

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002167

增强的中性粒细胞呼吸爆发对黏液型铜绿假单胞菌生物膜及其藻酸盐的影响

许琦, 李芳, 艾青, 谭琪, 余加林

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆重点实验室、
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:在体内探讨中性粒细胞呼吸爆发增强后对黏液型铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P.a*)生物膜(biofilm, BF)和其重要的胞外基质藻酸盐的影响。**方法:**建立大鼠气道黏液型 *P.a* BF 感染模型, 分别用呼吸爆发增强剂(PMA)(BF-PMA 组)和生理盐水(BF-对照组)干预, 平板计数法检测 BF 内活菌数目, 扫描电镜观察 BF 的结构; 硫酸-咔唑法测定 BF 内藻酸盐含量; HE 染色观察 2 组肺组织病理损伤情况、ELISA 分析炎症反应水平。**结果:**扫描电镜显示 BF-PMA 组的 BF 结构较对照组更复杂、更厚, 且 BF-PMA 组的 BF 活菌数目明显高于对照组($P=0.000$); BF-PMA 组 BF 内藻酸盐合成明显高于对照组($P=0.004$); HE 染色发现 BF-PMA 组肺组织病理改变更严重, 且炎症反应更重, γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)水平较对照组高($P=0.002$), IFN- γ 与白介素-10(interleukin-10, IL-10)的比值也高于对照组($P=0.023$)。**结论:**在体内中性粒细胞呼吸爆发增强后可能通过促进黏液型 *P.a* BF 的重要胞外基质藻酸盐的合成, 导致黏液型 *P.a* BF 清除更难, 同时伴随更严重的病理损害和炎症反应。

【关键词】中性粒细胞呼吸爆发; 黏液型铜绿假单胞菌生物膜; 藻酸盐**【中图分类号】**R378.99*1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-03-18Effect of enhanced neutrophil respiratory burst on mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and its alginate

Xu Qi, Li Fang, Ai Qing, Tan Qi, Yu Jialin

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

【Abstract】Objective: To investigate the effect of enhanced neutrophil respiratory burst on mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and alginate, the main in extracellular matrix, *in vivo*. **Methods:** A rat model of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in the airway was established, and the rats were treated with the respiratory burst enhancer PMA (BF-PMA group) or normal saline (control group). The plate count method was used to measure the number of live bacteria in biofilm; a scanning electron microscope was used to observe the structure of biofilm; the sulfuric acid-carbazole method was used to measure the content of alginate in biofilm; HE staining was used to observe pathological injury of lung tissue; ELISA was used to measure the levels of inflammatory factors. **Results:** The scanning electron microscope showed that compared with the control group, the BF-PMA group had a significantly more complex structure and significantly greater thickness of the biofilm, as well as a significantly higher number of live bacteria in the biofilm ($P=0.000$). The BF-PMA group had a significantly higher level of alginate synthesis in biofilm than the control group ($P=0.004$). HE staining showed that compared with the control group, the BF-PMA group had significantly greater pathological changes of lung tissue, a significantly higher degree of inflammatory response in lung tissue, and a significantly higher level of interferon gamma (IFN- γ) ($P=0.002$), as well as a significantly higher ratio of IFN- γ to interleukin-10 ($P=0.023$). **Conclusion:** Enhanced neutrophil respiratory burst *in vivo* may promote the synthesis of alginate, an important substance in the extracellular matrix of

mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, and make it more difficult to eliminate mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. It is often associated with severe pathological injury and inflammatory response.**【Key words】**neutrophil respiratory burst; mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilm; alginate

作者介绍: 许琦, Email: 13667691258@163.com,

研究方向: 感染与免疫。

通信作者: 余加林, Email: yujialin486@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81370744); 国家自然科学基金青年资助项目(编号: 81401236)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190528.1309.002.html>
(2019-05-28)

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P.a*)是极为常见的机会致病菌,是院内感染的主要致病菌之一。它可以产生生物膜(biofilm, BF),导致难治性感染^[1]。BF 由细菌和自身分泌的胞外基质组成,生物膜可以使细菌群体耐药性增强,还可以逃避宿主免疫作用^[2]。*P.a* 在慢性感染过程中常突变为以合成大量藻酸盐为特征的黏液型,这将导致 *P.a* BF 更加难以被机体清除^[3]。

中性粒细胞是固有免疫系统的重要组成部分,在机体抵抗病原微生物入侵中起关键作用^[4]。中性粒细胞 NADPH 氧化酶的激活以及随后产生的超氧化物、过氧化氢和其他活性氧(reactive oxygen species, ROS)在其抗菌活性中起着重要作用^[5]。但是 ROS 仅对游离的 *P.a* 有效,却不能杀灭 BF 内的菌体,大量的 ROS 积聚损伤宿主组织、加重病情^[3]。此外有研究发现,肺部炎症反应发生时产生的活性氧可以影响野生型 *P.a* BF 重要致病基因的表达^[3]。这表明 ROS 不仅不能有效清除 *P.a* BF,还可能对 *P.a* BF 产生某些影响。然而,遗憾的是目前研究仅局限于中性粒细胞或 ROS 对野生型 *P.a* BF 的作用,很少有研究探讨活性氧对黏液型 *P.a* BF 的影响。本研究拟探讨中性粒细胞呼吸爆发对黏液型 *P.a* BF 的作用。通过建立大鼠气道黏液型铜绿假单胞菌生物膜感染模型,在体内探讨中性粒细胞呼吸爆发对黏液型 *P.a* BF 和藻酸盐的影响,进一步揭示中性粒细胞呼吸爆发对黏液型 *P.a* BF 的作用,为临床治疗黏液型 *P.a* BF 感染寻求新方法。

1 材料和方法

1.1 菌种

黏液型铜绿假单胞菌 FRD1 株(*mucA* 突变)由马旅雁教授(中国科学院微生物研究所,微生物资源国家重点实验室,北京)惠赠。

1.2 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 21 只,雄性,6~8 周龄,体质量 200~220 g,购买于重庆医科大学动物中心,饲养于重庆医科大学附属儿童医院动物中心。

1.3 主要试剂及仪器

临床新生儿头皮输液管 1 cm 消毒备用,充当 BF 载体。LB 培养基(Sigma, 美国),Jensen's 培养基(Sigma, 美国),佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)(Sigma, 美国),白介素-10(interleukin-10, IL-10)ELISA 试剂盒和 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)ELISA 试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司, 中国),JSM-35C 扫描电子显微镜(JEOL, 日本)。

1.4 导管生物膜的制备

-80 °C 冰箱取出冻存菌株,37 °C 复苏,三分法划线,挑取单菌落于 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 震荡培养过夜,分光光度计测定 600 nm 处的光密度(optical density, OD)值,用 Jensen's 培养基调菌液 OD₆₀₀ 为 0.1;24 孔细胞培养板中预先放入消毒的 1 cm 导管,每孔 2 个(其中一根用于质控,另一根用于动物气管插管),按 1 mL/孔加入菌液,排尽导管内空气,使导管完全浸泡于菌液中,37 °C 恒温孵箱培养 3 d,24 h 换液。取出培养 3 d 的生物膜,PBS 洗去表面浮游菌(洗 3 次),动物气管插管。同时,取质控管 100 W 超声震荡 30 min,旋涡振荡 5 min,PBS 逐级稀释涂板,14~16 h 后进行细菌菌落形成单位(colony forming unit, CFU)计数,每根导管初始黏附菌量约 $(6.961 \pm 2.125) \log_{10}$ CFU/管($n=12$)。

1.5 动物模型的制备

10% 水合氯醛 0.3~0.5 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠,固定头部和四肢,将下颌及两前腿之间的毛剪掉,由中间向外周消毒,铺巾,从颌下至胸部剪一个长约 1.5 cm 的小口,剪开浅筋膜,直至暴露肌肉,钝性分离肌肉直至暴露气管,分离气管周围组织,用眼科剪在气管垂直剪开一个长约 0.5 cm 的小口,将空白无菌导管或长有 BF 的导管放入气管内,固定导管,关闭气管,复位气管上肌肉和软组织,缝合皮肤后消毒,常规饲养^[3]。

1.6 干预措施

插管第 2 天,将大鼠随机分为 2 组,实验组(BF-PMA 组):中性粒细胞呼吸爆发激动剂(PMA)100 μ L/只,10 mg/mL 气道内给药;对照组(BF-对照组):等量的生理盐水气道内给药^[9]。插管第 3 天处死大鼠,取相应标本-80 °C 冻存备用。

1.7 平板计数法测定生物膜活菌数目

将导管从大鼠气道取下后,PBS 漂洗 3 次,100 W 超声震荡 30 min,旋涡振荡 5 min,PBS 逐级稀释涂板,14~16 h 后计数菌落。实际结果以 CFU 表示。

1.8 扫描电镜观察生物膜结构

将在体外培养 3 d、模型大鼠各组导管剖成两半后,用 3 mL 无菌生理盐水将导管内外表面培养基、分泌物以及浮游细菌冲洗干净,戊二醛固定做扫描电镜观察(scanning electron microscope, SEM)。

1.9 藻酸盐提取与检测

收集导管 BF 的细菌,加入 10 mL LB 培养基,培养 20~22 h 后,分别在各管菌液中加入 10 mL 生理盐水,混匀,离心(12 000 g, 4 °C, 30 min)后分别留取上清液和菌体沉淀。上清液中加入 10 mL 2% 氯化十六烷基吡啶,混匀,离心(12 000 g, 室温, 10 min),弃上清;向沉淀中加入 10 mL 1 mol/L 氯化钠溶液,混匀后加入 10 mL 异丙醇(-20 °C)形成沉淀;在沉淀中加入 10 mL 生理盐水混匀形成藻酸盐待测液^[9]。取 300 μ L 藻酸盐待测液或者标品溶液加入 2 mL 0.1 mol/L 硫酸硼酸溶液和 70 μ L 1% 咪唑溶液混匀,57 °C 水浴 30 min,分光光度计测 OD₅₃₀^[9]。菌体沉淀烘干称重。以藻酸盐标准曲线和菌体重量为

标准,测定藻酸盐浓度^[9]。

1.10 肺组织病理学观察

留取中性甲醛固定的肺组织,常规脱水,制备石蜡包块,切片烤片,苏木素-伊红染色(HE 染色),镜下观察肺组织的病变情况。

1.11 血清学检测

取-80℃冻存备用的血清,按 ELISA 试剂盒推荐的步骤测定 IL-10 和 INF- γ 含量。IL-10 试剂盒灵敏度 <15 pg/mL, INF- γ 试剂盒灵敏度 <7 pg/mL。

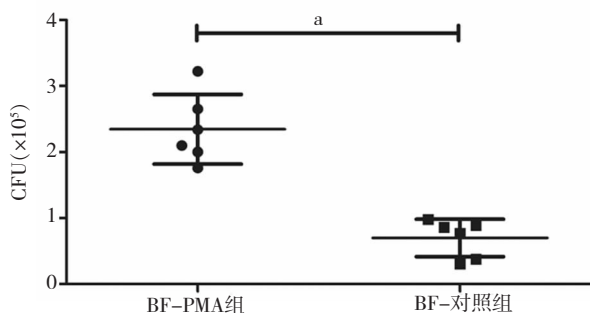
1.12 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件对各组计量资料进行正态性检验和方差齐性检验,样本为正态分布且方差齐,采取 Student's t 检验,样本为正态分布但方差不齐,采取近似 t 检验;样本为非正态分布,采取非参数 Mann-Whitney U 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 生物膜活菌数目

平板计数法测定生物膜活菌数目,结果显示气管插管第 3 天时,2 组导管上仍存在大量活菌,未被机体完全清除。然而 BF-PMA 组残留的细菌数量 $[(2.35 \pm 0.53) \times 10^5$ CFU]明显高于 BF-对照组 $[(0.70 \pm 0.28) \times 10^5$ CFU],差异有统计学意义($t=6.761, P=0.000$,图 1)。



注:a,活菌数目取对数后进行比较,差异有统计学意义($P<0.05$)

图 1 生物膜活菌数目

2.2 生物膜结构

扫描电镜观察生物膜结构,结果表明体外培养 3 d 时导管表面已经形成黏液型铜绿假单胞菌 BF(图 2A)。气管插管 3 d 时导管表面仍存留较多的 BF,同时 BF 表面有聚集的中性粒细胞等炎症细胞(图 2D),但 BF-PMA 组的 BF 明显较对照组浓密,表现为结构更复杂、厚度更厚(图 2B、C)。

2.3 藻酸盐合成分析

硫酸-咔唑法测定 BF 内藻酸盐含量,结果显示 2 组均合成大量的藻酸盐,但是 BF-PMA 组藻酸盐合成量 $[(104.47 \pm 47.84)$ mg/g]明显高于 BF-对照组 $[(29.32 \pm 10.21)$ mg/g],差异有统计学意义($t=3.763, P=0.004$,图 3)。

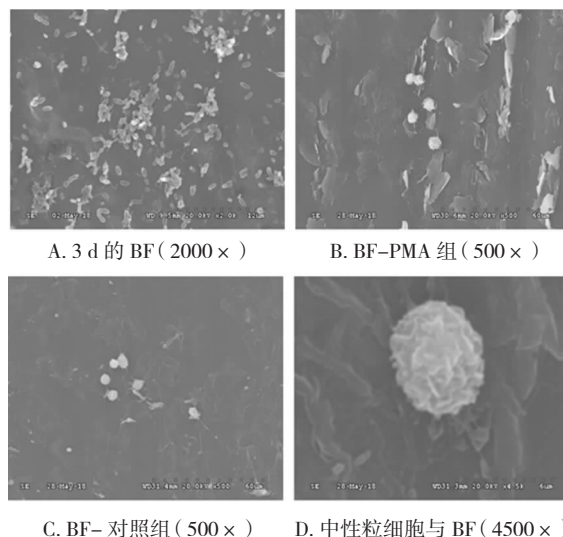
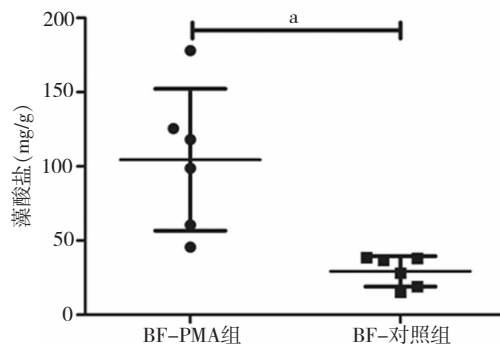


图 2 生物膜结构



注:a,差异有统计学意义($P<0.05$)

图 3 藻酸盐合成分析

2.4 肺组织病理学改变

光镜下见空白导管组大鼠肺组织结构正常,无炎症细胞浸润(图 4A)。BF-PMA 组肺部感染严重,光镜下可见肺泡间隙明显增宽,大量的肺泡结构被破坏,众多的炎症细胞浸润(图 4B)。BF-对照组肺部感染较轻,光镜下见肺泡间隔增宽,部分肺泡结构被破坏,少量炎症细胞浸润(图 4C)。

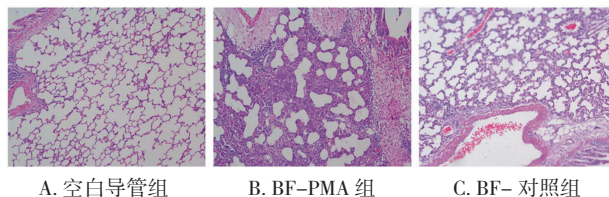


图 4 肺组织病理改变(HE 染色,100 $\times$)

2.5 血清学检测结果

ELISA 测定血清细胞因子水平,BF-PMA 组血清中 INF- γ 水平明显高于 BF-对照组,差异有统计学意义($Z=2.892, P=0.002$,表 1),IL-10 在 2 组间无统计学差异($t=0.260, P=0.800$,表 1)。INF- γ 与 IL-10 的比值,在 2 组间有统计学差

异,BF-PMA 组高于BF-对照组($t=2.690, P=0.023$,表 1)。

表 1 细胞因子 IFN- γ 、IL-10 血清浓度和两者的比值 (pg/mL)

	BF-PMA组	BF-对照组	Z/t 值	P 值
IFN- γ	134.984	124.203	2.892	<0.01
IL-10	66.810 $\pm$ 3.701	67.374 $\pm$ 3.821	0.260	>0.05
比值	2.082 70 $\pm$ 0.188 47	1.851 00 $\pm$ 0.094 30	2.690	<0.05

3 讨 论

P.a 是一种常见的革兰阴性条件致病菌,广泛存在于自然界并在人体定植,是导致免疫功能不全、长期使用呼吸机病人(如新生儿支气管肺发育不良)发生感染的常见致病菌^[6]。BF 是指细菌黏附于惰性或活性实体表面繁殖、分化并分泌大量胞外多聚基质使它们相互粘连,并将自身克隆聚集缠绕其中形成的膜状物,BF 可以使细菌群体耐药性增强,还可以协助细菌逃避宿主免疫作用^[2]。*P.a* 极易形成 BF,导致感染反复且难以清除^[6]。*P.a* 分为野生型和黏液型,野生型 *P.a* 在体内常发生黏液型转变^[3],且临床上慢性感染患者常常分离出黏液型的 *P.a*^[7]。黏液型以合成和分泌大量的藻酸盐为特点,藻酸盐对 BF 的形成和稳定其三维结构起着十分重要的作用,这种表型的 *P.a* 更加难以被机体和药物清除^[8]。

中性粒细胞是固有免疫的重要组成部分,是机体抵抗病原微生物入侵的第一道防线^[3]。中性粒细胞在细菌脂多糖等病原分子刺激下被激活,引发呼吸爆发,产生大量 ROS,如过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子、羟自由基、氢过氧基和单线态氧等^[3]。ROS 具有很强的氧化作用和细胞毒作用,可以杀灭游离的 *P.a*,但不能杀灭 BF 内的病原菌。然而过量的 ROS 对宿主造成损害,使得患者病情加重^[3]。Pacheco 等^[3]研究发现,中性粒细胞可以促进野生型 *P.a* BF 的密度感应系统所调控的致病因子鼠李糖脂的分泌。Salunkhe 等^[9]采用基因芯片分析发现 ROS 可影响野生型 *P.a* BF 的胞外基质、乳铁蛋白等多种基因的表达。这些研究提示,中性粒细胞不能有效杀灭 *P.a* BF,但是却可能对 *P.a* BF 有某些重要影响。然而,目前研究仅局限于中性粒细胞或者 ROS 对野生型 *P.a* BF 的作用,很少有研究探讨 ROS 对黏液型 *P.a* BF 的作用。近期,本课题组在体外实验发现中性粒细胞呼吸爆发或 ROS 可以促进黏液型 *P.a* BF 的生长^[10];但在体内,中性粒细胞呼吸爆发对 *P.a* BF 的作用仍需

探究。因此本实验通过建立大鼠气道黏液型 *P.a* BF 感染模型,在体内探讨中性粒细胞呼吸爆发对黏液型 *P.a* BF 的影响。

本研究采用附着 BF 的透明导管气管插管法建模,以方便观察中性粒细胞对黏液型 *P.a* BF 的作用^[3]。以 PMA 促进中性粒细胞呼吸爆发^[3],并采用推荐浓度以确保呼吸爆发增强^[5]。通过菌落计数检测 BF 内活菌数量和扫描电镜观测 BF 结构发现,当中性粒细胞呼吸爆发增强后 BF 的活菌数量较对照组明显增多,而且 BF 的结构也较对照组更复杂和紧密。这些结果提示,在体内,当中性粒细胞呼吸爆发增强后,黏液型 *P.a* BF 可能更加难以被机体清除。

藻酸盐是黏液型 *P.a* 最重要的胞外基质,对黏液型 *P.a* BF 三维空间结构的形成和稳定起着十分重要的作用,增强了 BF 对不利环境的抵抗能力和保护菌体的生存^[8]。尽管 *P.a* BF 耐药的确切机制尚未阐明,藻酸盐对生物膜的耐药性却起重要作用^[3]。此外,藻酸盐还可以抑制宿主对生物膜内细菌的特异性和非特异性免疫作用,协助膜内细菌产生免疫逃逸^[3]。因此本研究探讨了中性粒细胞呼吸爆发对藻酸盐合成的影响。结果提示中性粒细胞呼吸爆发增强后,黏液型 *P.a* BF 最重要的胞外基质藻酸盐合成增加,这与体外研究结果一致^[10]。此外,一些研究证实野生型 *P.a* 突变为黏液型的过程中,中性粒细胞呼吸爆发产生的活性氧扮演着重要角色^[3]。这些研究结果表明,中性粒细胞呼吸爆发不仅会促进 *P.a* 发生黏液型突变,在突变之后仍会促进藻酸盐的合成。

BF 感染会引起不同程度的炎性反应并受到多种细胞因子的调节^[3],IFN- γ ^[3]和 IL-10^[3]分别是主要的炎性因子和抗炎因子之一。Singh 等^[20]研究表明,肺部感染 *P.a* 时其病理改变和肺功能的恶化与 IFN- γ 的增高和 IL-10 的降低密切相关。本研究发现,虽然 IL-10 水平在 2 组中没有明显差异,但 IFN- γ 在实验组明显增高,且 IFN- γ 与 IL-10 的比值在 BF-PMA 组较 BF-对照组明显增高。同时,本研究也观测到 BF-PMA 组的病理改变较 BF-对照组也明显加重,表现为肺泡结构破坏更多、炎症渗出更明显。这表明中性粒细胞呼吸爆发增强后炎症反应和病理损害明显加重。

综上所述,本研究表明在体内中性粒细胞呼吸爆发增强后可能通过促进黏液型 *P.a* BF 的重要胞

外基质藻酸盐的合成,导致黏液型 *P.a* BF 清除更难,同时伴随更加严重的炎症反应和病理损害。为临床治疗干预黏液型 *P.a* BF 感染提供了新思路、新理论基础。

参 考 文 献

- [1] Wang F, He Q, Yin J, et al. BrlR from *Pseudomonas aeruginosa* is a receptor for both cyclic di-GMP and pyocyanin[J]. Nat Commun, 2018, 9:2563.
- [2] Fernández-Barat L, Torres A. Biofilms in ventilator-associated pneumonia[J]. Future Microbiol, 2016, 10:1599-1610.
- [3] Kong W, Zhao J, Kang H, et al. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(17):8268-8282.
- [4] Malhotra S, Limoli DH, English AE, et al. Mixed communities of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* exhibit enhanced resistance to host antimicrobials[J]. Am Soc Microbiol, 2018, 9(2):e275-218.
- [5] Rada B. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis[J]. Pathogens, 2017, 6(1):E10.
- [6] Yoo DG, Winn M, Pang L, et al. Release of cystic fibrosis airway inflammatory markers from *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated human neutrophils involves NADPH oxidase-dependent extracellular DNA trap formation[J]. J Immunol, 2014, 192(10):4728-4738.
- [7] Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion[J]. Adv Appl Microbiol, 2014, 86:1-40.
- [8] Pacheco GJ, Reis RS, Fernandes AC, et al. Rhamnolipid production: effect of oxidative stress on virulence factors and proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(6):1519-1529.
- [9] Salunkhe P, Topfer T, Buer J, et al. Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide[J]. J Bacteriol, 2005, 187(8):2565-2572.
- [10] Li F, Wang W, Hu L, et al. Effect of ambroxol on pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an endotracheal intubation rat model[J]. Chemotherapy, 2011, 57(2):173-180.
- [11] Ferry G, Lonchampt M, Pennel L, et al. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury[J]. FEBS Lett, 1997, 402(2-3):111-115.
- [12] Jain S, Ohman DE. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Infect Immun, 2005, 73(10):6429-6436.
- [13] Pedersen SS, Kharazmi A, Espersen F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response[J]. Infect Immun, 1990, 58(10):3363-3368.
- [14] Mulcahy LR, Isabella VM, and Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease[J]. Microb Ecol, 2014, 68(1):1-12.
- [15] Delgado C, Florez L, Lollett I, et al. *Pseudomonas aeruginosa* regulated intramembrane proteolysis: protease MucP can overcome mutations in the AlgO periplasmic protease to restore alginate production in nonmucoid revertants[J]. J Bacteriol, 2018, 200(16):1-43.
- [16] Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function[J]. J Bacteriol, 2001, 183(18):5395-5401.
- [17] Pazos MA, Lanter BB, Yonker LM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ExoU augments neutrophil transepithelial migration[J]. PLoS Pathog, 2017, 13(8):e1006548.
- [18] Khan Z, Shen XZ, Bernstein EA, et al. Angiotensin-converting enzyme enhances the oxidative response and bactericidal activity of neutrophils[J]. Blood, 2017, 130(3):328-339.
- [19] Yonker LM, Cigana C, Hurley BP, et al. Host-pathogen interplay in the respiratory environment of cystic fibrosis[J]. J Cyst Fibros, 2015, 14(4):431-439.
- [20] Tan Q, Ai Q, Xu Q, et al. Polymorphonuclear leukocytes or hydrogen peroxide enhance biofilm development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Mediators Inflamm, 2018:8151362.
- [21] van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, et al. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on silicone implants *in vivo*[J]. Infect Immun, 2012, 80(8):2601-2607.
- [22] Bednarska K, Olejniczak AB, Klink M, et al. Modulation of human neutrophil activity by adenosine modified with a carborane pharmacophore[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(14):3073-3078.
- [23] Stalhammar ME, Douhan Hakansson L, Sindelar R. Bacterial N-formyl peptides reduce PMA- and *Escherichia coli*-induced neutrophil respiratory burst in term neonates and adults[J]. Scand J Immunol, 2017, 85(5):365-371.
- [24] Moradali MF, Donati I, Sims IM, et al. Alginate polymerization and modification are linked in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Mbio, 2015, 6(3):e453-415.
- [25] McCaslin CA, Petrusca DN, Poirier C, et al. Impact of alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* on alveolar macrophage apoptotic cell clearance[J]. J Cyst Fibros, 2015, 14(1):70-77.
- [26] Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung[J]. Microbiology, 1999, 145(Pt 6):1349-1357.
- [27] Namkoong H, Ishii M, Fujii H, et al. Clarithromycin expands CD11b⁺Gr-1⁺ cells via the STAT3/Bv8 axis to ameliorate lethal endotoxin shock and post-influenza bacterial pneumonia[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(4):e1006955.
- [28] Feng L, Xiang Q, Ai Q, et al. Effects of quorum sensing systems on regulatory T cells in catheter-related *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection rat models[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016:4012912.
- [29] Singh S, Barr H, Liu YC, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulatory factor enhances the pro-inflammatory response of interferon- γ -treated macrophages to *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. PLoS One, 2015, 10(2):e0117447.

(责任编辑:张辉洁)