

• 论 著 •

阿奇霉素对铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统 exoS 和 exoU 基因表达的影响^{*}

常彦斌,游灵玲,张晓兵[△]

重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016

摘要:目的 通过研究铜绿假单胞菌临床株Ⅲ型分泌系统基因 exoS、exoU 的分布情况与耐药性的关系以及阿奇霉素对菌株 exoS、exoU mRNA 表达的影响,为临床在相应菌株中应用阿奇霉素提供理论依据。**方法** 运用 PCR 检测 50 株临床分离的铜绿假单胞菌 exoS、exoU 基因分布情况,K-B 法研究这些细菌对常用抗菌药物的耐药率,用逆转录 PCR(RT-PCR)分析不同浓度阿奇霉素对铜绿假单胞菌 exoS、exoU mRNA 表达的作用。**结果** 50 株临床分离的铜绿假单胞菌中 36 株(72.00%)为 exoS 阳性,14 株(28.00%)为 exoU 阳性,无同时携带两种基因的菌株。exoU 阳性株对 10 种抗菌药物的耐药率高于 exoS 阳性株,环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率差异有统计学意义($P<0.05$)。用不同浓度阿奇霉素处理铜绿假单胞菌 exoS 阳性株后,exoS mRNA 相对表达水平高于空白对照水平,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时最高,随着药物浓度的增加,exoS mRNA 的相对表达水平逐渐下降至空白对照水平;不同浓度阿奇霉素处理 exoU 阳性株后,exoU mRNA 相对表达水平较空白对照组明显减低。**结论** 铜绿假单胞菌中毒力基因 exoU 的检出率低,exoU 阳性株耐药性相对较强,低浓度阿奇霉素能促进铜绿假单胞菌毒力基因 exoS mRNA 的表达,而抑制 exoU mRNA 的表达。

关键词:铜绿假单胞菌; Ⅲ型分泌系统; exoS; exoU; 阿奇霉素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.012 **中图法分类号:**R378;R446.5

文章编号:1673-4130(2021)13-1584-05 **文献标志码:**A

Regulation of expression of type Ⅲ secretion system-encoded exoS and exoU genes of pseudomonas aeruginosa by azithromycin^{*}

CHANG Yanbin, YOU Lingling, ZHANG Xiaobing[△]

Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective This study focus on the distribution of exoS, exoU in the pseudomonas aeruginosa clinical isolates, the susceptibility to commonly used antibiotics and the effect of azithromycin on the transcription of exoS and exoU, which provided a theoretical basis on azithromycin clinical treatment. **Methods** The distribution of exoS and exoU genes in 50 clinical isolates of pseudomonas aeruginosa was detected by PCR. The drug resistance rate of these bacteria to commonly used antibiotics was studied by K-B method. The effects of different concentrations of azithromycin on the mRNA expression of exoS and exoU in pseudomonas aeruginosa were analyzed by reverse transcription PCR (RT-PCR). **Results** Among 50 clinical isolates of pseudomonas aeruginosa, 36(72.00%) were exoS positive and 14(28.00%) were exoU positive. The resistance rate of exoU positive strains to 10 kinds of antibiotics was higher than that of exoS positive strains, and the difference between ciprofloxacin and levofloxacin was statistically significant ($P<0.05$). The expression of exoS mRNA in pseudomonas aeruginosa exoS positive strains treated with different concentrations of azithromycin was higher than that of the blank control, and reached the highest level at 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. with the increase of drug concentration, the expression of exoS mRNA gradually decreased to that of the blank control; the expression of exoU mRNA in pseudomonas aeruginosa exoS positive strains treated with different concentrations of azithromycin was significantly lower than that of the blank control. **Conclusion** The prevalence rates of isolates carrying exoU is lower in the pseudomonas aeruginosa clinical isolates, but the resistance rate is higher. Lower concentrations of azithromycin promote the mRNA expression of exoS and suppress the mRNA expres-

^{*} 基金项目:重庆市科委面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0253)。

作者简介:常彦斌,医师,主要从事铜绿假单胞菌的感染与治疗方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: xhpg85@aliyun.com。

本文引用格式:常彦斌,游灵玲,张晓兵.阿奇霉素对铜绿假单胞菌Ⅲ型分泌系统 exoS 和 exoU 基因表达的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(13): 1584-1588.

sion of *exoU* gene.

Key words: *pseudomonas aeruginosa*; type III secretion systems; *exoS*; *exoU*; azithromycin

铜绿假单胞菌(PA)是医院内感染和呼吸机相关性肺炎最常见的细菌^[1-5]。PAⅢ型分泌系统(T3SS)的发现是细菌致病机制研究的突出进展,其 T3SS 主要分泌 4 种毒力蛋白,即胞外酶(Exo)S、ExoT、ExoY、ExoU,细菌通过Ⅲ型分泌系统的导管装置把 T3SS 毒力因子注入细胞,诱导细胞坏死、凋亡^[6-10]。

据报道,群体感应(QS)系统抑制剂能减弱 PA 的毒力^[11],阿奇霉素能够影响 PA 的 QS 系统信号分子^[12-13]。本研究中,选择对 PA 毒力机制更为关键的毒力基因 *exoS* 和 *exoU* 作为研究对象^[14-15],通过 PCR 分析细菌 T3SS 毒力基因 *exoS* 和 *exoU* 的分布。用 K-B 纸片法研究细菌耐药情况,选取 *exoS*、*exoU* 阳性株通过 RT-PCR 方法研究阿奇霉素对铜绿假单胞菌 *exoS*、*exoU* mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 从本实验室自 2010—2019 年保存的临床菌株库中随机选择 50 株 PA,其中 38 株来自痰液,6 株来自尿液,5 株来自分泌物,1 株来自血液。使用 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定系统鉴定所有菌株到种。

1.2 抗菌药物药敏试验 通过 K-B 法测定 PA 对 10 种抗菌药物的耐药率。药敏纸片:头孢他啶、头孢吡肟、左氧氟沙星、环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、美罗培南均为英国 Oxoid 公司产品。MH 培养基由重庆庞通医疗器械有限公司提供。

1.3 *exoS*、*exoU* 基因检测 以煮沸法制备细菌总 DNA。用 PCR 方法检测 *exoS*、*exoU* 基因。依据 *exoS*(GenBank no. AE004091)和 *exoU*(GenBank no. AAC16023)的完整基因序列,采用 Primer 3 Plus 在线软件设计引物,引物由上海生工生物公司合成。引物序列见表 1。各靶基因 PCR 扩增体系:10 μmol/L 上、下游引物各 1.25 μL,10 mmol/L dNTPs 0.5 μL,5×PCR 反应缓冲液 5 μL,DNA 聚合酶 0.25 μL,总反应体积 25 μL(其中模板 5 μL),其余用双蒸水补足至 25 μL。PCR 检测 *exoS* 热循环参数:93 ℃ 预变性 5 min,然后 93 ℃ 60 s,55 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 检测 *exoU* 热循环参数:93 ℃ 预变性 5 min,然后 93 ℃ 45 s,57 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。对 PCR 扩增产物进行 2.00% 琼脂糖凝胶电泳,于紫外凝胶电泳成像仪下观察,并记录结果。

1.4 阿奇霉素处理细菌 T3SS 毒素诱导培养基^[16]:胰蛋白胨(Tryptone) 10 g,酵母浸膏粉(Yeast extract) 5 g,氯化钠(NaCl) 10 g,乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)1.902 g 溶于 1 L 蒸馏水,调节 pH 值至 7.0,

高压(1.034×10⁵ Pa)灭菌 20 min。随机选择 *exoS*、*exoU* 阳性菌株各 1 株,在 LB 培养基中 37 ℃ 水浴震荡培养过夜,次日取 0.1 mL 菌液加入含不同药物浓度的诱导培养基 5 mL 中 37 ℃ 水浴震荡 6~8 h,细菌生长 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0,取 1.0 mL 菌液加入 1.5 mL 无菌离心管,6 000 r/min 离心 5 min,收集细菌。

表 1 PCR 引物序列及预计产物长度		
目标基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
<i>exoS</i>	F:CCGGCATTCACTACGCGG	573
	R:GTTCGTGACGTCTTTCTTTTA	
<i>exoU</i>	F:GGGAATACTTTCCGGGAAGTT	428
	R:CGATCTCGCTGCTAATGTGTT	

1.5 RT-PCR 检测 *exoS*、*exoU* mRNA 相对表达水平 细菌总 RNA 的提取参照 EZgene™ bacterial RNA Kit(Biomiga 公司)操作说明进行。RT-PCR 试剂盒 mRNA selective PCR Kit(特异扩增 mRNA)购自 TaKaRa 公司。依据 *exoS*(GenBank no. AE004091)和 *exoU*(GenBank no. AAC16023)的编码序列,用 Primer 3 Plus 在线软件设计 RT-PCR 引物,引物由上海生工生物公司合成。引物序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物序列及预计产物长度		
目标基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
<i>exoS</i>	F:CCGGCATTCACTACGCGG	331
	R:AGAATCTCTTTTTCATTCTTG	
<i>exoU</i>	F:GGGAATACTTTCCGGGAAGTT	428
	R:CGATCTCGCTGCTAATGTGTT	
16S rRNA	F:TTCGGACCTCACGCTATCA	160
	R:TATTCCCCACTGCTGCCTC	

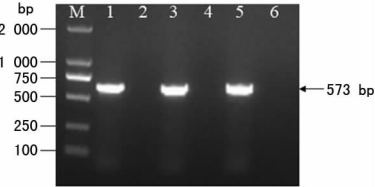
对 PCR 扩增产物进行 2.00% 琼脂糖凝胶电泳。将电泳凝胶置于凝胶图像分析系统,照相后,采用 Gel-Pro(USA)凝胶图像分析软件分析处理。PCR 产物量以积分光密度(IOD)表示扩增产物量,计算各 mRNA 与 16S rRNA 的比值,即为该 mRNA 的相对表达水平。

1.6 统计学处理 数据采用 SPSS22.0 统计软件处理。计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

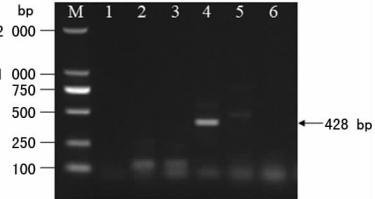
2.1 50 株 PA 临床株 *exoS*、*exoU* 基因的携带情况 PCR 检测 50 株临床分离 PA *exoS*、*exoU* 基因,结果 *exoS* 基因检测在 573 bp 有条带,部分菌株 PCR 产物的电泳结果见图 1,随机选择 1 株 PCR 阳性株进

行扩增出的测序和比对结果见图 3;exoU 基因检测在 428 bp 有条带,部分菌株 PCR 产物的电泳结果见图 2,随机选择 1 株 PCR 阳性株进行扩增出的测序和比对结果见图 4。50 株 PA 两种毒力基因的分布情况见表 3。



注:M 为 DNA Marker;1、3、5 泳道为 exoS 基因阳性 PA 临床株;2、4、6 泳道为 exoS 基因阴性 PA 临床株。

图 1 PA 临床株 exoS PCR 扩增电泳图



注:M 为 DNA Marker;1、2、3、5、6 泳道为 exoU 基因阴性 PA 临床株;泳道 4 为 exoU 基因阳性 PA 临床株。

图 2 PA 临床株 exoU PCR 扩增电泳图

2.2 exoS 与 exoU 阳性 PA 临床株对常用抗菌药物

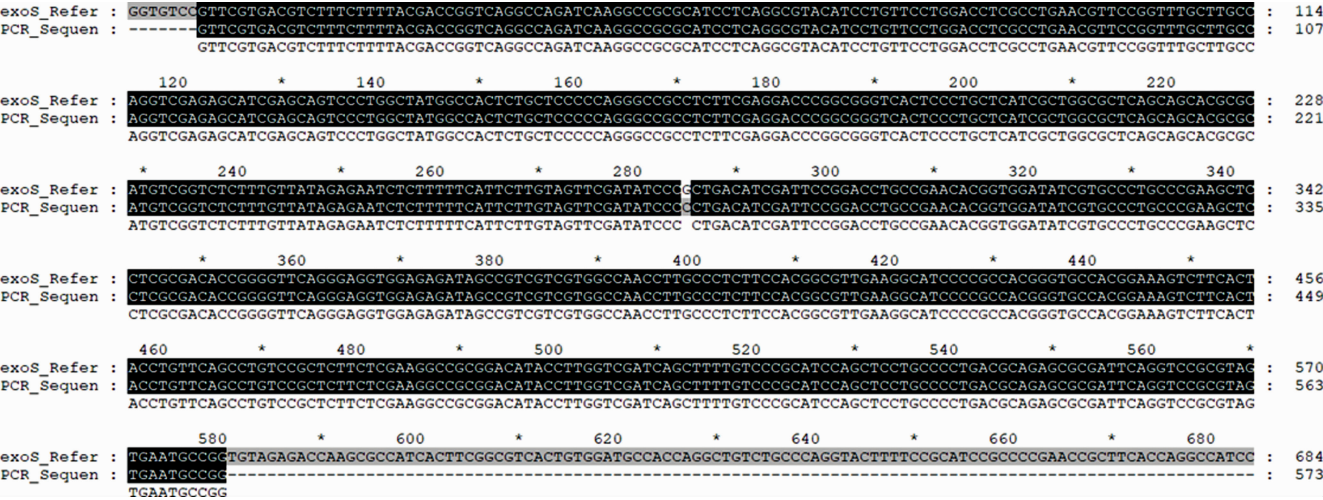


图 3 PA 临床株 exoS PCR 扩增的基因测序和序列比对图

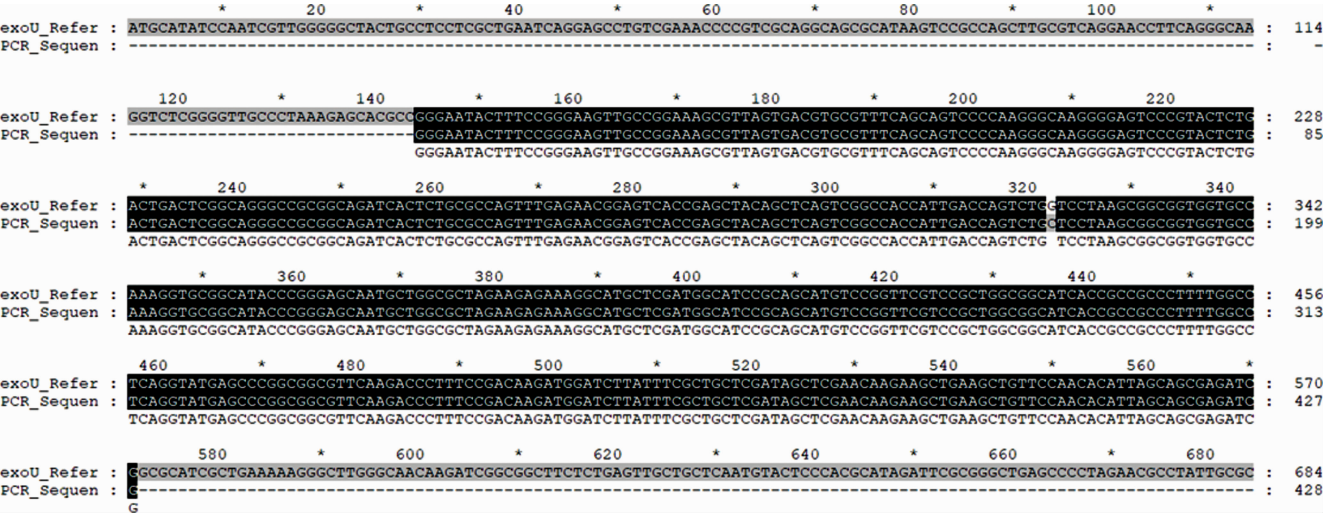


图 4 PA 临床株 exoU PCR 扩增的基因测序和序列比对图

2.3 不同浓度阿奇霉素对 exoS mRNA 相对表达水平的影响 用微量肉汤稀释法测得 exoS 基因阳性的 PA 阿奇霉素最低抑菌浓度(MIC)为 64 $\mu\text{g/mL}$,用 0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 的阿奇霉素作用于 exoS 基因阳性的 PA 临床

耐药情况 用 K-B 法分析 exoS 与 exoU 阳性 PA 对 10 种抗菌药物耐药情况,结果见表 4。从结果可以看出 exoU 阳性 PA 对 10 种抗菌药物的耐药率均高于 exoS 阳性株,其中环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率差异有统计学意义($P<0.05$)。

分离株。在实验中未观察到这些浓度的阿奇霉素对细菌生长的影响,通过 RT-PCR 检测 exoS mRNA 的相对表达水平,结果显示,exoS mRNA 的相对表达水平在阿奇霉素 4 $\mu\text{g/mL}$ 时最高,当阿奇霉素浓度增加时,exoS mRNA 逐渐下降至空白对照水平。见表 5。

表 3 50 株铜绿假单胞菌两种毒力基因分布(株)			
组别	exoS(+)	exoS(-)	合计
exoU(+)	0	14	14
exoU(-)	36	0	36
合计	36	14	50

表 4 exoS 与 exoU 阳性的两组 PA 对常用抗菌药物耐药率[n(%)]				
抗菌药物	exoS 阳性组 (n=36)	exoU 阳性组 (n=14)	χ^2	P
哌拉西林	19(52.80)	10(71.40)	1.439	0.230
哌拉西林/三唑巴坦	17(47.20)	9(64.30)	1.176	0.278
头孢他啶	13(36.10)	8(57.10)	1.830	0.176
头孢吡肟	10(27.80)	7(50.00)	2.218	0.187
亚胺培南	13(36.10)	6(42.80)	0.195	0.659
美罗培南	12(33.30)	6(42.80)	0.397	0.529
庆大霉素	28(77.80)	12(85.70)	0.397	0.704
阿米卡星	24(66.70)	11(78.60)	0.680	0.507
左氧氟沙星	8(22.20)	9(64.30)	7.948	0.008
环丙沙星	7(19.40)	8(57.10)	6.822	0.016

2.4 不同浓度阿奇霉素对 exoU mRNA 相对表达水平的影响 用微量稀释法测得 exoU 基因阳性的 PA 阿奇霉素 MIC 为 128 $\mu\text{g/mL}$,用 0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 的阿奇霉素作用于 exoU 基因阳性的 PA 临床分离株。在实验中未观察到这些浓度的阿奇霉素对细菌生长的影响,通过 RT-PCR 检测 exoU 基因 mRNA 相对表达水平,阿奇霉素作用 exoU 基因阳性的 PA 后 exoU mRNA 表达持续降低。见表 5。

表 5 不同浓度阿奇霉素作用于 exoS 基因阳性 PA 后 exoS 基因 mRNA 相对表达水平						
基因	0 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	8 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$
exoS	0.264 1	0.302 5	0.424 8	0.964 7	0.452 4	0.361 2
exoU	0.283 4	0.094 2	0.064 8	0.044 7	0.034 1	0.017 2

3 讨 论

PA 是一种在环境中普遍存在的革兰阴性杆菌,是院内感染和呼吸机相关性肺炎最常见病原菌之一,而抗菌药物的使用及滥用使细菌的耐药性逐渐增加,并且由于细菌毒力因子的释放^[17],许多重症肺炎患者只用敏感抗菌药物,所以往往不能改善疾病持续时间和严重程度^[18]。随着人们对细菌毒力机制理解的深入,毒力因子逐渐成为治疗细菌感染的新靶位。近几年发现,T3SS 广泛存在于 PA 中,与细菌的毒力机制密切相关。PA T3SS 主要分泌 4 种毒力因子:exoS、exoT、exoU、exoY,通过 T3SS 的导管装置可将毒力

因子转运至宿主细胞的细胞质,麻痹宿主细胞以促进 PA 感染^[19]。PA T3SS 毒力因子介导组织损伤、抑制伤口愈合,对 PA 的感染至关重要^[19]。本文研究了 50 株 PA T3SS 毒力基因 exoS 和 exoU 的分布情况,结果显示 72.00%菌株携带 exoS 基因,28.00%的携带 exoU 基因,无同时携带两种基因的菌株,与文献[20]报道类似。

本研究结果还显示,exoU 阳性 PA 株多为多重耐药菌,比 exoS 阳性株有更高的耐药性,这可能与 exoU 阳性株细胞膜上外排泵表达水平更高有关^[21-22]。有文献报道,PA exoU 阳性对喹诺酮类抗菌药物耐药性明显高于 exoS 阳性株^[21],这是由于药物靶位 gyrA 突变和外排泵过表达引起。但本研究中 exoU 阳性株只有 14 株,数量上远远少于 exoS 阳性株的 36 株,这些数量上的差异是否对本研究结果造成的误差,有待今后增加检测菌株数量后进一步确定。

大环内酯类抗菌药物通常不是抗 PA 的抗菌药物,然而近年来研究表明,大环内酯类抗菌药物在治疗 PA 感染的囊性纤维化、慢性阻塞性肺疾病和弥散性全细支气管炎患者中有良好效果^[23-24],其具体机制可能是大环内酯类抗菌药物具有一定的抗炎^[25]和抗细菌毒力作用^[13]。有研究表明,阿奇霉素是通过抑制 lasI/lasR 和 rhlI/rhlR 基因的转录,进一步抑制毒力因子的产生^[13,26]。本文通过 RT-PCR 分析了阿奇霉素对试验菌株毒力基因 exoS 和 exoU mRNA 表达的作用,结果表明低浓度阿奇霉素对 exoS mRNA 的表达有促进作用,阿奇霉素浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 时菌株 exoS mRNA 的相对表达水平最高,随着药物浓度的增加,exoS mRNA 的相对表达水平逐渐降低,而阿奇霉素对 exoU mRNA 的表达有抑制作用。有研究发现,阿奇霉素可以抑制 PA 大部分毒力基因的表达,并抑制细菌生物膜的形成^[13],但本文研究发现低浓度阿奇霉素具有促进 exoS mRNA 表达,而抑制 exoU mRNA 表达的作用,因此,与感染 exoS 阳性菌株患者相比,阿奇霉素可能对感染 exoU 阳性株的患者更有益。值得注意的是,低剂量阿奇霉素具有促进 PA exoS mRNA 表达作用,提示临床针对相应感染患者抗感染治疗时应严格按照规范服用该药,以便快速达到有效浓度,并在有效浓度范围维持足够时间。

参考文献

[1] TORRES A,NIEDERMAN M S,CHASTRE J,et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia; guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care

- Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociacion Latinoamericana del Torax (ALAT) [J]. *Eur Respir J*, 2017, 50(3):1700582.
- [2] FAURE E, KWONG K, NGUYEN D. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections; how to adapt within the host[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2416.
 - [3] MAURICE N M, BEDI B, SADIKOT R T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(4):428-439.
 - [4] MIYOSHI-AKIYAMA T, TADA T, OHMAGARI N, et al. Emergence and spread of epidemic multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Genome Biol Evol*, 2017, 9(12):3238-3245.
 - [5] FRANÇOIS B, LUYT CE, STOVER CK, et al. New strategies targeting virulence factors of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2017, 38(3):346-358.
 - [6] DENG W, MARSHALL N C, ROWLAND J L, et al. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(6):323-337.
 - [7] FOULKES D M, MCLEAN K, HANEEF A S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(12):707.
 - [8] MORROW K A, FRANK D W, BALCZON R, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme y; a promiscuous nucleotidyl cyclase edema factor and virulence determinant [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 238:67-85.
 - [9] WOOD S, GOLDFUSKY J, SHAFIKHANI S H. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT induces atypical anoikis apoptosis in target host cells by transforming Crk adaptor protein into a cytotoxin[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(5):e1004934.
 - [10] KROKEN A R, CHEN C K, EVANS D J, et al. The impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells is independent of fleQ and correlates with bistability of type three secretion system gene expression[J]. *mBio*, 2018, 9(3):e00668.
 - [12] ZENG J, ZHANG N, HUANG B, et al. Mechanism of azithromycin inhibition of HSL synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:24299.
 - [13] IMPERI F, LEONI L, VISCA P. Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Front Microbiol*, 2014, 5:178.
 - [14] OZER E A, NNAH E, DIDELOT X, et al. The Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of exoU+ and exoS+ lineages[J]. *Genome Biol Evol*, 2019, 11(1):1780-1796.
 - [15] HORNA G, AMARO C, PALACIOS A, et al. High frequency of the exoU+/exoS+ genotype associated with multidrug-resistant "high-risk clones" of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):10874.
 - [16] KIM J, AHN K, MIN S, et al. Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Microbiology (Reading)*, 2005, 151(11):3575-3587.
 - [17] SKINNER C, ZHANG G, PATFIELD S, et al. An in vitro combined antibiotic-antibody treatment eliminates toxicity from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(9):5435-5444.
 - [18] HAUSER A R, MECSAS J, MOIR D T. Beyond antibiotics: new therapeutic approaches for bacterial infections [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(1):89-95.
 - [19] KAMINSKI A, GUPTA K H, GOLDFUSKY J W, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS induces intrinsic apoptosis in target host cells in a manner that is dependent on its gap domain activity[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):14047.
 - [20] WEI L, WU Q, ZHANG J, et al. Prevalence, virulence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from drinking water in China [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:544653.
 - [21] SULLIVAN E, BENSMAN J, LOU M, et al. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(1):48-56.
 - [22] SAWA T, SHIMIZU M, MORIYAMA K, et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review [J]. *Crit Care*, 2014, 18(6):668.
 - [23] PALJETAK H C, TOMASKOVIC L, MATIJASIC M, et al. Macrolide hybrid compounds: drug discovery opportunities in anti-infective and anti-inflammatory area [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(8):919-940.
 - [24] KELLY C, CHALMERS J D, CROSSINGHAM I, et al. Macrolide antibiotics for bronchiectasis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 3:CD012406.
 - [25] FAN L C, LIN J L, YANG J W, et al. Macrolides protect against *Pseudomonas aeruginosa* infection via inhibition of inflammasomes [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313(4):L677-L686.
 - [26] KOSTYLEV M, KIM D Y, SMALLEY N E, et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(14):7027-7032.

(收稿日期:2020-09-20 修回日期:2021-06-10)