

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.001

· 基础研究 ·

一株奇异变形杆菌对铜绿假单胞菌多细胞行为的抑制作用*

余时琛^{1,2} 朱小山² 周进² 蔡中华^{2Δ}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学深圳研究生院海洋科学与技术学部 广东 深圳 518055)

摘要 目的: 抗生素耐药性成为了全球性的健康问题。研究发现病原菌的多细胞行为在抗生素的耐药性中起着至关重要的作用(尤其是生物膜),因而通过抑制多细胞行为而控制耐药性成为当务之急。本文以奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)为研究对象,考察它的发酵滤液对一种机会致病菌——铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)多细胞行为的作用,以期得到一株多细胞行为抑制菌;在不影响 *P. aeruginosa* 生长的前提下,抑制生物膜形成、EPS 产生以及定向丛集运动,解除保护,减缓扩散,为降低 *P. aeruginosa* 耐药性,增强抗生素作用效果提供可能。**方法:** 采用结晶紫生物膜测定法、蒽酮-硫酸法、平板检测法,探究 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 生物膜、胞外多聚物、定向丛集运动和生长的影响。**结果:** *P. mirabilis* 发酵滤液能显著抑制 *P. aeruginosa* 生物膜量,在体积百分比浓度为 1% 时,抑制率可达 60.9%。该菌的发酵滤液还能阻碍 *P. aeruginosa* 的定向丛集运动,减弱它的吸附和扩散运动;同时,也减少了 *P. aeruginosa* 胞外多聚物的产量,在滤液体积百分比浓度为 1% 时,抑制率达到 45.9%。更重要的是,固体平板实验证明该发酵滤液对 *P. aeruginosa* 的生长没有影响。**结论:** *P. mirabilis* 在不影响病原菌生长的前提下,对病原菌的多细胞行为有一定的控制作用。其发酵滤液中存在着抑制微生物膜、定向丛集运动等的成分,在治疗细菌感染性疾病和降低抗生素耐药性方面有潜在应用价值。

关键词: 生物膜; 定向丛集运动; 胞外多聚物; 奇异变形杆菌

中图分类号: Q73, Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)06-1001-04

Inhibition of Multicellular Behaviors of *Pseudomonas aeruginosa* by a *Proteus Mirabilis**

YU Shi-chen^{1,2}, ZHU Xiao-shan², ZHOU Jin², CAI Zhong-hua^{2Δ}

(1 School of life science, Tsinghua University, Beijing, 100084, China; 2 Division of Ocean Science and Technology, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China)

ABSTRACT Objective: Antibiotic resistance of pathogens has become a global healthcare problem. Many studies have demonstrated that multicellular behaviors are important in the antibiotic resistance of the encased bacteria. Thus it is urgent to control antibiotic resistance by inhibiting the multicellular behaviors. The filtrate of cultured *Proteus mirabilis* isolated from a freshwater environment, to inhibit the multicellular behaviors (biofilm formation, swarming motility) of an opportunity pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* were investigated in this study. We expect to acquire a multicellular behavior inhibitor, which will decrease the biofilm formation, EPS production and swarming motility of *P. aeruginosa*. With the loss of protection and retardation of diffusion, it is possible to control antibiotic resistance and enhance the effect of antibiotic to *P. aeruginosa*. **Methods:** According to crystal violet (CV) method, anthrone-H₂SO₄ assay, plates assay, the effects of filtrate of cultured *Proteus mirabilis* on biofilm, swarming, extracellular polymeric substances were determined. **Results:** The cultured *P. mirabilis* filtrate could effectively inhibit the formation of biofilms of *P. aeruginosa* with different concentrations (0.1%, 0.5 %, 1%), and at the concentration of 1%, the inhibition rate reached 60.9%. The filtrate could also suppress the swarming motility of *P. aeruginosa*, and the dispersal of *P. aeruginosa* slew down. Moreover, the production of extracellular polymeric substances were significantly decreased, and the highest inhibition rate in this study was 45.9% at the concentration of 1% . Furthermore, the addition of *P. mirabilis* filtrate did not influence the growth of *P. aeruginosa*. **Conclusion:** *P. mirabilis* can control the multicellular behaviors of *P. aeruginosa* without inhibiting its growth, and may act as a biofilm inhibitor with potential value in infectious disease treatment and bacterial antibiotic resistance.

Key words: Biofilm; Swarming motility; EPS; *Proteus mirabilis*

Chinese Library Classification (CLC): Q73, Q936 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1001-04

* 基金项目: 国家重点基础发展规划项目(973 项目)(2012CB426504)

作者简介: 余时琛(1988-), 女, 硕士, 主要研究方向: 微生物被膜, E-mail: ysc2359@gmail.com

Δ 通讯作者: 蔡中华, 电话: 0755-26036108, E-mail: caizh@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2013-07-11 接受日期: 2013-07-30)

前言

近些年,随着抗生素的滥用,细菌产生了越来越强的耐药性。抗生素的杀菌能力逐渐下降,细菌感染性疾病,尤其是慢性疾病有越来越严重的趋势。研究指出,这些致病菌不是独立生活地,它们经常聚集在一起,产生多细胞行为,以群体为单位生存^[1]。生物膜和定向丛集运动就是两种非常重要的多细胞行为^[2]。这种行为能够在恶劣环境下,增强细菌存活的机会^[3]。其中,生物膜越来越受到人们的广泛关注。生物膜主要是指,细菌吸附于物体表面,分泌胞外多聚物(EPS),将细菌封闭其中,各菌落间相互缠绕粘连后,形成的膜样物^[4]。65%的病原菌都以固着的表面缔合群落,即生物膜形式生长^[5-9]。这种以生物膜形式生长的细菌引起的感染已经产生了严重问题,因为它能抵抗宿主免疫系统的应答,且相较于悬浮的细菌,它更加耐受于抗生素(高达1000倍)和杀菌剂^[7,8]。更重要的是,病原菌在医学植入物上定植后形成难以消灭的生物膜的倾向日益频繁^[9]。研究也发现细菌的定向丛集运动也与它的致病性相关,但是具体的机制还不了解^[10]。定向丛集运动存在于各种细菌中,它是一种运动属性,主要是有三个阶段:(1)合适环境信号的识别,伴随着向外延伸的多鞭毛的定向丛集细胞的产生;(2)定向丛集细胞共同调节着向四周运动;(3)巩固营养细胞,起始一轮新的定向丛集运动^[10,11]。定向丛集的细菌能够在物体表面迅速扩散。

机会致病菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是引起肺部囊状纤维化的主要原因。在慢性感染中,*P. aeruginosa*形成了复杂的具有三维结构的生物膜,封闭了细菌,对抗生素治疗产生高度抵抗^[12]。*P. aeruginosa*也能产生定向丛集运动,形成鞭毛快速向外延伸,使*P. aeruginosa*快速扩散^[13]。因而抑制*P. aeruginosa*生物膜形成及其定向丛集运动,可能为治疗由其引起的疾病提供一种新思路。

本文利用一株实验室筛选得到的奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*),研究它的发酵滤液对*P. aeruginosa*生物膜、EPS(胞外多聚物)产生、定向丛集运动以及生长等的影响,为生物膜抑制剂的筛选和细菌感染性疾病的防治提供一种可能的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和培养条件

奇异变形杆菌(*P. mirabilis*):来源于实验室早期从清华大学深圳研究生院的池塘中筛选得到的菌株,现已保藏在中国普通微生物菌种保藏中心,保藏号为:CGMCC No. 6426。

铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*):是实验室保藏的野生菌株(全称:*Pseudomonas aeruginosa* PAO1),由中国科学院南海海洋研究所的王晓雪研究员惠赠。目前铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)已经成为生物膜研究的模式致病菌。

培养条件:本文中,所有细菌均用LB培养基(蛋白胨1g,酵母提取物0.5g,氯化钠1g,去离子水100mL,琼脂1.5g,pH7.0,121℃灭菌30min)活化,其中*P. mirabilis*培养温度为30℃;*P. aeruginosa*培养温度为37℃。

1.2 *P. mirabilis*的活化与发酵滤液的提取

将-80℃保藏的*P. mirabilis*在30℃水浴锅中温育30min,再放入恒温摇床中振荡培养1h后,在LB固体培养基平

板上划线,30℃静置培养12h以上,直至长出清晰可见的单菌落。从中挑出10株单菌落于1mL LB液体培养基中,30℃,220r/min摇床培养过夜。再将1mL菌液全部转接入20mL LB液体培养基中,30℃,220r/min摇床培养8h,得到活化的*P. mirabilis*菌液。

接种1mL活化的*P. mirabilis*菌液于100mL LB液体培养基中,置于摇床上,30℃,220r/min培养48h,直至培养基营养成分基本耗尽,细胞密度不再增加为止。

收集发酵液,4℃,12000r/min,离心20min,取上清液。获得的上清液用0.22μm滤膜过滤,得到滤液。在滤液中加入适量PEG(聚乙二醇)20000,浓缩滤液至10mL,4℃保存在灭菌容器中,备用。

1.3 *P. aeruginosa*生物膜量的测定

生物膜量用结晶紫法测定^[14]。从-80℃取出保种的*P. aeruginosa*,用1.2的方法活化。将活化的*P. aeruginosa*菌液用M63液体培养基(硫酸铵0.2g,磷酸二氢钾1.36g,七水硫酸亚铁0.5mg,甘油0.2g,酪蛋白水解物0.5g,去离子水100mL,用氢氧化钾调pH至7.0,高温121℃灭菌30min后,加入0.02g七水硫酸镁,0.2g葡萄糖)稀释至OD₆₀₀为0.02。取稀释后的*P. aeruginosa*加入到96孔板中,每孔100μL;再向各孔中加入不同体积百分比浓度(0.1%,0.5%,1%;以下所述浓度皆为体积百分比浓度的简称)的*P. mirabilis*发酵滤液,每个浓度设12个复孔。对照为不加任何发酵滤液的*P. aeruginosa*;盖上板盖,37℃下静置培养48h,注意保持空气湿度。

48h后,倒去培养基,用无菌水轻柔清洗孔板,加入100μL,1%(1g/100mL)结晶紫染液,室温染色30min。迅速倒去染料,彻底而轻柔的清洗孔板至未加任何物质的孔变透明为止。

室温晾干96孔板,用DMSO溶解附着于96孔板壁上和底部的结晶紫,并适度稀释,用分光光度计测OD₅₅₀,每一孔测三次,取平均值。吸光值越大,溶解的结晶紫越多,生物膜量越大,反之越少。

1.4 *P. aeruginosa*中胞外多聚物(EPS)的分析方法

EPS是生物膜的重要组成部分,本文也测定了*P. aeruginosa* EPS总量。EPS测定采用硫酸-萘酚检测法^[15],步骤如下。用LB液体培养基稀释活化的*P. aeruginosa*至OD₆₀₀为0.5,加入不同浓度的*P. mirabilis*发酵滤液(0.1%,0.5%,1%),每个浓度3次重复。对照组不加入任何发酵滤液,即浓度为0%。

从每个样品取出1mL菌液涂布于LB固体平板上,置于37℃培养24h后,收集约60mg的细菌菌苔。加入1mL无菌水重悬,用漩涡振荡仪使得培养物充分混匀。将重悬后的样品沸水煮沸10min,冷却至室温后,每个样品12000×g,离心10min。

取400μL适当稀释后的上清液样品,加入200μL萘酚-硫酸检测液,再缓慢加入900μL,95%的浓硫酸,暗处反应15min并冷却至室温,测定OD₆₂₀。吸光值越大,EPS中的碳水化合物与萘酚-硫酸反应生成的蓝绿色糖醛衍生物越多,EPS含量越多,反之越少。

1.5 *P. aeruginosa*定向丛集运动(swarming)的检测

用1mL FAB液体培养基(0.1mmol/L氯化钙,0.01

mmol/L 铁-EDTA, 0.15 mmol/L 硫酸铵, 0.33 mmol/L 磷酸氢二钠, 0.2 mmol/L 磷酸二氢钾, 0.5 mmol/L 氯化钠, 0.5 % 酪蛋白水解物, 12 mmol/L 柠檬酸钠, 琼脂 0.4 %, 121 °C 灭菌 30 min 后加入 1 mmol/L $MgCl_2$) 稀释活化的 *P. aeruginosa* 至 OD_{600} 为 0.02, 加入不同浓度的 *P. mirabilis* 发酵滤液 (0.1 %, 0.5 %, 1 %), 充分混匀后, 滴加 5 μ L 样品到 0.4 % FAB 平板中央, 放置培养箱中, 37 °C 培养 48 h, 肉眼观察菌株在平板中运动情况^[6]。

1.6 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 生长的影响检测

将 LB 固体培养基融化冷却至 45 °C, 加入 1 mL 活化的 *P. aeruginosa* 菌液, 充分混匀后, 倒平板。待平板凝固后, 在其上均匀铺上 3 张滤纸片, 在滤纸片上滴加 5 μ L *P. mirabilis* 发酵滤液, 放入 37 °C 培养箱中静置培养过夜, 肉眼观察是否产生抑菌圈。

2 结果

2.1 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 生物膜的影响

该 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 生物膜的抑制效果见图 1, 与对照组相比, 该发酵滤液对 *P. aeruginosa* 的生物膜有着明显的抑制作用, 且这种抑制作用随着加入滤液浓度的增大而增强。在滤液浓度达到 1 % 时, 对 *P. aeruginosa* 的抑制率达到了 60.9 %。

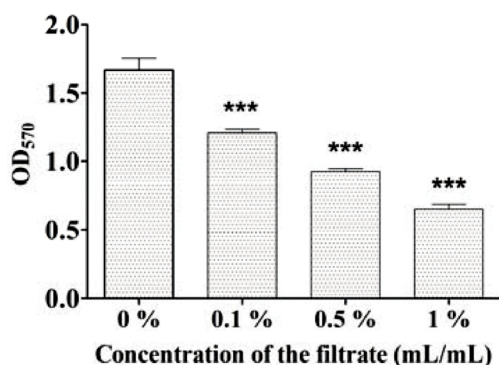


图 1 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 生物膜的抑制作用

Fig.1 The effect of cultured *P. mirabilis* filtrate on *P. aeruginosa* biofilm formation

注: 本文运用了方差分析对结果进行检验, 当 $P < 0.05$ 时, 有显著差异; 图中 *** 表示 $P < 0.001$, 有极显著差异。

Note: The values were tested by one-way ANOVA and significant difference is indicated by asterisks (***, $P < 0.001$).

2.2 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* EPS 的影响

P. mirabilis 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 的 EPS 影响见图 2, 加入发酵滤液后 *P. aeruginosa* 的 EPS 的产生量减少; 随着发酵液浓度的逐渐升高, EPS 的产生量越来越少, 差异显著。在浓度为 1 % 时, 抑制率达到了 45.9 %。

2.3 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 定向丛集运动的影响

在 FAB 平板上 48 h 培养后, 未加入 *P. mirabilis* 发酵滤液的 *P. aeruginosa* 向四周发散迁移, 延伸到整个板子, 在最前方呈现一个可见的粘性材料层, 使菌落发亮。而加入了 *P. mirabilis* 滤液的铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 丛集运动减慢, 或

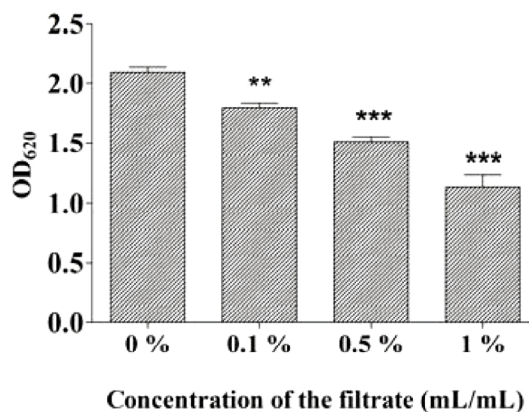


图 2 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* EPS 的抑制效果

Fig.2 The effect of cultured *P. mirabilis* filtrate on *P. aeruginosa* EPS production

注: 方差分析中, 当 $p < 0.05$ 时, 有显著差异; 图中 **, 表示 $P < 0.01$, 极显著差异; ***, 表示 $P < 0.001$, 极显著差异。

Note: The values were tested by one-way ANOVA and significant difference is indicated by asterisks (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$).

者没有发生。菌落向前移动的距离越来越少, 前端菌落并未出现如锯齿状的分支。到 1 % 时, 基本已经没有了丛集现象 (图 3)。

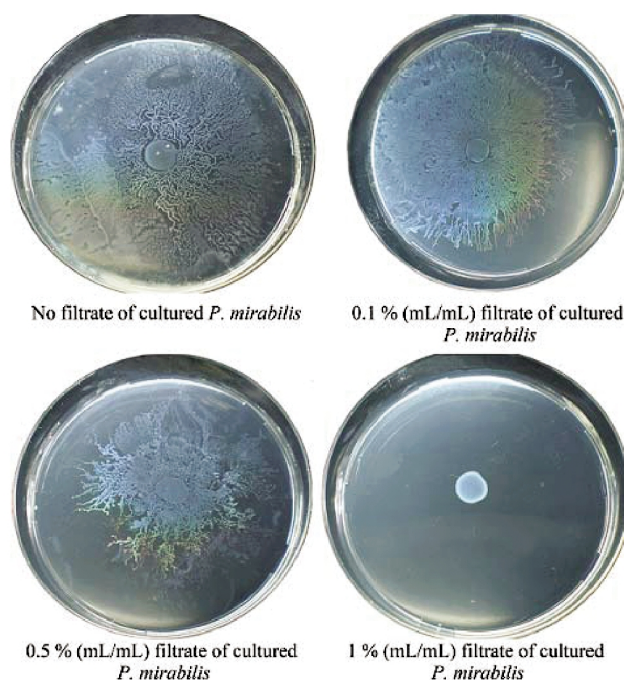


图 3 奇异变形杆菌对铜绿假单胞菌定向丛集运动 (Swarming) 的抑制效果

Fig.3 The inhibition of *P. aeruginosa* swarming by cultured *P. mirabilis* filtrate

2.4 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 生长影响

利用固体平板观察 *P. mirabilis* 发酵滤液对 *P. aeruginosa* 生长的影响, 结果如图 4 所示, 在加入了 *P. mirabilis* 发酵液的滤纸片上, 并未形成抑菌圈。这表明, *P. mirabilis* 的滤液并不影响病原菌 *P. aeruginosa* 的生长。



图4 奇异变形杆菌发酵滤液对铜绿假单胞菌生长的影响

Fig.4 The influence of the cultured *P. mirabilis* filtrate on the growth of
P. aeruginosa

3 讨论

在近二十年,人们发现越来越多的细菌通过这样的多细胞行为聚集在一起,行使与单个细胞完全不同的功能,能引发诸多医学和工业问题,它的形成和调节机制越来越受到重视,尤其是生物膜和定向丛集运动^[2]。

生物膜作为多细胞行为的其中一种,是抗生素耐药性形成的重要原因之一^[17]。大量研究表明,生物膜为细菌提供了一层保护盔甲,它高度有序且复杂的三维结构和表面的高粘度阻碍了抗生素渗透入生物膜内,影响了杀菌效果^[18, 19]。EPS 作为生物膜的组成成分之一,在生物膜三维结构的形成和表面的粘度起着重要作用,其中 Pel 多聚糖和藻酸盐的含量,更是生物膜起始附着和三维蘑菇型结构的形成主要原料^[20]。本文所选的 *P. aeruginosa* 的发酵滤液物能使 *P. aeruginosa* 的生物膜量减少 60.9 % (图 1),与放线菌提取物对生物膜的抑制作用接近^[1]。与此同时,生物膜中 EPS 的产生量减少了 45.9% (图 2),这种 EPS 的减少可能是生物膜量减少的一个原因。

定向丛集运动是多细胞行为的另一方面,它是最先认识到的细菌表面定植模式,能够使得细菌迅速的在一个营养丰富的环境或者宿主组织中定位^[21],它的形成与鞭毛和表面的湿润程度有关。因为这种运动性,定向丛集运动影响着毒力因子的扩散和致病性的产生^[22]。在本文中,奇异变形杆菌的发酵滤液不仅能抑制生物膜形成,也能抑制定向丛集运动(图 2-3),这间接减缓了毒力因子的扩散,降低致病性。人们从吡喃酮、脂肪酸、西洋森也提取出了具有这样的功能的物质^[12, 22, 23],这与本文结果相符。

近些年,群体感应现象也是人们关注的主要问题之一,它是细菌感应细胞种群密度波动的一种基因表达调节机制,即具有群体感应系统的细菌产生、释放信号分子,这种信号分子随着种群密度的增加而增加,当信号积累到某一临界浓度时,该种信号分子与特定受体结合,从而激活相关下游基因的表达^[24]。它能调控生物膜的形成,目前得到的大多数多细胞行为等的抑制剂实际都是一种群体感应抑制剂,如吡喃酮^[25]。本次实验所

用的 *P. mirabilis* 也是实验室通过筛选得到的群体感应的阳性菌株(另文发表),由此推测 *P. mirabilis* 发酵滤液对生物膜和定向丛集运动的抑制作用,可能都与群体感应系统有关,这种相关性已经有文献报导出来^[26]。

本文所用的 *P. mirabilis* 发酵滤液在不影响病原菌生长的条件下,一方面抑制了生物膜和 EPS 的产生,解除了生物膜的保护作用,这可以在一定程度上降低了抗生素的耐受性,与抗生素协同作用可能会增强抗生素的杀菌能力。而另一方面该菌滤液减缓了病原菌的定向丛集运动,间接对毒力因子的扩散和致病性的产生起到一定的抑制作用,对疾病的治疗有着重要的潜在应用价值。综上,今后的研究重点主要在于:筛选和鉴定该 *P. mirabilis* 滤液中产生抑制作用的活性成分,分析该活性成分对生物膜、定向丛集运动的抑制机制,验证其与抗生素是否存在协同作用、是否影响毒力因子的产生等。

参考文献(References)

- [1] Lesic B, Lepine F, Deziel E, et al. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds [J]. PLoS Pathogens, 2007, 3(9): 1229-1239
- [2] Murray E J, Kiley T B, Stanley-Wall N R. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour [J]. Microbiology, 2009, 155(1): 1-8
- [3] Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms[J]. PLoS Biology, 2007, 5(11): e307
- [4] Nadell C D, Xavier J B, Levin S A, et al. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms[J]. PLoS Biology, 2008, 6(1): e14
- [5] Ng W-L, Bassler B L. Bacterial quorum-sensing network architectures [J]. Annual Review of Genetics, 2009, 43: 197-222
- [6] Waters C M, Lu W, Rabinowitz J D, et al. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMP levels and repression of *vpsT* [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(7): 2527
- [7] Schierholz J, Beuth J, King D, et al. Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria [J]. Central Journal of Bacteriology, 1999, 289(2): 165-177
- [8] Chandler R, Jung K. Bacterial signaling [M]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010: 7-22
- [9] Xu K D, Mcfeters G A, Stewart P S. Biofilm resistance to antimicrobial agents[J]. Microbiology, 2000, 146(3): 547-549
- [10] Allison C. Bacterial swarming: An example of prokaryotic differentiation and multicellular behavior [J]. Science Progress, 1991, 75(298 Pt 3-4): 403
- [11] Kamatkar N G, Shrout J D. Surface hardness impairment of quorum sensing and swarming for *Pseudomonas aeruginosa* [J]. PloS One, 2011, 6(6): e20888
- [12] Wu H, Lee B, Yang L, et al. Effects of ginseng on *Pseudomonas aeruginosa* motility and biofilm formation [J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2011, 62(1): 49-56
- [13] Wilder C N, Diggle S P, Schuster M. Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: The roles of the *las*, *rhl* and *pqs* quorum-sensing systems[J]. ISME J, 2011, 5(8): 1332-1343
- [14] Huber B, Eberl L, Feucht W, et al. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum sensing [J]. Journal of Research Nature, 2003, 58(11/12): 879-884

(下转第 1008 页)

- 1462-1470
- [13] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells [J]. Methods Cell Biol, 1976, 13: 29-83
- [14] Ismail T, Howl J, Wheatley M, et al. Growth of normal human hepatocytes in primary culture: effect of hormones and growth factors on DNA synthesis[J]. Hepatology, 1991, 14(6): 1076-1082
- [15] Szanto I, Kahn C R. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(5): 2355-2360
- [16] Szanto I, Kahn C R. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(5): 2355-2360
- [17] Shi Y, Zhang L, Jiang R, et al. Protective effects of nicotinamide against acetaminophen-induced acute liver injury [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(4): 530-537
- [18] Mitaka T, Kojima T, Mizuguchi T, et al. Subculture of proliferating adult rat hepatocytes in medium supplemented with nicotinamide and EGF[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1996, 32(8): 469-477
- [19] Wei S D, Li J Z, Liu Z J, et al. Dexamethasone attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury by downregulating glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in Kupffer cells[J]. Hepatol Res, 2011, 41(10): 989-999
- [20] Tiao M M, Lin T K, Chen J B, et al. Dexamethasone decreases cholestatic liver injury via inhibition of intrinsic pathway with simultaneous enhancement of mitochondrial biogenesis [J]. Steroids, 2011, 76(7): 660-666

(上接第 1004 页)

- [15] Zhang X S, Garcí a-Contreras R, Wood T K. *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA)[J]. The ISME Journal, 2008, 2(6): 615-631
- [16] De Kievit T R, Gillis R, Marx S, et al. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Their role and expression patterns [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (4): 1865-1873
- [17] Ma L, Conover M, Lu H, et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5 (3): e1000354
- [18] Harmsen M, Yang L, Pamp S J, et al. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal [J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010, 59(3): 253-268
- [19] Vu B, Chen M, Crawford R J, et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation [J]. Molecules, 2009, 14(7): 2535-2554
- [20] Hatch R A, Schiller N L. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42(4): 974-977
- [21] Eberl L, Molin S, Givskov M. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1 [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181 (6): 1703-1712
- [22] Inoue T, Shingaki R, Fukui K. Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 281(1): 81
- [23] Ren D, Sims J, Wood T. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2 (5h)-furanone [J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 34(4): 293-299
- [24] Decho A W, Norman R S, Visscher P T. Quorum sensing in natural environments: Emerging views from microbial mats [J]. TRENDS in Microbiology, 2010, 18(2): 73-80
- [25] Kocielek M G. Quorum-sensing inhibitors and biofilms [J]. Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry, 2010, 8(4): 315
- [26] 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]. Molecular Microbiology, 2006, 62(5): 1264-1277