

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001908

穿心莲内酯增强庆大霉素对小鼠烧伤创面感染的防治研究

王 瑶, 周 薇, 沈 犁, 华子瑜

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、

儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究穿心莲内酯联合庆大霉素对烧伤创面感染的作用。**方法:**建立烧伤创面铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌混合感染小鼠模型,取 BALB/c 成年小鼠共 48 只,每只小鼠做 4 个烫伤创面,分为对照组、穿心莲内酯干预组、庆大霉素干预组及联合干预组(各组创面 48 个)。病理切片观察组织坏死情况,ELISA 检测肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平,电镜观察生物膜情况;建立混合生物膜体外模型,Western blot 检测上清及菌体中外毒素 A(exotoxin A, ExoA)的表达;qPCR 检测 *exoS* 及 *exoY* 表达水平。**结果:**电镜证实建模成功并显示各干预条件下生物膜破坏情况;病理评分显示,联合干预组(4.86 ± 0.38)预后好于庆大霉素干预组(3.29 ± 0.49)和穿心莲内酯干预组(4.14 ± 0.69)($P=0.000$, $P=0.020$);ELISA 示庆大霉素干预组、穿心莲内酯干预组、联合干预组与对照组比较 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达量均降低($P<0.05$);Western blot 示庆大霉素干预组上清及菌体中 ExoA 灰度值分别为 43.73 ± 1.07 和 73.53 ± 1.90 ,均高于联合干预组的 40.99 ± 0.57 和 53.37 ± 2.31 ($P=0.017$, $P=0.000$);qPCR 显示庆大霉素组 *exoS* 与 *exoY* 表达水平高于联合干预组($P=0.003$, $P=0.011$)。**结论:**穿心莲内酯可增强庆大霉素对烧伤组织的修复作用,其原因与穿心莲内酯促进庆大霉素对生物膜的破坏、炎症因子及毒力因子的减少有关。

【关键词】铜绿假单胞菌;金黄色葡萄球菌;穿心莲内酯;庆大霉素;生物膜;毒力因子

【中图分类号】R378.99

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-04-03

Prevention and treatment of andrographolide combined with gentamicin for burn wound infection in mice

Wang Yao, Zhou Wei, Shen Li, Hua Ziyu

(Department of Neonatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Key Laboratory of Ministry of Education for Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity)

【Abstract】Objective: To study the effect of andrographolide combined with gentamicin on burn wounds infection. **Methods:** The burn model infected by *Pseudomonas aeruginosa* mixed with *Staphylococcus aureus* was established in 48 BALB/c mice, with four wounds in each. The wounds in each mouse underwent blank intervention (control group), gentamicin intervention (gentamicin group), andrographolide intervention (andrographolide group) and andrographolide combined with gentamicin intervention (combined intervention group) respectively. The tissue necrosis was observed under pathological section, and the morphology of mixed biofilm by scanning electron microscopy. The expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by ELISA. The mixed biofilm model in vitro was established. The expression of exotoxin A (ExoA) was detected by Western blot and the expressions of *exoS* and *exoY* by qPCR. **Results:** Electron microscopy confirmed the successful modeling and biofilm destruction under different interventions. The pathological scores showed that the prognosis of combined intervention group (4.86 ± 0.38) was better than that of gentamicin intervention group (3.29 ± 0.49) and andrographolide intervention group (4.14 ± 0.69), with P value as 0.000 and 0.02, respectively. ELISA showed that the expressions of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in gentamicin intervention group decreased significantly than those in combined intervention group ($P<0.05$). Western blot showed that the gray values of ExoA in the supernatant and bacterial cells of the gentamicin intervention group were 43.73 ± 1.07 and 73.53 ± 1.90 respectively, which were significantly higher than those in the com-

作者介绍: 王 瑶, Email: once28@163.com,

研究方向: 铜绿假单胞菌耐药机制研究。

通信作者: 华子瑜, Email: ziyu_hua@sohu.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81370777); 重庆市卫计委中医药科技资助项目(编号: ZY201702069)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.0859.012.html>
(2018-11-06)

bined intervention group (40.99 ± 0.57 and 53.37 ± 2.31) ($P=0.017$, $P=0.000$). The expressions of *exoS* and *exoY* in the gentamicin intervention group were higher than those in the combined intervention group, with P values as 0.003 and 0.011. **Conclusion:** Andrographolide enhances the effect of gentamicin on the repair of burn wounds, which is related to the effects that andrographolide can promote the destruction of biofilm, and the reduction of inflammatory factors and virulence factors.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; andrographolide; gentamicin; biofilm; virulence factor

烧伤感染治疗一直是国际上的一大难题,烧伤可使机体免疫力降低,大量细菌定植在烧伤创面表面,继而造成创面溃烂及败血症的发生,使治疗更加困难^[1-2]。人体中 80% 的微生物感染与生物膜有关。据研究,细菌形成生物膜后耐药能力是浮游菌的 1 000 倍^[3]。铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌作为烧伤创面常见耐药菌,极易形成生物膜菌株^[4-5],给临床治疗烧伤感染带来困难。既往研究显示,穿心莲内酯单用有抗炎、抗病毒等作用,但联合庆大霉素对烧伤创面中混合生物膜的作用未见报道。本文在小鼠皮肤建立烧伤创面感染模型,使用穿心莲内酯及庆大霉素干预,研究此二者联合治疗对烧伤创面感染的作用。

1 材料及方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 实验动物为健康清洁级 BALB/c 成年小鼠 48 只,购于重庆医科大学动物实验中心,每只小鼠做 4 个烫伤创面,分为对照组、穿心莲内酯干预组、庆大霉素干预组及联合干预组,每组创面均为 48 个。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 菌株 铜绿假单胞菌标准株来源于 ATCC9027,金黄色葡萄球菌标准株来源于 ATCC25923。

1.1.3 主要试剂 肉汤培养基(Fisher Scientific 公司);穿心莲内酯粉末(Sigma 公司);庆大霉素(Sigma 公司);结晶紫粉末(Sigma 公司);SYBR Green 和逆转录试剂盒(日本 Takara 公司);外毒素 A(exotoxin A, ExoA)抗体(Sigma 公司)。

1.1.4 仪器 酶标仪(Bio-Red 公司);显影仪(Genecompanylimited 公司);扫描电镜(HITA-CHI-S3000N)。

1.2 实验方法

1.2.1 混合生物膜模型建立 挑取单菌落至液体培养基中过夜培养,调整细菌浓度至 1×10^8 菌落形成单位(colony-forming units, CFU)/mL,分别吸取铜绿假单胞菌 100 μ L(菌量 1×10^7 CFU)、金黄色葡萄球菌菌液 100 μ L(菌量 1×10^7 CFU)及二者按 1:1 的混合菌液(金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌菌量均为 50 μ L $\times 10^8$ CFU/mL,即为 5×10^6 CFU) 100 μ L

至 96 孔板中,重复 3 孔,干预组分别加入浓度为 5 mg/mL 的庆大霉素 1 μ L(干预浓度 50 μ g/mL),浓度为 10 mg/mL 的穿心莲内酯 1 μ L(干预浓度 100 μ g/mL)及二者混合液 1 μ L(穿心莲内酯及庆大霉素各为 0.5 μ L),对照组加入等体积二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)。放入 37 $^{\circ}$ C 孵箱中,静置 1~7 d。每天在相同时间取出 96 孔板,用水洗去浮游菌,洗 3 次后风干,吸取 125 μ L 0.05% 结晶紫染液加入每孔中,染色 10 min 后倒掉结晶紫,放入含双蒸水的容器中清洗 3 次后放在超净台风干,每孔加入 30% 醋酸 200 μ L 脱色 15 min,充分混匀后吸取 100 μ L 加入新的 96 孔板,于波长 570 nm 处测量光密度(optical density, OD)值。

1.2.2 烫伤感染小鼠模型建立 小鼠 III $^{\circ}$ 烫伤模型建立^[6]:将小鼠用 10% 水合氯醛按体质量(0.003 mL/g)进行腹腔麻醉,用胶布固定四肢于平板上,剃胡刀剃除背部毛发,用直径 6 mm 的吸管汲取沸水后,垂直放于小鼠背部皮肤表面,烫伤面积约 28 mm²,25 s 后倒掉吸管内水,III $^{\circ}$ 皮肤烫伤损害累及皮肤全层及背部肌肉,每只小鼠做 4 个烫伤创面。创面处覆盖医用胶布。烫伤后第 3 天,用注射器给予 4 个创面皮下注射不同液体(混合菌液体积为 50 μ L;菌量 10^8 CFU/mL $\times$ 50 μ L,即 5×10^6 CFU;铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌各 10^8 CFU/mL $\times$ 25 μ L,即 2.5×10^6 CFU):①铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌的混合菌液加上 0.5 μ L DMSO;②混合菌液加浓度为 5 mg/mL 的庆大霉素溶液 0.5 μ L(干预浓度为 50 μ g/mL);③混合菌液加浓度为 10 mg/mL 的穿心莲内酯溶液 0.5 μ L(干预浓度为 100 μ g/mL);④混合菌液与 2 种药物的混合液体。菌液及药物的液体总量为 50 μ L,接种完后创面处覆盖医用胶布。3 d 后取烫伤后感染皮肤标本。

1.2.3 病理切片制作 取下皮肤标本浸泡于 4% 多聚甲醛中,48 h 后放于脱水盒中脱水,按正常流程进行包埋,切片厚度为 4 μ m,60 $^{\circ}$ C 48 h 后进行苏木素-伊红染色,晾干后用中性树胶进行封片,显微镜观察病理组织。

1.2.4 扫描电镜观察各干预条件对混合生物膜的干预作用 按照 1.2.2 建立烫伤感染模型,标本用生理盐水漂洗后固定于 2.5% 戊二醛中,按照扫描电镜样品制备流程制备标本,在扫描电镜下观察各干预条件对生物膜形态的影响。

1.2.5 炎症因子的检测 将皮肤组织匀浆离心后取上清,依 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量,依小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(inter-

leukin, IL)-6 和 IL-1 β 试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 上清及菌体外毒素 A 的检测 按照 1.2.1 中方法建立体外混合生物膜模型,加入干预药物,放入 37 °C 孵箱中培养,待生物膜成熟后取出,吸出孔内液体至无菌 EP 管中,离心后分别留取上清及菌体。使用 BCA 法测量上清及菌体中总蛋白的浓度,计算蛋白浓度并用水调至一致,加入 Sample Buffer 和 β -巯基乙醇后 98 °C 煮 5 min,放入 -80 °C 冰箱中备用。按照说明书配置 Western blot 所用分离胶和浓缩胶,按次序加入同体积的样本,按照 70 V、30 min,120 V、1 h 电泳,300 mA、1 h 30 min 进行转膜。牛奶封闭 1 h 30 min,一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜后,孵育二抗 1 h 30 min 显影。

1.2.7 qPCR 检测 III 型分泌系统毒力因子 用 BioTeke 试剂盒提取生物膜中菌体 RNA,测 RNA 浓度,按照逆转录试剂盒方法将 RNA 逆转录为 DNA,按照 SYBR Green 说明书进行操作。先做出标准曲线,再进行样本表达检测,分析数据。

1.2.8 病理学评分标准 文章中皮肤组织病理变化情况评估见表 1,炎症的严重程度以炎症细胞在每个高倍视野下炎症细胞的个数进行评估:严重(13~15 个炎症细胞/每高倍视野),中度(10~13 个炎症细胞/每高倍视野),轻度(7~10 个炎症细胞/每高倍视野),基本无(4~7 个炎症细胞/每高倍视野),无(0~4 个炎症细胞/每高倍视野)^[7]。

表 1 病理组织学评分标准

指标	评分(分)				
	1	2	3	4	5
炎症	严重	中度	轻度	基本无	无
胶原化	无	无	部分	完全但不规则	完全且规则
新生血管形成	无	无	<5 HPF	6~10 HPF	>10 HPF

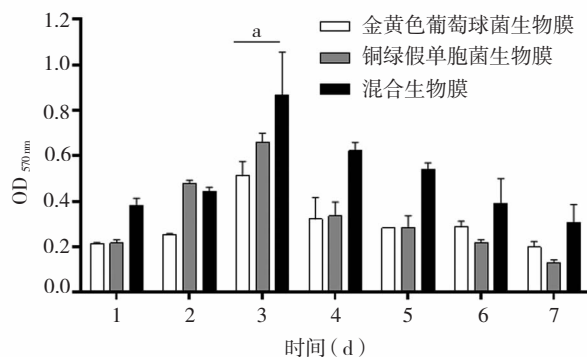
1.3 统计学处理

用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组比较采用单因素方差分析,进一步均数间两两比较采用 LSD- t 法;两组组间比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 单一及混合生物膜的生长

图 1 为铜绿假单胞菌生物膜、金黄色葡萄球菌生物膜及二者混合生物膜的生长曲线。1~3 d OD 值逐渐上升,第 3 天达顶峰后逐渐下降,说明第 3 天各组生物膜到达成熟期。比较金黄色葡萄球菌生物膜 (0.51 ± 0.06)、铜绿假单胞菌生物膜 (0.66 ± 0.04) 及两菌混合生物膜 (0.87 ± 0.19) 形成最佳期的情况 ($F=7.038, P=0.027$) 显示:混合生物膜的生长明显好于金黄色葡萄球菌生物膜 ($P=0.01$);但与铜绿假单胞菌生物膜比较无统计学差异 ($P=0.072$)。

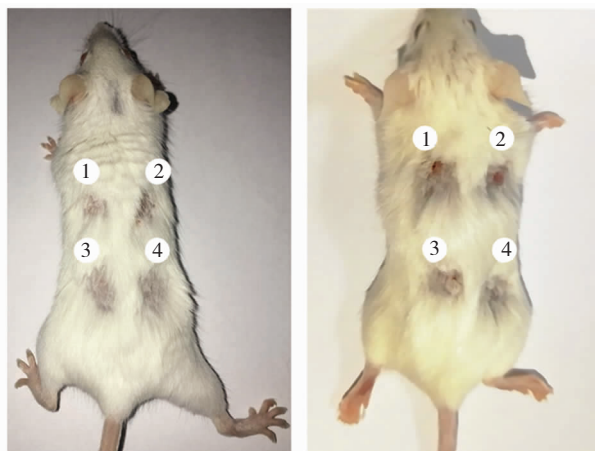


注:OD_{570nm} 表示在 OD 为 570 nm 的测量值,a 表示金黄色葡萄球菌生物膜与混合生物膜结晶紫染色结果相比, $P < 0.05$

图 1 铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌单一及混合生物膜生长情况

2.2 建立烫伤混合感染小鼠模型

利用 1.2.2 方法建立烧伤后感染模型,感染及干预后 3 d 取皮肤标本进行电镜观察,明确烫伤感染小鼠皮肤表面是否有生物膜存在(图 2)。图 3 示创面表面有大量生物膜形成;干预组可见多数杆状铜绿假单胞菌(红色箭头所指)及少数圆形的金黄色葡萄球菌(黄色箭头所指),提示混合感染成立。用烧伤后皮肤组织进行匀浆,利用选择性培养基鉴定皮肤感染细菌为金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌,烫伤混合感染模型建立成功。



注:1. DMSO 对照组;2. 庆大霉素干预组;3. 穿心莲内酯干预组;4. 联合干预组

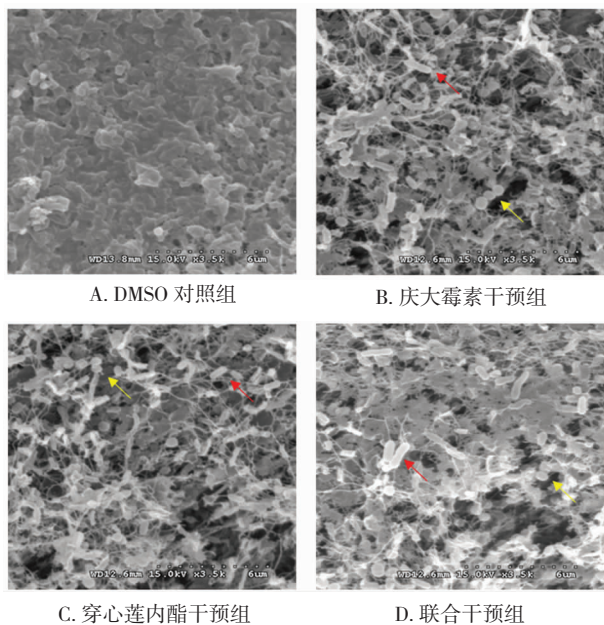
A. 烧伤后第 3 天接种细菌及药物后 B. 感染及干预 3 d 后

图 2 烧伤后感染小鼠模型图

2.3 干预条件下烫伤后感染组织表面生物膜的变化

不同干预条件下的创面表面生物膜的变化如图 3 所示。DMSO 对照中可见生物膜浓密,菌体被生物膜基质包裹,难以分辨出单个细菌。相比对照组,穿心莲内酯干预组及庆大霉素干预的部分生物膜稀疏,杂乱,单个细菌可见,细菌之间

连接断裂,部分基质被破坏;联合干预组上层生物膜中可见少量菌体,菌体之间的连接大部分消失,可见少量生物膜基质存在。



A. DMSO 对照组

B. 庆大霉素干预组

C. 穿心莲内酯干预组

D. 联合干预组

注:红色箭头所指为铜绿假单胞菌,黄色箭头所指为金黄色葡萄球菌

图 3 扫描电镜观察干预条件下感染组织中的生物膜形态 (2000×)

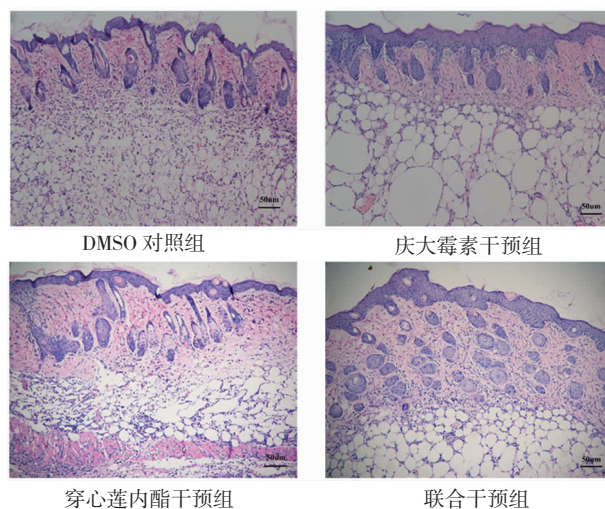
2.4 干预条件下烫伤感染创面的病理变化

图 4A 为不同干预条件下烫伤创面的病理变化;对照组中表皮大量坏死,胶原纤维排列杂乱,大量炎症细胞浸润,几乎无新生血管的形成;庆大霉素干预组表皮部分坏死,胶原纤维排列不规则,皮下有空泡形成,有许多炎症细胞浸润,少许新生血管形成;穿心莲内酯干预组表皮部分坏死,胶原纤维排列欠规则,新生血管形成较多,炎症细胞皮下浸润;联合干预组中新生血管形成较多,胶原纤维排列整齐,炎症细胞浸润相对较少。以表 1 中评分标准对图 4A 中各组病理变化进行病理评分:对照组(2.57 ± 0.53)、庆大霉素干预组(3.29 ± 0.49)、穿心莲内酯干预组(4.14 ± 0.69)、联合干预组(4.86 ± 0.38),方差分析显示,差异有统计学意义($F=24.33, P=0.000$);组间比较:与对照组相比,各干预组皮肤组织病理评分均好于对照组($P<0.05$);穿心莲内酯干预组预后好于庆大霉素干预组($P=0.006$);而庆大霉素干预组($P=0.000$)及穿心莲内酯干预组($P=0.02$)均差于联合干预组。

2.5 不同干预条件下炎症因子的变化

创面中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的检测结果如图 5 所示,对照组的炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分别为 (266.25 ± 12.97) pg/mL、(126.65 ± 3.16) pg/mL、(113.41 ± 1.11) pg/mL,庆大霉素干预组为(211.62 ± 11.11) pg/mL、(92.45 ± 6.47) pg/mL、(94.27 ± 4.66) pg/mL,穿心莲内酯干预组为(154.69 ± 4.74) pg/mL、(51.09 ± 9.81) pg/mL、(64.024 ± 0.28) pg/mL,联合干预组皮肤组织为(126.62 ± 12.02) pg/mL、(38.58 ± 6.60) pg/mL、($52.91 \pm$

1.43) pg/mL,差异有统计学意义($F=67.11, F=67.53, F=245.37$; 均 $P<0.05$)。与对照组相比,各干预组的炎症均有所减轻($P<0.05$),穿心莲内酯干预组皮肤组织各炎症因子均低于庆大霉素干预组($P=0.002, P=0.001, P=0.000$);而联合干预组皮肤组织各炎症因子均低于庆大霉素干预组(均 $P=0.000$);联合干预组 IL-1 β 及 TNF- α 水平低于穿心莲内酯干预组($P=0.038, P=0.025$),而 IL-6 水平与穿心莲内酯干预组比较无统计学差异($P=0.100$)。



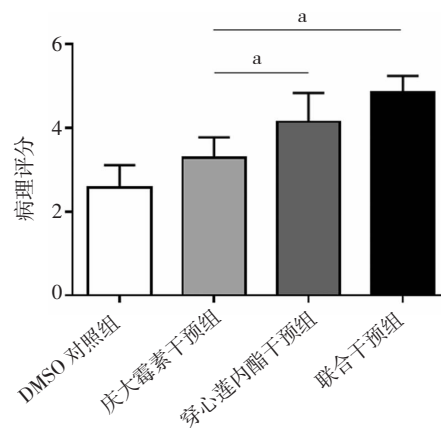
DMSO 对照组

庆大霉素干预组

穿心莲内酯干预组

联合干预组

A. 各干预条件下皮肤组织的病理切片 (200×)



注:a, $P<0.05$

B. 干预条件下各组织的病理评分

图 4 穿心莲内酯及庆大霉素干预下烫伤感染创面的病理变化

2.6 穿心莲内酯联合庆大霉素对毒力因子的干预作用

因毒力因子在小鼠体内产生较少,本研究选用体外模型进行毒力因子的检测。图 6A 显示 Western blot 检测 ExoA 在生物膜上清及菌体中的表达,可能由于 DMSO 对照组及穿心莲内酯干预组中 ExoA 蛋白被包裹,导致蛋白质无法显影。与庆大霉素干预组上清中 ExoA 蛋白灰度值(43.73 ± 1.07)及菌体中灰度值(73.53 ± 1.90)相比,联合干预组的上清灰度值(40.99 ± 0.57)及菌体中 ExoA 的灰度值(53.37 ± 2.31)均有所

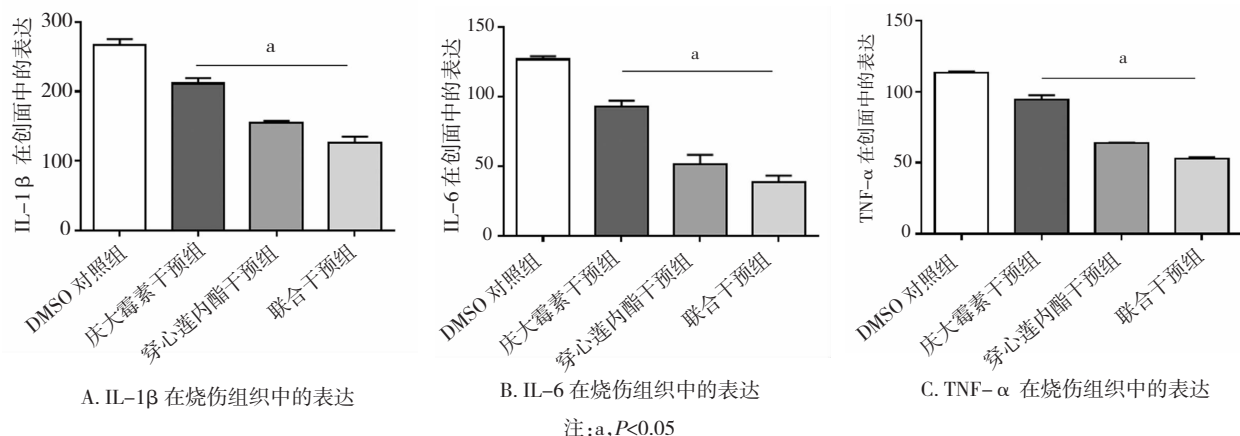


图 5 不同干预条件下炎症因子的变化

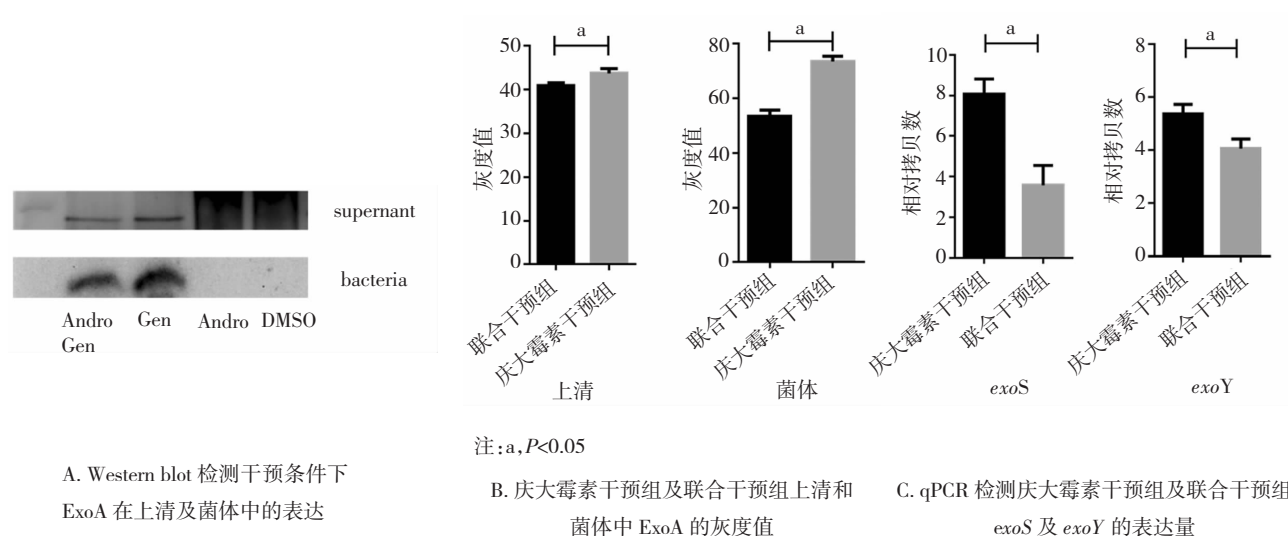


图 6 穿心莲内酯及庆大霉素对毒力因子的干预作用

降低, P 值分别为 0.017 和 0.000 (图 6B)。qPCR 检测菌体中 *ExoS* 及 *ExoY* 的表达 (图 6C), 与庆大霉素组 (*exoS* 表达量为 8.07 ± 0.75 , *exoY* 表达量为 5.38 ± 0.35) 相比, 联合干预组 (*exoS* 及 *exoY* 表达量分别为 3.59 ± 0.97 和 4.06 ± 0.36) 表达均降低 ($P=0.003$, $P=0.011$)。

3 讨论

皮肤烧伤后, 机体与外界接触的皮肤屏障被破坏, 大量细菌通过创面进入机体或在创面处定植。近年来多个研究显示, 多数创面的感染为多种细菌共同感染^[8], 例如糖尿病足的感染、烧伤感染及慢性静脉下肢溃疡感染等^[9-11]。不同细菌之间相互调节产生更多毒力因子, 细菌感染后形成的生物膜使细菌对抗生素的敏感性下降^[12], 多数抗生素不能渗透到生物膜中, 只能杀死生物膜表面的细菌, 而对生物

膜包裹的细菌作用却十分微弱, 这使感染难以被完全清除, 容易造成慢性及反复感染。在感染的临床治疗中, 抗生素联合使用非常普遍。

本实验选用临床常见机会致病菌金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌对烧伤创面进行感染, 研究传统中药成分穿心莲内酯 (andrographolide, Andro) 与既往常用抗生素 (庆大霉素) 联合使用对烧伤创面的影响。病理变化表明, Andro 有利于胶原纤维的生长和新生血管形成, 减少炎症细胞。另外, 本实验观察到 Andro 干预组的烧伤创面皮下存在脓肿, 而其他干预条件下未发现创面局部脓肿形成。因此, Andro 可能通过抑制细菌和炎症的播散, 使感染局限化。创面的扫描电镜可看出, Andro 与庆大霉素联用时, 对破坏生物膜有协同作用。烧伤后局部组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子升高^[13], 进行不同干

预后此 3 种炎症因子的产生均减少,其中联合干预组对炎症因子的减轻优于庆大霉素干预组。伴随生物膜形成的毒力因子产生也对组织造成损伤。Goldufsky 等^[14]研究显示,因铜绿假单胞菌引起的糖尿病足创面感染的预后与 T3SS 有关。由局部组织 ExoA、exoS 和 exoY 毒力因子检测结果可知,联合干预组可进一步减少毒力因子的分泌。因此,Andro 可联合庆大霉素促进烧伤创面的愈合,可能机制如下:①穿心莲内酯可减少生物膜组成成分胞外 DNA 及黏液的生成^[15],使生物膜骨架破坏,被生物膜包裹的菌体裸露,增加细菌对抗生素的敏感性^[16],使庆大霉素可杀死细菌,使菌量减少,感染减轻;②穿心莲内酯联合庆大霉素进一步减少组织中炎症因子的释放,促进新生组织生长,促进创面愈合;③穿心莲内酯促使庆大霉素对铜绿假单胞菌多种毒力因子的释放减少,减少对组织细胞的毒作用;除本研究的Ⅲ型分泌系统外,穿心莲内酯可减少铜绿假单胞菌绿脓菌素的释放^[17],减少其对组织的氧化损伤^[18],致组织细胞损伤减少,创面愈合较好。

综上所述,本研究成功建立体内混合生物膜感染模型;穿心莲内酯联合庆大霉素治疗,可促进动物模型烧伤组织的修复。其作用可能与穿心莲内酯增强庆大霉素对生物膜的破坏、减少炎症因子和毒力因子的释放有关。

参 考 文 献

- [1] Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, et al. Infection in burns[J]. Surg Infect(Larchmt), 2016, 17(2):250-255.
- [2] Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing;a review of the evidence[J]. Burns Trauma, 2013, 1(1):5-12.
- [3] Wolfmeier H, Pletzer D, Mansour SC, et al. New perspectives in biofilm eradication[J]. ACS Infect Dis, 2018, 4(2):93-106.
- [4] Yi D, Huan J, Feng G, et al. Pseudomonas aeruginosa prevalence, antibiotic resistance and antimicrobial use in Chinese burn wards from 2007 to 2014[J]. J Int Med Res, 2017, 45(3):1124-1137.
- [5] 鲁海强, 刘达恩, 陈小婷, 等. 2007-2011 年烧伤患者病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(22):5602-5604.
- [6] 任 鹏, 官大威, 赵 锐, 等. 小鼠皮肤烫伤模型的建立[J]. 法医学杂志, 2012, 28(2):92-94.
- [7] Hazrati M, Mehrabani D, Japoni A, et al. Effect of honey on healing of *Pseudomonas aeruginosa* infected burn wounds in rat[J]. J Appl Anim Res, 2010, 37(2):161-165.
- [8] Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, et al. Polymicrobial Interactions; impact on pathogenesis and human disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(1):193-213.
- [9] Percival SL, Hill KE, Williams DW, et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds[J]. Wound Repair Regen, 2012, 20(5):647-657.
- [10] Serra R, Grande R, Butrico L, et al. Chronic wound infections; the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(5):605-613.
- [11] Bertesteanu S, Triaridis S, Stankovic M, et al. Polymicrobial wound infections; pathophysiology and current therapeutic approaches[J]. Int J Pharm, 2014, 463(2):119-126.
- [12] Deleon S, Clinton A, Fowler H, et al. Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* wound model[J]. Infect Immun, 2014, 82(11):4718-4728.
- [13] Zhao J, Zhou F, Chen L, et al. Negatively-charged aerosol improves burn wound healing by promoting eNOS-dependent angiogenesis[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(1):246-255.
- [14] Goldufsky J, Wood SJ, Jayaraman V, et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses T3SS to inhibit diabetic wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2015, 23(4):557-564.
- [15] Algburi A, Comito N, Kashtanov D, et al. Control of biofilm formation; antibiotics and beyond[J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(3):e02508-2516.
- [16] Wu CM, Cao JL, Zheng MH, et al. Effect and mechanism of andrographolide on the recovery of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to several antibiotics[J]. J Int Med Res, 2008, 36(1):178-186.
- [17] Zeng X, Liu X, Bian J, et al. Synergistic effect of 14- α -lipoyl andrographolide and various antibiotics on the formation of biofilms and production of exopolysaccharide and pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6):3015-3017.
- [18] Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin; production, applications, challenges and new insights[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(4):1159-1168.

(责任编辑:冉明会)