

# 人脐带间充质干细胞对耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性形成的影响

郑璇儿<sup>1</sup> 杨杰<sup>1</sup> 穆小萍<sup>2</sup> 赖卫明<sup>2</sup> 许芳<sup>1</sup> 刘晓虹<sup>1</sup> 杨浩鸣<sup>1</sup> 杨淑梅<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 探讨人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)体外对耐亚胺培南铜绿假单胞菌(IRPA)耐药性形成及对OprD2基因的影响。**方法** 本实验设立3个组,实验组为hUCMSCs组,对照组为细胞对照组(即人肺成纤维细胞组,NHLF组)和空白对照组。次抑菌浓度肉汤诱导PA耐药传代过程中,hUCMSCs组和NHLF组分别加入其与PA共培育所得的上清液,空白对照组加入细胞培养液,观察3组诱导耐药所需代数以及抑菌圈的大小。诱导耐药前后分别采用K-B法及real-time PCR法测定PA对常见抗菌药物的敏感性及其OprD2基因的表达量。**结果** 经次抑菌浓度的亚胺培南诱导后,hUCMSCs组PA耐药性的出现较NHLF组及空白对照组延迟。NHLF组和空白对照组PA于诱导的第17代出现亚胺培南耐药,而hUCMSCs组PA于第19代出现耐药性。real-time PCR结果显示,诱导耐药后PA中OprD2表达量较诱导前出现减少或消失。其中hUCMSCs组PA OprD2的表达量减少至诱导耐药前的10.96%,而NHLF及空白对照组OprD2无表达,即诱导后出现OprD2基因缺失。**结论** 人脐带间充质干细胞具有延迟PA耐药性形成的作用,其机制可能是通过分泌抗菌肽LL-37和人 $\beta$ 防御素-2从而抑制OprD2表达的减少,而外膜蛋白OprD2表达量减少或缺失是引起PA对亚胺培南耐药的原因。

**【关键词】** 铜绿假单胞菌; 耐药性; 人脐带间充质干细胞; 抗菌肽

**Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the development of the drug resistance of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*** Zheng Xuan'er<sup>1</sup>, Yang Jie<sup>1</sup>, Mu Xiaoping<sup>2</sup>, Lai Weiming<sup>2</sup>, Xu Fang<sup>1</sup>, Liu Xiaohong<sup>1</sup>, Yang Haoming<sup>1</sup>, Yang Shumei<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Neonatology, <sup>2</sup>Clinical Laboratory, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 510010, China

Corresponding author: Yang Jie, Email: jasje\_yang@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) in vitro on the development of the drug resistance of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and on OprD2 gene. **Methods** This experiment included three groups: experiment group (hUCMSCs group), control group (cells control group, namely normal human lung fibroblast, NHLF group) and blank control group. During the conductive process of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) drug resistance induced by sub-inhibitory concentrations of broth, the hUCMSCs group and the NHLF group were added with the supernatants obtained from their joint cultivation with PA, respectively; while the blank control group was administrated with cell culture medium. The numbers of generations required by induced drug resistance in the three groups and the sizes of inhibition zones were observed. The sensitivity of PA to common antibacterial agents and the expression quantity of OprD2 gene were determined by K-B method and real-time PCR method. **Results** Through the induction of sub-inhibitory concentration of imipenem, the occurrence of PA drug resistance in the hUCMSCs group was relatively later than that of the blank control group. Imipenem drug resistance appeared in passage 17 of PA induced in the NHLF group and the blank control group, while it occurred in passage 19 in the hUCMSCs group. The results of real-time PCR showed that after the induction of drug resistance, the expression quantity of OprD2 in PA decreased or disappeared compared with that before the induction. The expression quantity of OprD2 in PA in the hUCMSCs group was reduced to 10.96% of the induction, while there were no OprD2 expression in the NHLF and the blank control group, OprD2 gene deletion occurred after the induction. **Conclusions** hUCMSCs could delay the formation of PA's

drug resistance. This mechanism is probably through reducing the inhibition of the expression of OprD2 by secreting antimicrobial peptide LL-37 and human  $\beta$ -defensin 2 (HBD-2), and the decrease or deletion of the expression of outer membrane protein OprD2 is the cause for PA's drug resistance to imipenem.

**【Key words】** *Pseudomonas aeruginosa*; Drug resistance; Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs); Antimicrobial peptides

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 感染在新生儿中的发病率及病死率较高; PA对多种抗菌药物耐药, 给临床治疗带来极大难题<sup>[1-4]</sup>。外膜上的孔蛋白通道或脂质通道是抗菌药物通过的桥梁<sup>[5-6]</sup>。OprD2被认为是亚胺培南进入PA的通道<sup>[7-10]</sup>。研究发现, PA对亚胺培南的耐药机制主要包括外膜蛋白OprD2表达缺失以及产生金属 $\beta$ -内酰胺酶两方面。本课题组前期研究发现, 人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 可通过分泌抗菌肽LL-37和HBD-2达到抑制耐亚胺培南铜绿假单胞菌生长的作用<sup>[11]</sup>。而目前国内外尚无关于干细胞与细菌耐药性方面的相关报道。本研究旨在探讨hUCMSCs体外对耐亚胺培南铜绿假单胞菌 (imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, IRPA) 耐药性形成的影响及对外膜蛋白OprD2基因的影响, 为耐药菌防治提供新策略, 为进一步研究hUCMSCs的功能及对细菌耐药性的具体形成机制奠定基础, 现报道如下。

## 材料和方法

### 一、材料

1. 实验菌株: 铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC27853, 由我国卫生部临床检验中心提供。

2. 实验细胞: 人脐带间充质干细胞购自于天津卫凯生物有限公司; 人肺成纤维细胞人肺成纤维细胞组 (normal human lung fibroblast, NHLF) 购自于广州吉妮欧生物科技有限公司, 扩增两种细胞至第5~10代时用于本研究。

3. 实验试剂: 所有药敏纸片均购自于英国 OXOID公司。亚胺培南粉末购自于杭州默沙东制药有限公司。Cathelicidin/LL-37 ELISA Kit和HBD-2 ELISA Kit购自于加拿大HCB公司。Bacterial RNA kit购自于美国Omega公司, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit以及Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix购自于立陶宛Fermentas公司。

### 二、方法

实验组为hUCMSCs组, 对照组为细胞对照组 (人肺成纤维细胞, normal human lung fibroblast,

NHLF) 和空白对照组。在次抑菌浓度肉汤诱导PA耐药传导过程中, hUCMSCs组和NHLF组分别加入其与PA共培育的上清液, 空白对照组加入细胞培养液, 观察三组诱导耐药所需代数以及抑菌圈的大小。在诱导耐药前后分别采用K-B法及Real-time PCR法测定PA对常见抗菌药物的敏感性及其OprD2基因的表达量。

1. 药敏试验: 采用纸片法扩散法 (K-B法) 对亚胺培南、阿米卡星、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦、美罗培南和氨基糖苷类6种抗菌药物进行敏感性测定, 并用微量肉汤法对亚胺培南进行最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定。抑菌圈及MIC判定标准参照2012年版CLSI M100-S22规定<sup>[12]</sup>。

2. 细胞悬液的制备: 将传代至第5~10代的hUCMSCs及NHLF用PBS洗涤2~3次后用胰酶 (美国Gibco公司) 消化, 加入完全培养基终止消化并离心 (1000 r/min、5 min), 再用细胞培养基[RPMI (美国Hyclone公司) + 5%胎牛血清 (美国Gibco公司)]重悬细胞, 调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

3. 上清液提取: 先将血平板生长35 °C过夜菌 (铜绿假单胞菌ATCC27853) 用PBS稀释成0.5麦氏单位, 再采用PBS将上述菌悬液进行1: 5 000稀释后备用, 稀释后菌液浓度约为 $3 \times 10^4$  CFU/ml。取3份菌悬液随机分为hUCMSCs实验组、NHLF对照组和空白对照组, 每份各100  $\mu\text{l}$ , hUCMSCs组加入hUCMSCs悬液 (细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) 2 ml、NHLF对照组加入NHLF悬液 (细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) 2 ml, 空白对照组加入细胞培养基2 ml。3组充分混匀后放置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中共培育。6 h后将共培育液进行离心 (14 000 r/min、10 min) 过滤去除细胞成分后收集上清液, -20 °C冻存备用。

4. Cathelicidin/LL-37及HBD-2水平的测定: 采用Cathelicidin/LL-37 ELISA Kit及HBD-2 ELISA Kit检测共培育6 h后上清液中Cathelicidin/LL-37及HBD-2的水平。

5. 菌株诱导试验: 参照文献<sup>[13]</sup>稍作改动, 采用次抑菌浓度肉汤传代诱导法。将细菌接种于2 ml脑心浸液肉汤管中, 35 °C过夜培养待用。将50  $\mu\text{l}$  过夜培养的菌悬液接种在含1/4 MIC亚胺培南的脑

心浸液肉汤(5 ml)中培养传代,每隔24 h转种传代1次,在每1代传代过程中,hUCMSCs实验组加入hUCMSCs与PA共培育后获得的上清液200  $\mu$ l,NHLF对照组加入NHLF与PA共培育后提取的上清液200  $\mu$ l,空白对照组加入细胞培养液200  $\mu$ l,直至菌株对亚胺培南出现耐药性。在传代过程中,每传代1次即将细菌转种于血琼脂平板上,进行1次细菌的鉴定以排除操作过程中由于操作不当引起的污染,同时采用K-B法测定亚胺培南的敏感性,直到药敏试验结果显示PA对亚胺培南耐药即停止诱导。

6. PCR引物的设计与合成:引物序列根据Genbank公布的基因序列,使用软件Primer 6.0软件设计,由广州吉格生物科技有限公司合成。具体引物序列见表1。

7. real-time PCR检测:按照Bacterial RNA kit(美国Omega公司)提取细菌RNA后进行琼脂糖凝胶电泳,选择条带好的RNA样品进行下一步实验。RT反应体系(20  $\mu$ l):总RNA为1  $\mu$ g,Random Hexamer Primer 1  $\mu$ l,无核酸酶试剂 10  $\mu$ l,5 $\times$ 反应缓冲液 4  $\mu$ l,RiboLock™ RNase Inhibitor 1  $\mu$ l,转录酶 1  $\mu$ l,10 mmol/L dNTP mix 2  $\mu$ l。RT反应条件:25  $^{\circ}$ C、5 min,42  $^{\circ}$ C、60 min,70  $^{\circ}$ C、5 min。real-time PCR反应体系(20  $\mu$ l):2 $\times$  Master mix 10  $\mu$ l,上游引物 0.3  $\mu$ l,下游引物 0.3  $\mu$ l,cDNA 0.8  $\mu$ l,无核酸酶试剂 8.6  $\mu$ l。反应使用8连管,以1个孔中加入双蒸水替代逆转录得到的模板cDNA为阴性对照,设置组恒定表达的基因16S RNA为内参,每个PCR反应设置两个复孔。所有PCR反应非同时重复两次。反应步骤:95  $^{\circ}$ C、10 min;95  $^{\circ}$ C、15 s,60  $^{\circ}$ C、30 s,72  $^{\circ}$ C、15 s,95  $^{\circ}$ C、15 s,40个循环;熔解曲线60  $^{\circ}$ C开始。

### 三、统计学处理

应用SPSS 17.0软件对实验获得的抗菌肽

(Cathelicidin/LL-37,HBD-2)水平的相关数据进行统计处理,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 $q$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

一、经PA刺激后,hUCMSCs组分泌抗菌肽水平显著升高

hUCMSCs实验组、NHLF细胞对照组、空白对照组与PA共培育6 h后上清液中抗菌肽水平的测定结果详见表2。hUCMSCs实验组上清液中Cathelicidin/LL-37、HBD-2的水平均较NHLF对照组及空白对照组高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示经过PA刺激后,hUCMSCs组分泌抗菌肽Cathelicidin/LL-37和HBD-2的水平显著升高。

二、人脐带间充质干细胞对PA耐药性的影响

经次抑菌浓度的亚胺培南诱导后,NHLF对照组和空白对照组均于诱导的第17代出现亚胺培南耐药。

三、铜绿假单胞菌株诱导前后对常见药物敏感性的变化

经诱导后,原来对抗菌药物均敏感的PA标准菌株对亚胺培南的抑菌圈直径显著下降,达耐药范围。同时,NHLF及空白对照组中PA株对美罗培南出现交叉耐药,其抑菌圈范围显著减少,而hUCMSCs组对美罗培南抑菌圈范围虽较诱导前缩小,但是根据CLSI判断标准,属于中介范围。3组PA株诱导耐药前后对阿米卡星、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦和氨曲南的敏感性并未因亚胺培南而改变,详见表3。

四、诱导耐药前后PA总RNA提取结果

抽提PA菌株总RNA后,应用紫外分光光度计

表1 内参基因与目的基因引物序列

基因	序列	产物大小(bp)
16S RNA	F: TAGGTGGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATC R: TGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGC	174
OprD2	F: ACCTAGCCTCCTATGGCGTTCCC R: CGAGGTTGGTTTCGTGGTGCTT	150

表2 三组共培育后上清液中抗菌肽的水平( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

组别	株数	Cathelicidin/LL-37	HBD-2
hUCMSCs实验组	5	5.90 $\pm$ 0.51	1.77 $\pm$ 0.25
NHLF对照组	5	3.98 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
空白对照组	5	3.09 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	0.63 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>

注:与NHLF对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,与空白对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$



测波长为260 nm和280 nm处的吸光度值,  $A_{260}/A_{280}$  为1.8~2.0, RNA浓度高, 纯度好。4个样品RNA的琼脂糖凝胶电泳图如图2所示, 可见RNA特征带23S RNA、16S RNA和5S RNA条带完整, 显示提取的总RNA质量可靠。

# 五、OprD2基因表达水平检测结果

将诱导耐药前后的PA菌株, 采用real-time PCR方法检测OprD2基因的mRNA表达水平, 以诱导前的PA菌株(即原始菌株)中的基因水平作为对照, 表达差异的比较采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。结果显示, 经药物诱导后对亚胺培南耐药的菌株中OprD2基因mRNA的表达水平显著降低或消失, 其中NHLF对照组和空白对照组的OprD2基因表达量已缺失, hUCMSCs组的基因表达量下降最小, 结果见图3~5。

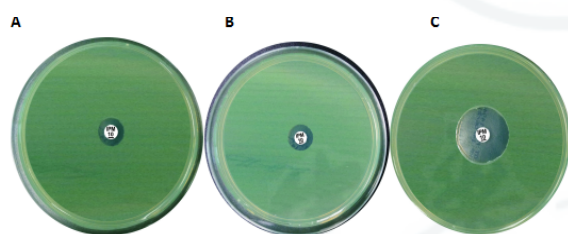
# 讨 论

铜绿假单胞菌引起的急性或慢性感染往往治疗难度大, 且具有多种耐药机制, 是引起院内获得性肺炎多重耐药革兰阴性菌的代表性菌株<sup>[14-16]</sup>。鉴于新生儿铜绿假单胞菌感染的难治性及严峻性, 寻求常见抗菌药物以外的可以有效抵制耐药菌感染及其耐药基因形成的物质已成为相关基础研究和临床治疗迫在眉睫的任务。

本研究通过探讨hUCMSCs与细菌耐药性的相

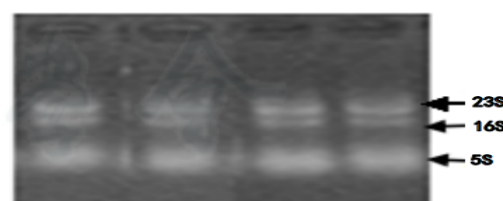
关性果发现, 体外诱导耐药实验中加入hUCMSCs与PA共培育获得的上清液的实验组耐亚胺培南铜绿假单胞菌株的出现较NHLF对照组和空白对照组延迟。ELISA检测各组上清液进行抗菌肽(Cathelicidin/LL-37、HBD-2)水平结果发现, hUCMSCs实验组的上清液中抗菌肽(Cathelicidin/LL-37和HBD-2)水平较两对照组显著升高。real-time PCR结果显示, 经药物诱导后, 对亚胺培南耐药的菌株中OprD2基因mRNA的表达水平显著降低或消失, 其中NHLF对照组和空白对照组的OprD2基因表达量已缺失, hUCMSCs组基因表达量下降至诱导前的10.96%, 下降幅度最小。以上结果均提示, hUCMSCs具有延迟PA耐药性形成的作用, 其机制可能是通过分泌抗菌肽LL-37和HBD-2从而起到抑制OprD2表达减少的作用, 而外膜蛋白OprD2表达量减少或缺失是引起PA对亚胺培南耐药的主要原因。

间充质干细胞具有抗炎及免疫调节作用<sup>[17-18]</sup>, 而hUCMSCs是间充质干细胞的一类, 来源于脐带血液、脐带静脉内皮下层、血管周围细胞和沃顿胶中分离所得<sup>[19-23]</sup>, 同样保持了间充质干细胞的生物学特性及功能, 且相对于其他来源的间充质干细胞而言, 具有来源丰富、取材方便、不存在伦理学争议、非致瘤性及低免疫原性等特点, 具有更大的发展潜能及应用前景。本课题组前期研究结果表明, hUCMSCs可通过分泌抗菌肽LL-37和HBD-2而起到抑制耐亚胺培南铜绿假单胞菌生长的作用, 而这些



注: A: NHLF对照组对亚胺培南抑菌圈直径d = 12 mm; B: 空白对照组PA对亚胺培南抑菌圈直径d = 12 mm; C: hUCMSCs组PA对亚胺培南抑菌圈直径d = 20 mm (黑色直线双箭头表示抑菌圈直径大小)

图1 三组PA诱导传代至P17时对亚胺培南的敏感性比较



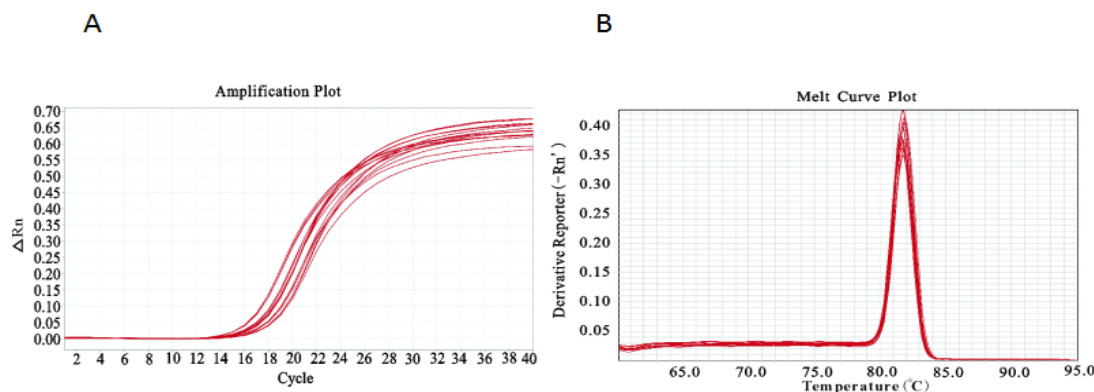
注: 从左到右依次为原始PA、空白对照组诱导后的PA、NHLF对照组诱导后的PA和hUCMSCs组诱导后的PA提取的RNA

图2 PA总RNA电泳图

表 3 诱导耐药前后 PA 株对常见抗菌药物的抑菌圈大小 (mm)

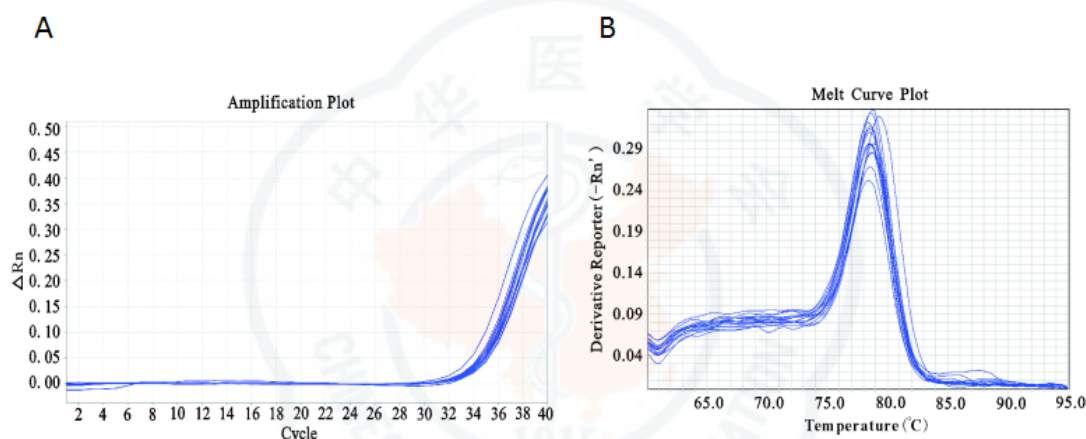
组别	IPM	AK	CAZ	TZP	MEM	ATM
诱导前原始菌株	25	26	25	30	26	27
诱导后hUCMSCs组	13*	27	26	29	18	25
诱导后NHLF对照组	12*	26	27	29	13*	26
诱导后空白对照组	12*	26	25	28	14*	25

注: IPM: 亚胺培南, AK: 阿米卡星, CAZ: 头孢他啶, TZP: 哌拉西林/他唑巴坦, MEM: 美罗培南, ATM: 氨基糖苷, \*表示为对该抗菌药物耐药



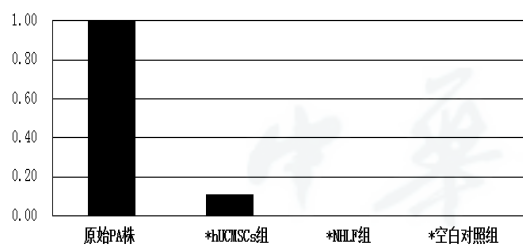
注: A: 内参基因扩增曲线图; B: 内参基因熔解曲线图

图3 内参基因扩增曲线与熔解曲线图



注: A: OprD2基因扩增曲线图; B: OprD2基因熔解曲线图

图4 OprD2基因的扩增与熔解曲线图



注: 以诱导前原始PA株OprD2基因的表达量为1, \*为诱导耐药后的PA株, 其中hUCMSCs组OprD2基因的表达比NHLF对照组及空白对照组高, 而NHLF对照组及空白对照组PA的OprD2基因表达量降为0

图5 PA菌株诱导耐药前后OprD2基因表达水平

抗菌肽存在于其共培养的上清液中<sup>[5]</sup>。因此, 本研究通过获取hUCMSCs与PA共培养所得上清液作为实验组进行实验, 并设立细胞对照组和空白对照组, 结果发现, NHLF对照组及空白对照组诱导至第17代时铜绿假单胞菌出现对亚胺培南的耐药, 而hUCMSCs组诱导至第19代时出现对亚胺培南的耐药。提示

hUCMSCs具有延迟或抑制PA对亚胺培南耐药性形成的作用, 为临床耐药菌防治提供新的方向, 为进一步研究耐药分子机制提供一定的理论基础。

为进一步探讨其抑制耐药的机制, 本研究通过采用real-time PCR法检测诱导耐药前及耐药后3组PA菌株中OprD2基因的表达量。结果显示, 诱导耐药后PA株中OprD2表达量较诱导前出现减少或消失。其中hUCMSCs组OprD2的表达量出现减少, 而NHLF及空白对照组的PA株在诱导后OprD2的表达出现缺失。这证实了OprD2的缺失在IRPA耐药性形成中的意义, 也进一步提示了hUCMSCs可能是通过抑制OprD2基因的缺失而达到抑制或延迟PA耐药性出现的作用。Tamber等<sup>[24-25]</sup>曾报道, 当外膜蛋白OprD2缺失或表达减少时, 可引起PA对亚胺培南耐药。Ochs等<sup>[7]</sup>通过对耐亚胺培南的PA转入带有OprD2编码基因的质粒后, PA对亚胺培南恢复了敏感性; 这在一定程度上支持本研究结果。

本研究通过对上清液抗菌肽水平进行检测发现, 虽然hUCMSCs组的抗菌肽水平显著升高, 但NHLF对照组亦可检测到LL-37和HBD-2的表达,

而最终诱导耐药实验结果却表明, hUCMSCs组PA耐药性出现较对照组迟。其原因可能是hUCMSCs受病原微生物刺激后, 其表达抗菌肽的能力显著较NHLF强, 且本研究仅对LL-37和HBD-2两种抗菌肽水平进行检测, 而未对其他的抗菌肽或细胞因子进行检测, 可能hUCMSCs尚有分泌其他各类可对抗细菌感染的抗菌肽或细胞因子的能力。

新生儿免疫功能不成熟, 各种抗体含量不足, 使其免疫力处于较低水平, 是导致其容易发生内源性或外源性感染的主要原因。而新生儿感染性疾病是导致新生儿死亡的重要疾病, 寻求可有效抵制细菌感染及防止耐药菌形成的物质是其救治成功的关键。抗菌肽, 亦称宿主防御肽, 如LL-37和HBD-2, 是先天免疫系统的重要组成部分, 具有广泛的抗微生物活性。而来源于脐带组织的hUCMSCs, 具有分泌抗菌肽的能力, 且可以延迟铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药性的形成, 这为人类抵制及控制感染性疾病提供新的方向。由于本研究仅对1株PA进行诱导耐药实验, 选用的标本量少, 有待扩大标本量进行实验研究进一步证实。另外, 本研究仅为单纯的体外试验, 而体内环境比体外环境要复杂得多, 该结果是否适用于体内的环境仍需进一步探讨, 仍需进行大量动物实验和临床研究验证。

综上所述, 本研究认为人脐带间充质干细胞具有延迟PA耐药性形成的作用, 其机制可能是通过分泌抗菌肽LL-37和HBD-2从而起到抑制OprD2表达减少的作用, 而外膜蛋白OprD2表达量减少或缺失是引起PA对亚胺培南耐药的主要原因。

### 参 考 文 献

- 1 Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials[J]. Front Microbiol, 2014, 4(1):422.
- 2 Bas AY, Demirel N, Zenciroglu A, et al. Nosocomial blood stream infections in a neonatal intensive care unit in Ankara, Turkey[J]. Turk J Pediatr, 2010, 52(5):464-470.
- 3 Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010, 8(1):71-93.
- 4 Boyle DP, Zembower TR. Epidemiology and management of emerging drug-resistant Gram-negative bacteria: extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and beyond[J]. Urol Clin North Am, 2015, 42(4):493-505.
- 5 Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794(5):808-816.
- 6 Knopp M, Andersson DI. Amelioration of the fitness costs of antibiotic resistance due to reduced outer membrane permeability by upregulation of alternative porins[J]. Mol Biol Evol, 2015, 32(12):3252-3263.
- 7 Ochs MM, McCusker MP, Bains M, et al. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD2 selective for imipenem and basic amino acids[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(5):1085-1090.
- 8 Samanta S, Scorciapino MA, Ceccarelli M. Molecular basis of substrate translocation through the outer membrane channel OprD of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Phys Chem Chem Phys, 2015, 17(37):23867-23876.
- 9 Arabestani MR, Rajabpour M, Yousefi Mashouf R, et al. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR[J]. Arch Iran Med, 2015, 18(2):102-108.
- 10 Richardot C, Plésiat P, Fournier D, et al. Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 45(5):529-532.
- 11 刘晓虹. 人脐带间充质干细胞对耐亚胺培南铜绿假单胞菌生长的抑制作用[D]. 广州: 广州医学院, 2013.
- 12 Franklin R, Matthew A, Jeff Alder, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Second informational supplement[S]. [M100-S22]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010, 31(1):161-163.
- 13 Miller K, O'Neill AJ, Chopra I. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(6):925-934.
- 14 Parker CM, Kutsogiannis J, Muscedere J, et al. Canadian Critical Care Trials Group. Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes[J]. J Crit Care, 2008, 23(1):18-26.
- 15 Ghanshani R, Gupta R, Gupta BS, et al. Epidemiological study of prevalence, determinants, and outcomes of infections in medical ICU at a tertiary care hospital in India[J]. Lung India, 2015, 32(5):441-48.
- 16 El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(2):229-238.
- 17 Marigo I, Dazzi F. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells[J]. Semin Immunopathol, 2011, 33(6):593-602.
- 18 Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells[J]. Trends Mol Med, 2012, 18(2):128-134.
- 19 Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population[J]. Stem cells, 2008, 26(3):591-599.
- 20 Frausin S, Viventi S, Verga Falzacappa L, et al. Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research[J]. Acta Histochem, 2015, 117(4-5):329-338.
- 21 Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow[J]. Stem Cells, 2007, 25(6):1384-1392.
- 22 Heo JS, Choi Y, Kim HS, et al. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(1):115-125.
- 23 Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord[J]. Methods Cell Biol, 2008, 86:101-119.
- 24 Tamber S, Ochs MM, Hancock RE. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol, 2006, 188(1):45-54.
- 25 Li H, Luo YF, Williams BJ, et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies[J]. Int J Med Microbiol, 2012, 302(2):63-68.

(收稿日期: 2015-07-23)

(本文编辑: 孙荣华)

郑璇儿, 杨杰, 穆小萍, 等. 人脐带间充质干细胞对耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性形成的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2016, 10(2):248-253.