PA 的 24 h 生长曲线。

1.2.3　维拉帕米对 PA 毒力因子表达的影响实验　①维拉帕米菌液的制备:调整菌液浊度至 0.5 麦氏浊度单位,再用 M-H 肉汤稀释得到 5×10^4 cfu/mL 的菌液。倍比稀释法制备维拉帕米溶液,用 M-H 肉汤稀释质量浓度至 8、16、32、64、128、256、512 μg/mL。参照 1.2.1 中实验组设置方法,制得含维拉帕米质量浓度分别为 4、8、16、32、64、128、256、512 μg/mL 的菌液,有氧条件下培养 24 h,测 A_{600}。②维拉帕米对 PA 弹性蛋白酶表达的影响:取适量①中的含药菌液,12 000 r/min、4 ℃离心 8 min。移液枪取上清液经 0.22 μm 有机滤膜过滤,将滤液与 ECR 缓冲液按同体积比例混匀,于垂直混合仪 15 r/min、37 ℃反应 16 h,加入适量 EDTA (120 mmol/L) 溶液,置于冰上 10 min,终止反应。再于 2 000 r/min、4 ℃离心 8 min,取 150 μL 上清液加入 96 孔板,酶标仪测定 A_{495}。设置菌液对照组和 0.5% DMSO 对照组,各浓度组设置 3 个平行孔。A_{495}/A_{600} 比值表示弹性蛋白酶活性。③维拉帕米对 PA 蛋白水解酶表达的影响:取适量①中的含药菌液,经 0.22 μm 有机滤膜过滤,取滤液 150 μL 置于含小孔的脱脂牛奶琼脂平板,37 ℃反应 24 h。设置菌液对照组和 0.5% DMSO 对照组,各浓度组设置 3 个平行孔。反应 24 h 后,小孔出现透明圈,测定其直径 L,L/A_{600} 比值即为蛋白水解酶活性。④维拉帕米对 PA 绿脓毒素表达的影响:取适量①中的含药菌液,8 000 r/min、25 ℃离心 10 min 后,移液枪取 4 mL 上清液,加入 3 mL $CHCl_3$,混匀,放置 5 min,于 8 000 r/min、25 ℃离心 5 min,取 2.5 mL 的 $CHCl_3$ 层,加入一定量 HCl,混匀,放置 5 min,再于 8 000 r/min、25 ℃离心 5 min 后,取 HCl 层测 A_{520}。设置菌液对照组和 0.5% DMSO 对照组,各浓度组设置 3 个平行孔。A_{520}/A_{600} 比值表示菌液中绿脓毒素的含量。

1.2.4　统计学分析　采用统计软件 SPSS 24.0 进行数据统计分析。数据需进行正态检验,用均数 ± 标准差($\bar{\chi} \pm s$)表示正态分析变量;用中位数表示非正态分布变量。多组比较采用方差分析,如总体均数不全相等,则采用 Dunnett-t 检验两两比较分析;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　维拉帕米体外抗 PA 的最低抑菌浓度

对照组(0.5% DMSO、M-H 肉汤)中 PA 生长良好,表明无抗菌作用。维拉帕米抗 PA 的 MIC_{90} 为 512 μg/mL,见表 1。

表 1　维拉帕米体外抗 PA 的最低抑菌浓度(n = 3)

Table 1　The results of verapamil against PA activity(n = 3)

菌株	维拉帕米体外抗 PA 的最低抑菌浓度/(μg · mL^{-1})		
	MIC_{90}	MIC_{50}	MIC_{Range}
PA	512	128	128 ~ 512

注:MIC_{90} 表示药物抑制 90% 菌株生长的最小浓度;MIC_{50} 表示药物抑制 50% 菌株生长的最小浓度;MIC_{Range} 表示药物最小抑菌浓度范围

2.2　维拉帕米体外影响 PA 的生长曲线

由图 1 可知,对照组(0.5% DMSO)对 PA 的生长无影响。加样 3 h 后,当维拉帕米质量浓度为 512 μg/mL 时,明显抑制 PA 生长($P < 0.01$);加样 4 h 后,当维拉帕米质量浓度为 256、128、64

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

μg/mL 时,对 PA 生长的抑制作用明显($P<0.01$);加样 8 h 后,当维拉帕米质量浓度为 32、16 μg/mL 时,对 PA 生长中期具有一定的抑制作用($P<0.05$)。当维拉帕米质量浓度为 8、4 μg/mL 时,对 PA 的生长无明显抑制作用。

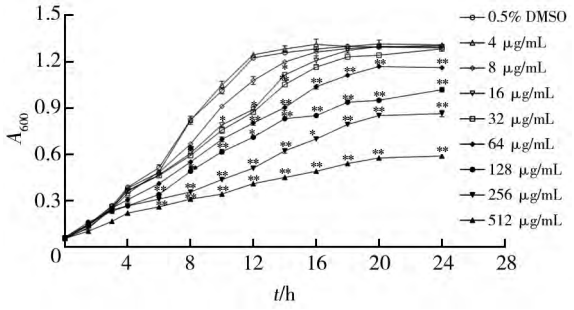

图 1 维拉帕米体外影响 PA 的生长曲线($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

Fig. 1 The growth curve of verapamil on PA ($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

与对照组相比,$*P<0.05$;$**P<0.01$,下图同

VS. control group, $*P<0.05$; $**P<0.01$, the same below

2.3 维拉帕米对 PA 毒力因子表达的影响

2.3.1 维拉帕米对 PA 弹性蛋白酶表达的影响 由图 2 可知,两组对照组对 PA 的弹性蛋白酶均无影响。与菌液对照组相比,维拉帕米质量浓度为 256、128、64、32、16 μg/mL 时,可明显抑制弹性蛋白酶的表达($P<0.01$),8 μg/mL 时也可抑制弹性蛋白酶的表达($P<0.05$),且表现出浓度依赖性。维拉帕米质量浓度为 4 μg/mL 时对弹性蛋白酶无抑制作用。

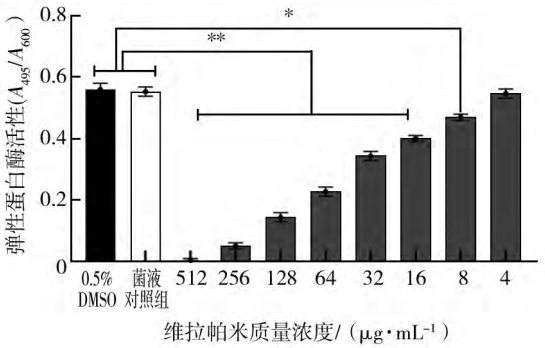

图 2 维拉帕米对 PA 弹性蛋白酶的影响($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

Fig. 2 Effect of verapamil on expression of PA elastase ($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

2.3.2 维拉帕米对 PA 蛋白水解酶表达的影响 由图 3 可知,两组对照组对 PA 的蛋白水解酶均无影响。与菌液对照组相比,维拉帕米质量浓度为 512、256、128、64、32 μg/mL 时,明显抑制蛋白水解酶的活性($P<0.01$),质量浓度为 16 μg/mL 时,对蛋白水解酶也有抑制作用($P<0.05$),抑制作用有浓度依赖。维拉帕米质量浓度为 8、4 μg/mL 时对蛋白水解酶活性无抑制作用。

2.3.3 维拉帕米对 PA 绿脓毒素表达的影响 由图 4 可知,两组对照组对 PA 绿脓毒素的表达无明显影响。与菌液对照组相比,维拉帕米质量浓度为 512、256、128、64、32 μg/mL 时,对绿脓毒素有明显抑制($P<0.01$),浓度为 16 μg/mL 时,也有一定的抑制作用($P<0.05$),抑制作用有浓度依赖。维拉帕米质量浓度为 8、4 μg/mL 时对绿脓毒素无抑制作用。

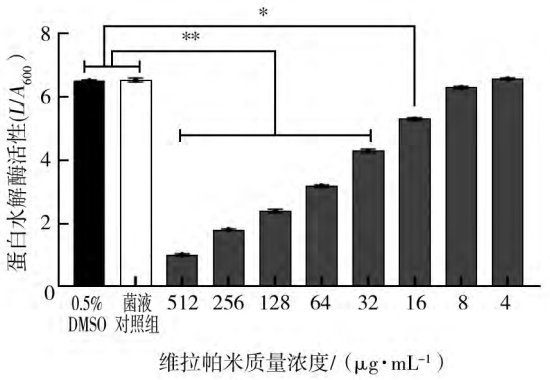

图 3 维拉帕米对 PA 蛋白水解酶表达的影响($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

Fig. 3 Effect of verapamil on the expression of PA proteolytic enzymes ($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

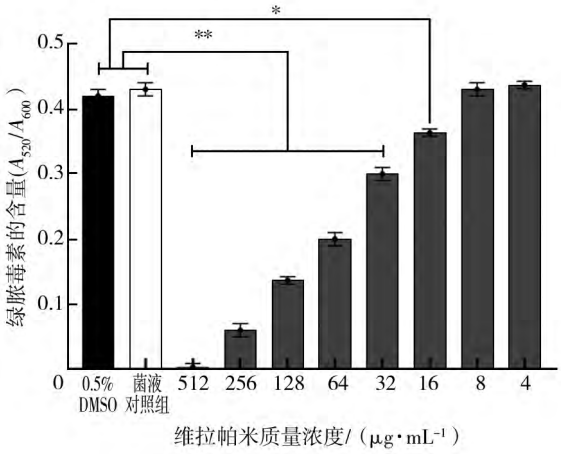

图 4 维拉帕米对 PA 绿脓毒素表达的影响($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

Fig. 4 Effect of verapamil on expression of PA green pyotoxin ($\bar{\chi}\pm s$, n=3)

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨　论

研究细菌毒力因子表达解决药物耐药性,已逐渐成为当前抗感染治疗研究领域的热点[1,27-28]。PA 耐药机制复杂,具有多系统参与、耐药率高的特点,临床培养常为多重耐药菌,难治愈[29-31]。现有文献表明抗 PA 感染包括干扰或影响毒力因子表达、破坏细菌黏附、抑制铁代谢过程、干扰药物外排泵、调节宿主免疫、影响生物被膜形成及抑制细菌 QS 系统等方法[32-33],而抑制 PA 的 QS 可有效抑制其毒力因子表达[34-35]。

维拉帕米是罂粟碱衍生物,为苯烷胺类钙离子拮抗药,常用于心绞痛、心律失常及原发性高血压等治疗,本身无抗菌活性,但其对 PA 可能具备抑制细菌 QS 的作用。在本研究测定维拉帕米 MIC 实验中,当维拉帕米质量浓度为 128 μg/mL 时可抑制 50% 菌株生长,MIC_{90}为 512 μg/mL,最低抑菌浓度范围为 128 ~ 512 μg/mL。与地尔硫卓(MIC_{90} >512 μg/mL[10])相比,维拉帕米抗菌活性稍好;与硝苯地平(MIC_{90}为 256 μg/mL[4])相比,维拉帕米抗菌活性稍差。维拉帕米体外对 PA 生长曲线的影响表明,维拉帕米质量浓度为 16 μg/mL 时,开始表现出对 PA 生长的抑制,随着浓度增加,抑制作用逐渐增大。上述结果表明维拉帕米对 PA 有抑制作用,初步明确维拉帕米可能具有抑制 QS 的作用。

研究证实 PA 毒力因子的表达与 QS 密切相关[10,36]。QS 参与 PA 特定基因的调控,可影响 PA 的弹性蛋白酶、蛋白水解酶、绿脓毒素表达[37]。本研究中,当维拉帕米质量浓度为 8 μg/mL 时,开始表现出抑制弹性蛋白酶的活性,而 16 μg/mL 时明显抑制。当维拉帕米质量浓度为 16 μg/mL 时,开始表现出抑制蛋白水解酶的活性和绿脓毒素的表达,而 32 μg/mL 时,明显抑制。可能原因为 QS 由特异性受体和 AIs 组成,而 PA 的膜蛋白具备类似真核生物 ESCRT-III 蛋白的钙信号转导系统,该系统可根据外界环境刺激调节胞内外钙离子浓度,胞内钙离子可与 AIs 的特异受体结合,特异受体与 AIs 结合位点暴露,从而增加毒力因子表达[38-39]。研究还表明钙离子参与细菌自身生理活性调控,一定程度上可增强细菌运动迁移能力,改变细菌鞭毛运动方向,影响生物被膜形成[40-41]。因此,虽未发现低浓度维拉帕米具有抑制 PA 生长的作用,但其可能影响钙离子分布,从而一定程度上抑制 QS,影响毒力因子表达和生物被膜形成。上述研究表明,维拉帕米可影响弹性蛋白酶、蛋白水解酶、绿脓毒素的表达,进一步明确维拉帕米具有抑制 QS 的作用。

本研究通过体外研究明确了维拉帕米具有抑制 QS 的作用,而维拉帕米与抗菌药物联用是否能发挥协同抗菌作用,是否增加细菌对抗菌药物敏感性等问题有待进一步研究,并为研发新型抗菌制剂提供参考。

参考文献:

[1] 付如意, 褚以文, 李静, 等. D-环丝氨酸抑制铜绿假单胞菌群体感应活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(6): 545-551.

[2] 游义琴, 王晶晶, 王雪梅, 等. 2018 年度某三甲综合医院常见多重耐药菌的科室分布特点及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(5): 548-553.

[3] Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Drug Discovery Today, 2019, 24(1): 350-359.

[4] 晏子俊, 吴贤丽, 颜晓燕, 等. 硝苯地平调控铜绿假单胞菌群体感应系统的初步研究[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2045-2048.

[5] Horcajada JP, Montero M, Oliver A, et al. Epidemiology and treatment of multidrug resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 32(4): e00031-19.

[6] 杨敏, 顾雯, 杨柏荣, 等. 中药通过调节细菌群体感应系统改善人体健康研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1297-1303.

[7] 司忠花, 董玉俊, 李玉. 基层医院铜绿假单胞菌耐药性分析及耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2017(1):43-46.

[8] 于福浩,娄在祥,王洪新,等. 咖啡酸对铜绿假单胞菌群体感应的抑制及毒力因子降低的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 36(6): 56-63.

[9] Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound[J]. Microbiology (Reading), 2002, 148(Pt 1): 87-102.

[10] 刘颖, 牛培广, 史道华. 地尔硫䓬抑制铜绿假单胞菌群体感应的研究[J]. 海峡药学, 2018, 30(2): 11-13.

[11] Reuter K, Steinbach A, Helms V. Interfering with bacterial quorum sensing[J]. Perspectives in Medicinal Chemistry, 2016, 8(8):1-15.

[12] 王帅涛,高倩倩,成娟丽, 等. 铜绿假单胞菌生物被膜组成及其受群体感应系统和 c-di-GMP 调控的研究进展[J]. 微

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

生物学报, 2021, 61(5): 1106-1122.
[13] Soukarieh F, Williams P, Stocks MJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems as drug discovery targets: Current position and future perspectives[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 61(23): 10385-10402.
[14] Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance[J]. Lancet, 2016, 387(10014): 176-187.
[15] Hassan R, Shaaban MI, Abdel Bar FM, et al. Quorum sensing inhibiting activity of *Streptomyces coelicoflavus* isolated from soil [J]. Frontiers in Microbiology, 2016(7): 659.
[16] 王珏鑫, 余广超. 铜绿假单胞菌群体感应系统研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(7): 858-861.
[17] Packiavathy IA, Sasikumar P, Pandian SK, et al. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013, 97(23): 10177-10187.
[18] Aboushleib HM, Omar HM, Abozahra R, et al. Correlation of quorum sensing and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt [J]. Journal of infection In Developing Countries, 2015, 9(10): 1091-1099.
[19] Kim SG, Yoon YH, Choi JW, et al. Effect of furanone on experimentally induced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation: *in vitro* study[J]. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 22012, 76(11): 1575-1578.
[20] Jack AA, Khan S, Powell LC, et al. Alginate oligosaccharide-induced modification of the iasI-iasR and rhlI-rhlR quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2018, 62(5): e02318-17.
[21] 陈向东, 王素霞, 汪辉, 等. 多尼培南对铜绿假单胞菌生物被膜形成和群体感应系统的影响[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(3): 193-197.
[22] 饶媚,张素平,史道华. 铜绿假单胞菌群体感应系统抗菌增效机制研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2019, 19(5): 578-583.
[23] Gerdt JP, Blackwell HE. Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria [J]. ACS Chemical Biology, 2014, 9(10): 2291-2299.
[24] Imperi F, Massai F, Ramachandran Pillai C, et al. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing[J]. Antimicrobial Agents & Chemothery, 2013, 57(2):996-1005.
[25] 谭丽, 程优, 柏乐, 等. 抗菌肽 lycosin-I 对铜绿假单胞菌临床分离株的体外抗菌活性分析[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(4): 253-258.
[26] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth informational supplement, M100-S24 [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014, 34(1).
[27] Wannigama DL, Hurst C, Hongsing P, et al. A rapid and simple method for routine determination of antibiotic sensitivity to biofilm populations of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Annals of clinical Microbiology & Antimicrobials, 2020, 19(1): 8.
[28] 宋伟男,吕建华,贾传文,等. 桦褐孔菌发酵鸭跖草提取物对铜绿假单胞菌群体感应系统的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1910-1919.
[29] Gholami M, Zeighami H, Bikas R, et al. Inhibitory activity of metal-curcumin complexes on quorum sensing related virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 111.
[30] 吴柳, 罗娟, 杨竹兰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PA-27-1 的分离及其特性研究[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(4): 315-322.
[31] 王雅蓉, 朱明星, 张帆, 等. c-di-GMP 的磷酸二酯酶 PA4781 在抗菌肽 Merecidin 抑制铜绿假单胞菌生物被膜中的作用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 868-879.
[32] 黄梅, 奚海燕, 王颖, 等. 耐喹诺酮的铜绿假单胞菌药物外排泵研究[J]. 东南国防医药, 2015, 17(6): 583-586.
[33] Knezevic P, Curcin S, Aleksic V, et al. Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Research in Microbiology, 2013, 164(1): 55-60.
[34] Chen X, Zhang L, Zhang M, et al. Quorum sensing inhibitors: a patent review (2014-2018)[J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2018, 28(12): 849-865.
[35] Hegazy WAH, Khayat MT, Ibrahim TS, et al. Repurposing anti-diabetic drugs to cripple quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1285.
[36] Kalaiarasan E, Thirumalaswamy K, Harish BN, et al. Inhibition of quorum sensing controlled biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quorum-sensing inhibitors[J]. Microbial Pathogenesis, 2017(111): 99-107.
[37] Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation[J]. Nature, 2002, 416 (6882): 740-743.
[38] Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, et al. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(5): 2752-2757.
[39] Junglas B, Huber ST, Heidler T, et al. PspA adopts an ESCRT-III-like fold and remodels bacterial membranes[J]. Cell, 2021, 184(14): 3674-3688. e18.
[40] Park SJ, Liu HB, Park S, et al. Modulation of QscR, a quorum sensing receptor of *Pseudomonas aeruginosa*, by truncation of a signal binding domain [J]. Research in Microbiology, 2013, 164(5): 375-381.
[41] Liu HB, Lee JH, Kim JS, et al. Inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator, QscR[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 106(1): 119-126.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net