

围产医学

DOI: 10.11699/cyxh20131023

穿心莲内酯对临床铜绿假单胞菌感染人支气管上皮细胞的干预研究

王 静, 华子瑜, 沈 犁, 张佳星

(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、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:用铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)感染人支气管上皮细胞 BEAS-2B, 观察穿心莲内酯对细菌感染性肺炎及其诱发的宿主细胞炎症反应的影响。**方法:**PA 标准株 PAO1 和临床分离株 Cq1(*exoU*-)及 Cq40(*exoU*+)感染上皮细胞 BEAS-2B; 体外肉汤培养观察穿心莲内酯(浓度 300 $\mu\text{mol/L}$)对细菌生长的影响。侵袭实验、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)释放实验、菌落计数法检测 PA 对 BEAS-2B 细胞的侵袭力; ELISA 法检测 BEAS-2B 细胞炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8 的表达水平。穿心莲内酯(3.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 4.5 $\mu\text{mol/L}$)用于对 PA 感染人 BEAS-2B 的干预实验。**结果:**同 PAO1 相似, PACq1 及 Cq40 在 LB 培养基中的生长均不受高浓度(300 $\mu\text{mol/L}$)穿心莲内酯影响。但穿心莲内酯(3.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 4.5 $\mu\text{mol/L}$)降低侵入胞内的 PA 数, 减少细菌感染所致的上皮细胞 LDH 释放, 也降低了细菌刺激上皮细胞 IL-6 及 IL-8 的表达水平。**结论:**穿心莲内酯可降低 PA 临床分离株对人支气管上皮细胞的侵袭力, 并可降低细胞损伤及抑制细胞炎症反应。

【关键词】铜绿假单胞菌; 人呼吸道上皮细胞; 穿心莲内酯; 干预作用

【中国图书分类法分类号】R378.99+

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-15

Effects of andrographolide on infection of human bronchial epithelial cells caused by clinical strains of *pseudomonas aeruginosa*

WANG Jing, HUA Ziyu, SHEN Li, ZHANG Jiaxing

(Department of Neonatology, Key Laboratory of Child Development and Disorders Cofounded by Provincial Government and Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To infect human bronchial epithelial cell (BEAS-2B) model by *pseudomonas aeruginosa* (PA) and to observe andrographolide's effects on the bacterial infection ability and the host cell inflammatory response. **Methods:** PAO1 and clinical strains of PA, Cq1(*exoU*-) and Cq40(*exoU*+) were respectively used to infect BEAS-2B. In vitro lysogeny broth culture was conducted and the effect of andrographolide (300 $\mu\text{mol/L}$) on the bacterial growth was observed. PA invasive capability on BEAS-2B was tested by colony counting method. With double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), lactate dehydrogenase (LDH) releasing and inflammatory cytokines, interleukin-6 (IL-6) and IL-8 expression were measured. Pretreated by different concentrations of andrographolide (3.0 $\mu\text{mol/L}$ and 4.5 $\mu\text{mol/L}$), effects of andrographolide on BEAS-2B infection caused by different strains of PA were detected. **Results:** Similar to PAO1, high concentration (300 $\mu\text{mol/L}$) andrographolide exerted no impact on either *exoU* or *exoU*-PA growth. 3.0 $\mu\text{mol/L}$ and 4.5 $\mu\text{mol/L}$ andrographolide significantly reduced the intracellular colony number of PA, LDH releasing and generation of IL-6 and IL-8. **Conclusions:** Andrographolide can attenuate invasive effects of clinical strains of PA on human bronchial epithelial cell and reduce the related cell damage and inhibit inflammatory response.

【Key words】 *pseudomonas aeruginosa*; human bronchial epithelial cells; andrographolide; intervention effect

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)为革兰氏阴性杆菌, 是目前引起院内感染的主要病原

菌之一。该菌可致多种急、慢性感染, 严重威胁着高危人群(如婴儿、老人和免疫力低下的病人)的健康乃至生命。例如, 它可导致烧伤、免疫功能低下和机械通气患者发生肺炎、败血症、骨髓炎、心内膜炎和尿路感染等并发症^[1-4]。而肺部感染是导致肺囊性纤

作者介绍: 王 静, Email: wangjingbaiyi@126.com,

研究方向: 新生儿感染。

通信作者: 沈 犁, Email: shenli80@yahoo.com。

维化病人死亡的主要原因^[5]。PA 易于在肺囊性纤维化病人的肺气道表面形成生物膜,造成慢性感染。生物膜可保护细菌更加适应在宿主环境中生存,使其免受机体免疫系统的攻击、增强对抗生素的耐药性^[6]。研究表明:PA 的致病性关键与其产生众多毒力因子(包括Ⅲ型分泌系统效应分子 *ExoS*、*ExoY*、*ExoU*、*ExoT*)、形成生物膜和耐多种抗生素的能力有关^[7-8]。另一方面,上皮细胞受到细菌感染时合成释放一些炎性免疫介质如白细胞介素(interleukin, IL)-6 和 IL-8 等。而过量炎性免疫介质会介导组织病理损伤^[9-10]。随着 PA 泛耐药情况的日益突出,寻求有效治疗 PA 的措施和方法,包括减少细菌毒力、减少其诱发的损害性炎性反应,是包括临床医生在内的科研工作者的努力方向。据报道,提炼于植物穿心莲的有效成分——穿心莲内酯具有抗炎、抗生物膜、抗病毒和抗肿瘤等多种药理作用^[11-14]。本研究通过观察穿心莲内酯对 PA 感染呼吸道上皮细胞侵袭力、细胞乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)释放以及对细菌感染诱发宿主细胞炎症因子 IL-6 和 IL-8 表达的影响,探讨其抗菌、抗炎作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

穿心莲内酯、二甲基亚砜、庆大霉素及胎牛血清购自美国 Sigma。穿心莲内酯溶解于二甲基亚砜,故在使用穿心莲内酯的实验,均加以同样浓度的二甲基亚砜作对照。穿心莲内酯的使用浓度详见每一实验。噻唑蓝[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购于普利莱基因技术有限公司。Luria-Bertani LB 培养基(美国, Fisher Scientific), Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco (DMEM)培养基、胰蛋白酶(英国 hyclone), 酶标仪(BIO-RAD 550, 美国)和紫外分光光度计(Perkin Elmer Lambda Bio 40, 美国)。

1.2 细菌菌株及鉴定

PA 标准株 PA01(ATCC 9027)为本实验室保存。Cq1、Cq40 分离自重庆医科大学附属儿童医院住院的 2 名肺炎患儿的痰液。经 Phoenix 100 全自动细菌鉴定系统(美国 BD 公司)证实为 PA 株。经 PCR 鉴定 Cq1 带Ⅲ型分泌系统基因 *exoU*+ *exoS*- *exoT*+ *exoY*+, 而 Cq40 携带 *exoU*- *exoS*+ *exoT*+ *exoY*+

1.3 PA 生长曲线

LB 培养板划线分离出单菌落,挑取单菌落入 2 ml 的 LB 培养液中, 37 °C, 200 r/min, 过夜培养。将过夜培养液用新鲜的 LB 培养液以 1:1 000 稀释后取 2 ml/管, 设立不加药对照组(细菌稀释液)和穿心莲内酯组(穿心莲内酯 300 μmol/L)。将 2 组实验管放入细菌震荡培养床内(37 °C, 200 r/min)同时

培养。在不同的时间点(1.5、3、4、6、8、10、12、16、24 h 和 36 h)取菌液标本,测量其在波长为 600 nm 下的吸光度(absorbance, A)值。以时间为横坐标,菌液 A 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.4 细胞的培养

人支气管上皮细胞 BEAS-2B (ATCC® CRL-9609)为由本室保存。用含 10%胎牛血清和 2 mmol/L 谷氨酸的 DMEM 培养基(以下简称 DMEM-10), 37 °C, 5%CO₂ 条件下培养。为了制备 BEAS-2B 单层细胞, 0.25%胰蛋白酶消化的细胞用 DMEM-10 培养基稀释至浓度为 5×10^5 个/ml 的细胞悬液。将其接种至 96 孔培养板, 每孔接种 5×10^4 个细胞, 用于穿心莲内酯对 BEAS-2B 细胞的细胞毒作用检测。将其接种至 24 孔板, 每孔接种 2.5×10^5 个细胞, 用于检测穿心莲干预前后临床 PA 感染人支气管上皮细胞的侵袭力、LDH 释放量以及 IL-6 和 IL-8 表达水平。以上细胞培养板置于 37 °C, 5%CO₂ 孵箱中培养, 直至 80% 细胞融合。

1.5 MTT 检测穿心莲内酯对 BEAS-2B 细胞的细胞毒性

弃单层上皮细胞培养的上清, 加入不含有或含有不同浓度穿心莲内酯的 DMEM-10 培养基。同时设空白对照组和溶剂(二甲基亚砜)对照组。37 °C, 5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 小心吸弃上清, 加入含 MTT(0.5%)的新鲜培养基 100 μl, 培养 4 h, 弃上清, 加 150 μl/孔 DMSO, 低速震荡 10 min, 酶联免疫检测仪 A_{490 nm} 处测量 A 值。

1.6 细菌侵袭性测定

PA 接种 LB, 过夜震荡(37 °C, 200 r/min)培养。用 DMEM-10 以 1:50 将过夜菌种稀释后接种至细胞培养瓶, 37 °C, 5%CO₂ 孵箱静置培养 4 h, DMEM-10 调整各菌液 A_{600 nm}=0.2(活菌数约 2×10^8 CFU/ml)。待上述 24 孔板培养的上皮细胞 80% 融合后(见 1.4), 加入菌液 10 μl, 使细菌和细胞的比为 10:1, 加入不同浓度穿心莲内酯(详见结果)。在 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中孵育 60 min 后, 弃上清, 加入含 200 μg/ml 庆大霉素的培养基 500 μl, 继续孵育 60 min, 以杀死胞外菌。PBS 清洗 5 次后, 加入含 0.5% TritonX-100 的 PBS 500 μl, 移液器吹打以重悬, 以释放进入细胞的细菌。将重悬液按比例稀释后取 100 μl 接种至培养平板, 长出菌落后计数。

1.7 检测细胞 LDH 释放的浓度

用 DMEM-10 以 1:50 将过夜培养的 PA 稀释后接种至细胞培养瓶, 37 °C, 5%CO₂ 孵箱静置培养 4 h。用 DMEM-10 调整各菌液 A_{600 nm}=0.2 后, 加入菌液感染 BEAS-2B 细胞, 使细菌和细胞的比为 10:1。细胞在含有不同浓度穿心莲内酯 DMEM-10 培养基孵育 24 h(37 °C, 5%CO₂)后, 取培养上清, 存在 -80 °C, 直至使用。按 LDH 检测试剂盒(普利莱基因技术有限公司)厂商说明进行 LDH 测定。

1.8 检测细胞 IL-6 和 IL-8 的水平

获取细胞培养上清见 1.7。人 IL-6 和 IL-8 的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)检测试剂盒(欣博盛生物科技有限公司)。据试剂盒厂家提供的方法, 用 ELISA 法检测细胞表达 IL-6 以及 IL-8 水平。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 根据需要, 生长曲线部分采用双因素方差分

析,其余部分采用的是单因素方差分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cq1 和 Cq40 生长特性及穿心莲内酯对其影响的分析

Cq1 和 Cq40 自分离后经过少于 5 次传代。检测其在 LB 肉汤的生长情况,结果显示:Cq40 在 16 h 生长达峰值后,趋于下降;而 Cq1 与实验室菌株 PA01 的模式相似,生长 24 h 尚未达峰值。当暴露于 300 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯下,细菌的生长情况无明显变化,即 3 组细菌在使用穿心莲内酯前后进行对比,生长情况差异无统计学意义(其中 PA01 组中, $F=0.933$, $P=0.486$; Cq1 组中, $F=0.952$, $P=0.499$; Cq40 组中, $F=0.949$, $P=0.489$, $n=3$),见图 1。

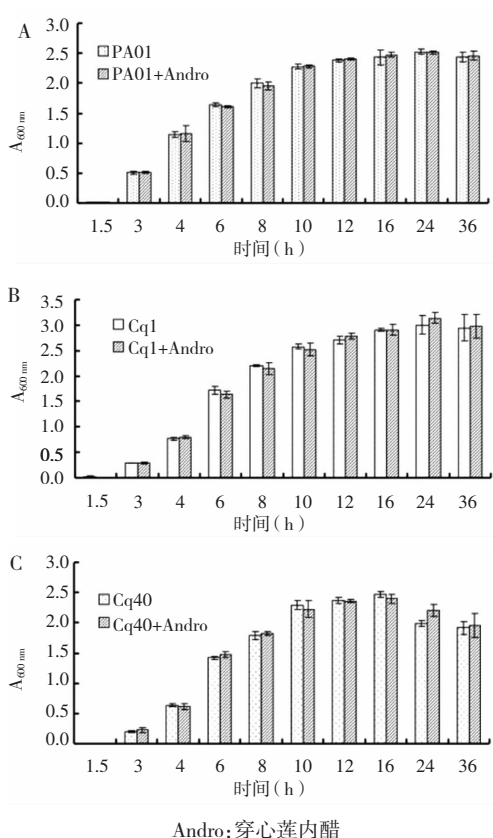


图 1 300 $\mu\text{mol/L}$ 的高浓度穿心莲内酯作用前后生长曲线
($P > 0.05$, $n=3$)

Fig.1 Role of high concentration (300 $\mu\text{mol/L}$) andrographolide on growth curve ($P > 0.05$, $n=3$)

2.2 低浓度穿心莲内酯对人支气管上皮细胞无明显细胞毒作用

既往报道,高浓度穿心莲内酯有潜在的细胞毒性作用。用 MTT 法检测不同浓度穿心莲内酯(0~15 $\mu\text{mol/L}$)对 BEAS-2B 细胞存活和生长的影响:BEAS-2B 细胞能耐受 0~10 $\mu\text{mol/L}$ 的穿心莲内酯;当穿心莲内酯大于 15 $\mu\text{mol/L}$ 时,成活的 BEAS-2B 明显减少($F=15.13$, $P=0.000$, $n=4$) (表 1)。此细

胞抑制作用随穿心莲内酯浓度增加而增强。据此结果,本研究所选用的穿心莲内酯浓度(3.0~4.5 $\mu\text{mol/L}$)对宿主细胞无毒性作用。故对 PA 感染人呼吸道上皮细胞的影响和作用不是由于其潜在的细胞毒性所致。

表 1 穿心莲内酯对人呼吸道上皮细胞 BEAS-2B 的细胞毒作用

Tab.1 Cytotoxic effects of andrographolide on human bronchial epithelial cells BEAS-2B

组别	例数 (n)	穿心莲内酯浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	A 值 ($\bar{x} \pm s$)
空白对照组	4	0.00	2.97 ± 0.16
溶剂对照组	4	0.00	2.96 ± 0.17
穿心莲内酯组	4	0.95	2.94 ± 0.21
	4	1.89	3.00 ± 0.11
	4	3.78	2.94 ± 0.11
	4	7.50	2.88 ± 0.40
	4	15.00	1.89 ± 0.12^a

注:a, $F=15.13$, $P=0.000$

2.3 低浓度穿心莲内酯对细菌侵袭力的影响

在侵袭实验中使用了含浓度为 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 的穿心莲内酯培养基,以检测穿心莲内酯对 PA 感染 BEAS-2B 细胞侵袭力的影响。如图 2A 所示,3.0 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯能使入侵胞内的细菌数明显下降[Cq1 组降至 $(1\ 090 \pm 101)$ CFU/ml, Cq40 组降至 $(1\ 060 \pm 196)$ CFU/ml],与未用药组比较差异有统计学意义(其中 Cq1 组, $F=33.5$, $P=0.000$; Cq40 组, $F=39.2$, $P=0.000$, $n=3$)。当穿心莲内酯浓度增至 4.5 $\mu\text{mol/L}$,其抑制细菌侵入的能力更强[Cq1 组进一步降至 (360 ± 45) CFU/ml, Cq40 组降至 (500 ± 36) CFU/ml],与未用药组比较差异有统计学意义(其中 Cq1 组, $F=40.7$, $P=0.000$; Cq40 组, $F=41.6$, $P=0.000$, $n=3$) (图 2A)。同样的,穿心莲内酯使得 BEAS-2B 细胞 LDH 的释放水平明显下降[Cq1 组降至 $(1\ 061.366 \pm 165.731)$ CFU/ml, Cq40 组降至 $(1\ 813 \pm 92.528)$ CFU/ml],与未用药组比较差异有统计学意义(其中 Cq1 组, $F=33.1$, $P=0.000$; Cq40 组, $F=29.2$, $P=0.000$, $n=3$) (图 2B)。故低浓度穿心莲内酯能抑制细菌对宿主细胞的侵袭力、降低其直接导致的细胞损害的能力。

2.4 穿心莲内酯降低了 PA 诱导的人支气管上皮细胞炎症因子 IL-6、IL-8 的生成

与 PA01 相似, Cq1 和 Cq40 可刺激 BEAS-2B 细胞,诱导炎症免疫介质 IL-6 和 IL-8 生成增加[IL-6: Cq1 组 (25.133 ± 0.204) pg/ml, Cq40 组 (12.495 ± 0.691) pg/ml; IL-8: Cq1 组 (593.866 ± 48.981) pg/ml, Cq40 组 (472.500 ± 48.350) pg/ml], 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯使得临床 PA 感染人支气管上皮细胞后 IL-6 和 IL-8 生成量明显下降[IL-6: Cq1 组降至 (17.577 ± 0.318) pg/ml, Cq40 组 (8.576 ± 0.657) pg/ml; IL-8: Cq1 组 (372.466 ± 3.265) pg/ml, Cq40 组 (339.600 ± 5.556) pg/ml],与未用药组比较差异有统计学意义(图 3A、图 3B, $P=0.000$, 其中 IL-6 Cq1 组 $F=21.8$, Cq40 组 $F=23.9$; IL-8 的 Cq1 组 $F=20.1$, Cq40 组 $F=21.1$, $n=3$),当其浓度增至 4.5 $\mu\text{mol/L}$,其作用能力更强[IL-6: Cq1 组 (8.865 ± 0.175) pg/ml, Cq40 组 $(3.761 \pm$

0.209) pg/ml; IL-8: Cq1 组 (215.266 ± 8.558) pg/ml, Cq40 组 (187.566 ± 3.677) pg/ml], 与未用药时比较差异有统计学意义 (图 3A、图 3B, $P=0.000$, 其中 IL-6 的 Cq1 组 $F=47.2$, Cq40 组 $F=44.4$; IL-8 的 Cq1 组 $F=39.7$, Cq40 组 $F=37.5$, $n=3$)。

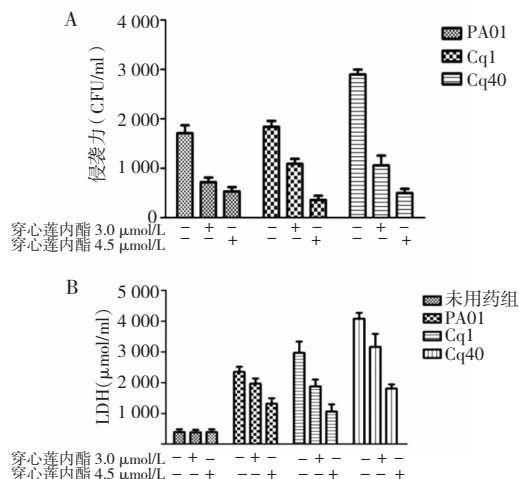


图2 穿心莲内酯对临床 PA 感染人支气管上皮细胞侵袭力和 LDH 释放水平的影响 ($P=0.000$, $n=3$)

Fig.2 Intervention effect of andrographolide on invasion ability and LDH release of human bronchial epithelial cell infected by clinical pseudomonas aeruginosa ($P=0.000$, $n=3$)

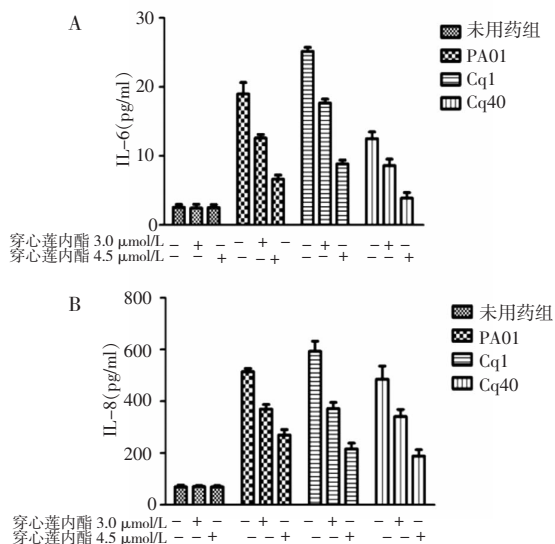


图3 穿心莲内酯对临床 PA 感染人支气管上皮细胞 IL-6 (A) 和 IL-8 (B) 生成量的影响 ($P=0.000$, $n=3$)

Fig.3 Intervention effect of andrographolide on IL-6 (A) and IL-8 (B) of human bronchial epithelial cell infected by clinical pseudomonas aeruginosa ($P=0.000$, $n=3$)

3 讨论

本研究以临床来源 PA 感染人支气管上皮细胞, 建立 PA 性肺炎的细胞模型, 更加真实地模拟宿

主细胞对细菌的反应。据相关报道^[15], T3SS 中的效应蛋白 *ExoU* 是一个强有力的磷脂酶, 能够导致所感染细胞迅速死亡。在急性 PA 性肺炎的肺损害中 *ExoU* 起关键作用^[16]。因此, 本研究选择含 *exoU*、*exoT* 和 *exoY* 的 Cq40 菌株 (*exoU*+) 及含 *exoS*、*exoT* 和 *exoY* 的 Cq1 菌株 (*exoU*-) 为实验对象, 研究其在细菌侵袭及致炎等方面的差异性。

实验结果显示, 临床 PACq40 (*exoU*+) 和 Cq1 (*exoU*-) 的生长模式高度类似, 说明 T3SS 毒力基因 *exoU* 的携带差异对细菌的生长无影响; 高浓度穿心莲内酯对不同毒力基因型的临床 PA 生长模式无明显影响, 提示穿心莲内酯对 PA 无杀菌作用。既往研究也有类似发现, 即穿心莲内酯对体外细菌的生长无影响^[17]; 也有研究显示穿心莲内酯可增强抗生素的抗菌效果^[18], 提示它可能通过其他途径实现其抗菌活性。

本实验证实, PACq40 (*exoU*+) 和 Cq1 (*exoU*-) 对细胞均具有侵袭力, 并可使得细胞释放 LDH 增多, 诱导细胞死亡以及合成表达大量炎症因子 IL-6 和 IL-8, 有学者在 PA 感染细胞模型中也发现了 IL-8 mRNA 水平的升高^[19]。同时本研究发现, Cq40 (*exoU*+) 菌株的细菌侵袭力及促细胞 LDH 释放能力均较 Cq1 (*exoU*-) 菌株强, 而 Cq1 (*exoU*-) 菌株的促炎症因子表达却较 Cq40 (*exoU*+) 强, 可能与 *exoU* 组菌株毒力强, 导致较多细胞死亡使炎症介质表达减弱有关。PA 感染动物的实验模型显示, *ExoU* 使感染宿主的血管通透性增加、血小板活性增强; 急性 PA 性肺炎, 细菌可侵入吞噬细胞内, 并通过 *ExoU* 的作用, 损害吞噬细胞, 而使得吞噬细胞吞噬细菌的能力减弱, 加重宿主组织的损伤程度^[20-21]。鉴于 *ExoU* 在 PA 感染及其细胞毒性中的重要作用, 有学者提出, 可将其作为判断临床转归及指导临床治疗的重要标记物^[22-23]。上述结果提示不同基因表型的 PA 在致病能力上存在差异。本研究拟对今后其进行更深入地研究。

穿心莲内酯作为一种低毒、安全且多药效的中药, 现已引起医学界的广泛关注。本实验显示, 穿心莲内酯能显著降低侵入胞内的 PA 数, 减少细菌感染所致的上皮细胞 LDH 释放, 说明穿心莲内酯能干预 PA 对细胞的侵袭, 降低细胞损伤程度。而且, 穿心莲内酯干预使 PA 诱导的上皮细胞 IL-6 及 IL-8 生成水平明显减少, 说明穿心莲内酯抗炎效果明显。已有关于穿心莲内酯干扰 PA 感染力的研究报道, 比如, 穿心莲内酯可以影响 PA 的密度感应系统^[24]; 也有学者认为穿心莲内酯可以协同抗生素, 增加细菌对抗生素的敏感性以增强其抗菌效果^[18, 25]。最近,

在脂多糖诱发的急性肺损伤小鼠模型中,穿心莲内酯通过抑制细胞核因子- κ B 信号通路的激活,明显减少肿瘤坏死因子- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达,以减少炎症因子的释放^[26]。因此,本研究中穿心莲内酯抑制 PA 对人支气管上皮细胞的毒性作用,提出可能与影响细胞核因子- κ B 信号通路等机制有关,这尚需进一步研究证实。

综上所述,T3SS 毒力效应分子的 *exoU* 基因型不同的 PA,对宿主细胞的毒性不同;穿心莲内酯对 PA 感染人支气管上皮细胞时表现出了强有力的干预作用,即显著减少细菌侵入,协同提升细胞的存活力、抑制炎症反应。因此,穿心莲内酯可能作为一种安全有效的新型抗炎药,为控制 PA 感染提供新方法。

参 考 文 献

- [1] Zhang M, Su S, Bhatnagar R K, et al. Prediction and analysis of the protein interactome in *Pseudomonas aeruginosa* to enable network-based drug target selection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41202.
- [2] Sharma A, Krause A, Xu Y, et al. Adenovirus-based vaccine with epitopes incorporated in novel fiber sites to induce protective immunity against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56996.
- [3] Streit J M, Jones R N, Sader H S, et al. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001)[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2004, 24(2): 111-118.
- [4] Hakki M, Limaye A P, Kim H W, et al. Invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections: high rate of recurrence and mortality after hematopoietic cell transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 39(11): 687-693.
- [5] Lyczak J B, Cannon C L, Pier G B. Lung infections associated with cystic fibrosis[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15(2): 194-222.
- [6] Kennedy P, Brammah S, Wills E. Burns, biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis[J]. *Burns*, 2010, 36(1): 49-56.
- [7] Shaver C M, Hauser A R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(12): 6969-6977.
- [8] el Baze P, Thyss A, Vinti H, et al. A study of nineteen immunocompromised patients with extensive skin lesions caused by *Pseudomonas aeruginosa* with and without bacteremia[J]. *Acta Derm Venereol*, 1991, 71(5): 411-415.
- [9] Cromwell O, Hamid Q, Corrigan C J, et al. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha[J]. *Immunology*, 1992, 77(3): 330-337.
- [10] Asokanathan N, Graham P T, Fink J, et al. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2002, 168(7): 3577-3585.
- [11] Mishra K, Dash A P, Dey N. Andrographolide: a novel antimalarial diterpene lactone compound from *Andrographis paniculata* and its interaction with curcumin and artesunate[J]. *J Trop Med*, 2011, 2011: 579518.
- [12] Subramanian R, Asmawi M Z, Sadikun A. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide[J]. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(2): 391-398.
- [13] Hidalgo M A, Romero A, Figueroa J, et al. Andrographolide interferes with binding of nuclear factor-kappa B to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 144(5): 680-686.
- [14] Han Y, Bu LM, Ji X, et al. Modulation of multidrug resistance by andrographolide in a HCT-8/5-FU multidrug-resistant colorectal cancer cell line[J]. *Chin J Dig Dis*, 2005, 6(2): 82-86.
- [15] Hauser A R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9): 654-665.
- [16] Howell H A, Logan L K, Hauser A R. Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. *MBio*, 2013, 4(2): e00032.
- [17] Li H T, Qin H M, Wang W H, et al. Effect of andrographolide on QS regulating virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(12): 1015-1017.
- [18] Zeng X, Liu X, Bian J, et al. Synergistic effect of 14-alpha-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.
- [19] de Lima C D, Calegari-Silva T C, Pereira R M, et al. ExoU activates NF-kappaB and increases IL-8/KC secretion during *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41772.
- [20] Machado G B, de Assis M C, Leao R, et al. ExoU-induced vascular hyperpermeability and platelet activation in the course of experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis[J]. *Shock*, 2010, 33(3): 315-321.
- [21] Diaz M H, Hauser A R. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(4): 1447-1456.
- [22] Machado G B, de Oliveira A V, Saliba A M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU induces a PAF-dependent impairment of alveolar fibrin turnover secondary to enhanced activation of coagulation and increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in the course of mice pneumosepsis[J]. *Respir Res*, 2011, 12: 104.
- [23] Veesenmeyer J L, Howell H, Halavaty A S, et al. Role of the membrane localization domain of the *Pseudomonas aeruginosa* effector protein ExoU in cytotoxicity[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(8): 3346-3357.
- [24] Ma L, Liu X, Liang H, et al. Effects of 14-alpha-lipoyl andrographolide on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(12): 6088-6094.
- [25] Wu C M, Cao J L, Zheng M H, 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.
- [26] Zhu T, Wang D X, Zhang W, et al. Andrographolide protects against LPS-induced acute lung injury by inactivation of NF-kappaB [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56407.

(责任编辑:冉明会)