

香青兰提取物对临床来源病原菌的抑制活性及生物信息学研究[△]

刘云^{1*}, 刘敏¹, 于慧², 王占黎^{2#} (1. 包头医学院研究生学院, 内蒙古包头 014060; 2. 包头医学院第二附属医院检验科, 内蒙古包头 014030)

中图分类号 R285; R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0666-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.06

摘要 目的: 研究香青兰不同萃取部位对临床来源病原菌的体外抑制活性, 并挖掘其可能抗菌机制。方法: 香青兰药材经65%乙醇提取后, 依次以石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 得不同极性萃取部位。以肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌等临床常见多重耐药病原菌为对象, 采用纸片扩散法测定不同萃取部位的抑菌圈直径, 筛选抑菌活性部位; 采用琼脂倍比稀释法检测抑菌活性部位对上述病原菌的最小抑菌浓度(MIC), 并采用比浊法绘制该部位作用下多重耐药金黄色葡萄球菌的生长曲线; 利用PEAKS[®] Q 8.5软件筛选抑菌活性部位组与对照组的差异表达蛋白, 借助Blast 2 GO、KOBAS 3.0在线软件对其进行基因本体(GO)分析和KEGG信号通路富集分析。结果: 香青兰石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇部位对革兰氏阴性杆菌均无明显的抑制作用, 乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等多种革兰氏阳性球菌均具有不同程度的抑制活性(抑菌圈直径为10~16 mm), 为抑菌活性部位。该部位对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌的MIC均为0.781 3 mg/mL, 对腐生葡萄球菌的MIC为0.390 7 mg/mL, 对溶血葡萄球菌和金黄色葡萄球菌标准菌株的MIC均为1.562 5 mg/mL。1、2倍MIC的乙酸乙酯部位可抑制多重耐药金黄色葡萄球菌的生长, 且抑制活性有随剂量增加而增强的趋势。共筛选出差异表达蛋白300个($P < 0.01$), 其中表达上调239个、表达下调61个。差异表达蛋白主要集中于细胞、细胞部位等细胞组成以及代谢过程、细胞过程和催化活性、蛋白结合等生物过程和分子功能, 且主要富集于不同环境中的微生物代谢和果糖与甘露糖代谢等两条信号通路上($P < 0.05$)。结论: 香青兰乙酸乙酯部位为抑菌活性部位, 其抑菌活性可能与影响微生物代谢和细菌糖代谢有关。

关键词 香青兰; 乙酸乙酯部位; 抑菌圈; 最小抑菌浓度; 差异表达蛋白; 生物信息学分析

Study on Inhibitory Activity of *Dracocephalum moldavica* Extracts to Clinical Pathogenic Bacteria and Its Bioinformatics

LIU Yun¹, LIU Min¹, YU Hui², WANG Zhanli² (1. Graduate School, Baotou Medical College, Inner Mongolian Baotou 014060, China; 2. Dept. of Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Inner Mongolian Baotou 014030, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study inhibitory activity of different extracts of *Dracocephalum moldavica* to clinical pathogenic bacteria, and to excavate its possible antibacterial mechanism. **METHODS:** After extraction by 65% ethanol and extraction by petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, the different polar fractions of *D. moldavica* were obtained. Taking *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and other clinical multiple resistant pathogens as objects, the diameter of inhibition zone of different extraction fractions was measured by paper diffusion method, and the antibacterial active fraction was screened. The minimal inhibitory concentration (MIC) of antibacterial active fraction to common clinical pathogens was determined by agar dilution method; the growth curve of MRSA was drawn by turbidimetric method. The differentially expressed protein between antibacterial active fraction group and control group was screened by PEAK[®] Q 8.5 software, and the gene ontology (GO) analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis were carried out by Blast 2 GO and KOBAS 3.0 online software. **RESULTS:** Petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol fraction of *D. moldavica* had no significant inhibitory effect on Gram-negative bacteria. The ethyl acetate fraction of *D. moldavica* had antibacterial activity in varying degrees against several kinds of Gram-positive bacteria as *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*; the diameter of inhibition zone was 10-16 mm, which was the active fraction. MICs of ethyl acetate fraction to *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. hominis* were all 0.781 3 mg/mL; MIC to *S. saprophyticus* was 0.390 7 mg/mL; MICs to *S. saprophyticus* and standard strain of *S. aureus* were both 1.562 5 mg/mL. The 1, 2 times MIC of ethyl acetate could inhibit the growth of MRSA, and the inhibitory activity increased with the increase of dose. A total of 300 differentially expressed proteins were screened ($P < 0.01$), of which 239 were up-regulated and 61 were down-regulated. The differentially expressed proteins were mainly concentrated in cell sites such as cells, cellular component, etc., and in metabolic process such as cell process, biological process and molecular functions such as catalytic activity, protein binding, etc. They were mainly concentrated in microbial metabolism in different environments, fructose

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81260478, No.816-60048)

* 硕士研究生。研究方向: 天然药物、病原微生物感染与免疫。E-mail: 997487421@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 天然药物、病原微生物感染与免疫。E-mail: wang.zhanli@hotmail.com

and mannose metabolism signaling pathway ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: The ethyl acetate fraction of *D. Moldavica* is the antibacterial active fraction, and its activity may be related to the microbial metabolism and cell glycometabolism.

KEYWORDS *Dracocephalum moldavica*; Ethyl acetate extract; Inhibition zone; Minimal inhibitory concentration; Differentially expressed protein; Bioinformatic analysis

香青兰(*Dracocephalum Moldavica* Linn.)为唇形科青兰属1年生植物,分布于我国华北、西北和东北等地。作为民族药,民间常以其干燥地上部位入药。研究发现,香青兰富含黄酮类、挥发油类、糖类、氨基酸类、萜类和微量元素等多种成分,具有改善心肌缺血、降低血液黏度和血小板聚集率、抗脂质过氧化损伤等作用,可用于心脑血管疾病等的临床治疗^[1-2]。

天然产物由于其来源广泛、不易耐药等优点成为近年来抗菌药物研究的热点之一。既往研究显示,香青兰挥发油具有抗菌、抗流感病毒的作用^[3];同时有研究表明,植物中大多数抑菌活性物质均为次生代谢产物,其中黄酮类化合物受到国内外学者的普遍关注^[4-6]。本课题组在前期研究的基础上,以临床来源的多重耐药病原菌为对象,对其乙醇提取物各萃取部位的抗菌活性进行筛选,并对差异表达蛋白进行基因本体(GO)功能富集和KEGG信号通路分析,以初步挖掘其潜在抗菌机制,为香青兰抑菌活性的研究提供物质基础和科学依据。

1 材料

1.1 仪器

MCO-18AC型CO₂培养箱(日本Panasonic公司);Phoenix™ 100型全自动微生物鉴定及药敏系统(美国BD公司);iMarK型酶标仪(美国Bio-Rad公司);Easy-nLC 1000型纳升级高效液相色谱(HPLC)系统、Q-Exactive型质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);750型超声仪(美国Sonics公司);RE-2000A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-III型循环式真空泵(上海知信实验仪器技术有限公司);DZKW-S-8型电热恒温水浴锅(上海科恒实业发展有限公司);BSC-1500 II B2-X型生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司);TG16-WS型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);HZ系列恒温振荡器(江苏省太仓市实验设备厂);MLS-3780型高压灭菌锅(日本Sanyo公司)。

1.2 药材与试剂

供试药材由内蒙古通辽市扎鲁特旗产野生香青兰种子经人工培育所得,并经包头医学院公共卫生学院靳敏副教授鉴定为唇形科植物香青兰(*D. Moldavica* Linn.)的地上部位。药材经粉碎后,取适量样品粉末保存于包头医学院公共卫生学院。

哥伦比亚血琼脂培养基(济南百博生物技术股份有限公司);MH琼脂培养基(温州市康泰生物科技有限公司);LB培养基(本实验室自制);药敏纸片(英国Oxoid

公司);Protease inhibitor cocktail蛋白酶抑制剂(美国APEX BIO Technology公司);pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS,北京博迈德基因技术有限公司);0.9%氯化钠注射液(贵州科伦药业有限公司,作生理盐水用);十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、二甲基亚砷(DMSO)、无水乙醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 菌株

供试病原菌肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、腐生葡萄球菌(*S. saparophyticus*)、人葡萄球菌(*S. hominis*)、溶血葡萄球菌(*S. haemolyticus*)均为临床检出多重耐药菌,由包头医学院第二附属医院检验科提供;金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)由国家卫生健康委员会临床检验中心提供。

2 方法

2.1 不同溶剂萃取物供试溶液的制备

取香青兰药材,粉碎,称取粉末100 g,加入65%乙醇1 000 mL,于60℃水浴中加热提取2 h,滤过,残渣按上述方法再提取1次;合并滤液,减压浓缩至无醇味,得乙醇提取物。取上述提取物依次使用同体积石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取2次,合并相同萃取部位,减压浓缩干燥,得石油醚部位0.766 1 g、二氯甲烷部位1.402 8 g、乙酸乙酯部位0.916 g、正丁醇部位0.913 5 g。取各部位样品适量,用DMSO稀释,制成质量浓度均为250 mg/mL(以提取部位质量计,下同)的溶液,即得不同溶剂萃取物供试溶液。

2.2 药敏试验

供试菌株经革兰氏染色初步分类后,采用全自动微生物鉴定及药敏系统鉴定菌种,以纸片扩散法、琼脂倍比稀释法等进行药敏试验,严格按照美国临床和实验室标准协会(CLSI)2017年标准^[7]操作并判定结果。

2.2.1 抑菌圈测定 采用纸片扩散法^[7]。将含有不同溶剂萃取物供试溶液(250 mg/mL,剂量参考本课题组前期预试验结果设定)20 μL的无菌药敏纸片置于含标准量病原菌接种物(1.5×10^8 CFU/mL)的MH琼脂培养基中,并以DMSO为阴性对照,于37℃、5% CO₂条件下培养18 h,使用游标卡尺测量药敏纸片周围的抑菌圈直径,以筛选具有抗菌活性的萃取部位。判定标准——抑菌圈

直径 < 10 mm, 无抑菌作用; 10 mm, 轻度敏感; 11~15 mm, 中度敏感; ≥ 16 mm, 高度敏感^[7]。

2.2.2 最小抑菌浓度(MIC)测定 采用琼脂倍比稀释法^[7]。精密称取“2.2.1”项下具有抗菌活性的萃取部位适量, 用MH琼脂培养基稀释, 制成质量浓度分别为12.5、6.25、3.125、1.562 5、0.781 3、0.39、0.195、0.097 6 mg/mL的含药平皿。同时, 以无菌生理盐水配制0.5麦氏浊度单位的病原菌菌悬液, 再用无菌生理盐水稀释至含菌量 1×10^6 CFU/mL, 取上述菌悬液5 μ L, 于10 min内接种于MH琼脂培养基中, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养18 h后观察结果, 以平皿表面光滑且未见菌落生长时对应的质量浓度作为该萃取部位的MIC。

2.2.3 细菌生长曲线绘制 采用比浊法^[8]。取对数生长期多重耐药金黄色葡萄球菌适量, 用LB培养基稀释至 1×10^6 CFU/mL, 加入“2.2.1”项下具有抗菌活性的萃取部位适量, 使其最终质量浓度分别为MIC的0.5、1、2倍, 并设置未经萃取部位处理的菌悬液作为空白对照, 于37 $^{\circ}$ C恒温振荡器上以180 r/min培养, 每2 h取样200 μ L, 用酶标仪于630 nm波长处检测光密度(OD)值, 以培养时间为横坐标、OD_{630 nm}值为纵坐标, 采用Excel 2016绘制多重耐药金黄色葡萄球菌的生长曲线。

2.3 生物信息学分析

2.3.1 蛋白提取 以LB培养基配制0.6麦氏浊度单位的多重耐药金黄色葡萄球菌菌悬液, 再用LB培养基稀释10倍, 将菌悬液随机分为药物组和对照组。其中, 药物组加入“2.2.1”项下具有抗菌活性的萃取部位供试溶液(250 mg/mL)适量, 使其最终质量浓度为MIC的2倍; 对照组加入等体积DMSO, 充分混匀, 于37 $^{\circ}$ C恒温振荡器上以151 r/min培养24 h后, 以3 000 r/min离心10 min, 弃去上清液, 沉淀用PBS清洗2 mL \times 2次后, 于-80 $^{\circ}$ C保存并送至上海易算生物科技有限公司检测。

2.3.2 蛋白酶解 取各组蛋白样品, 加入裂解液(含2% SDS、7 mmol/L尿素、1 \times Protease inhibitor cocktail, 以水为溶剂)适量, 超声(功率: 200 W, 频率: 53 kHz)处理5 min, 冰上裂解30 min, 于4 $^{\circ}$ C下以15 000 r/min离心15 min, 收集上清液。

2.3.3 蛋白分析 取“2.3.2”项下上清液适量, 采用纳升级HPLC系统进行分离, 并采用质谱仪进行质谱分析。色谱条件: 色谱柱为Acclaim PepMap C₁₈(150 mm \times 7.5 mm, 3 μ m); 流动相为水(A)-乙腈(含0.1%甲酸, B), 梯度洗脱(0~120 min, 3% B \rightarrow 32% B); 初始平衡时间为10 min; 流速为300 nL/min; 柱温为60 $^{\circ}$ C; 进样量为10 μ L。质谱条件: 离子源为电喷雾离子源; 离子源电压为2 kV; 毛细管温度为320 $^{\circ}$ C; 扫描模式为数据依赖模式

(DDA); 扫描范围为 m/z 350~1 550。

2.3.4 生物学功能分析 使用PEAKS[®] Q 8.5软件(加拿大BSI公司)对蛋白及肽段进行定量并对定量值作归一化处理, 取中位数作为平均数。筛选药物组和对照组蛋白表达量(即对应肽段的信号强度)差异倍数>2.0且 $P < 0.01$ 的蛋白作为差异表达蛋白。采用Blast 2 GO在线软件(<https://www.blast2go.com/>)对差异表达蛋白进行GO蛋白质功能注释, 并选取蛋白表达量高且 $P < 0.05$ 的前10位生物信息绘制Bar图; 使用KOBAS 3.0在线工具(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)对差异表达蛋白进行KEGG信号通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为显著富集, 并对富集通路进行注释和分析。

3 结果

3.1 香青兰提取物抑菌活性部位筛选结果

抑菌圈检测结果显示, 香青兰石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等4个提取部位对肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌等4种革兰氏阴性杆菌均无明显的抑制作用; 二氯甲烷部位对金黄色葡萄球菌轻度敏感, 乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌等革兰氏阳性球菌均具有不同程度的抑制作用(抑菌圈直径为10~16 mm), 为抑菌活性部位, 故以乙酸乙酯部位作为后续试验的干预物。香青兰提取物各萃取部位的抑菌圈直径见表1。

表1 香青兰提取物各萃取部位的抑菌圈直径(mm)

Tab 1 Inhibition zone diameters of different extracts of *D. moldavica* (mm)

萃取部位	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	腐生葡萄球菌	人葡萄球菌	溶血葡萄球菌	金黄色葡萄球菌标准菌株
石油醚部位	0	0	0	0	0	0
二氯甲烷部位	10	0	0	0	0	11
乙酸乙酯部位	16	11	10	12	13	11
正丁醇部位	0	0	0	0	0	0

3.2 香青兰提取物乙酸乙酯部位的MIC

乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌的MIC均为0.781 3 mg/mL, 对腐生葡萄球菌的MIC为0.390 7 mg/mL, 对溶血葡萄球菌和金黄色葡萄球菌标准菌株的MIC均为1.562 5 mg/mL。

3.3 细菌生长曲线

多重耐药金黄色葡萄球菌的生长曲线见图1。在0~4 h内, 该菌生长处于迟缓期; 培养4 h后, 空白对照组和0.5倍MIC组菌株进入对数生长期, 并于10 h后进入稳定期; 而1倍MIC组和2倍MIC组菌株增长缓慢, 未见明显的对数生长期。

3.4 差异表达蛋白分析

共筛选出300个差异表达蛋白($P < 0.01$), 其中239个表达上调、61个表达下调。

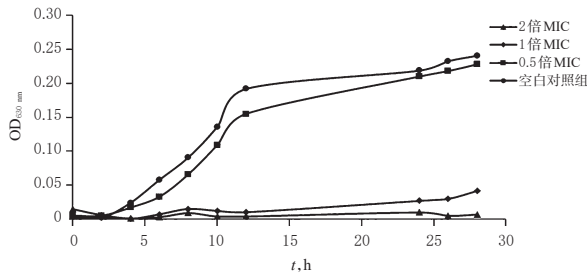
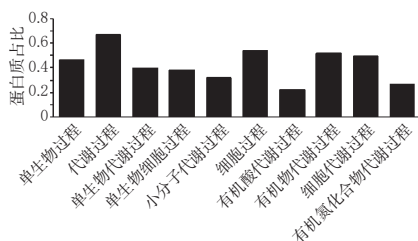


图1 多重耐药金黄色葡萄球菌的生长曲线

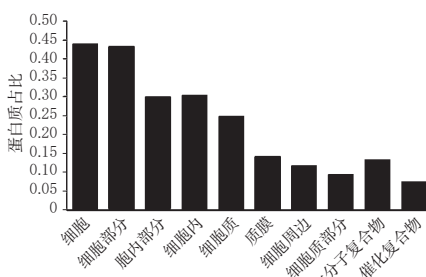
Fig 1 Growth curves of multiple drug resistant *Staphylococcus aureus*

3.5 差异表达蛋白GO分析

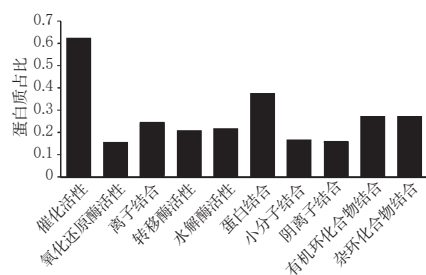
GO分析提供了生物过程、细胞组成和分子功能等3层结构的生物学信息,分析结果见图2。在生物过程中,共富集到309条结果($P<0.05$),以代谢过程、细胞过程为主(见图2A;图中,“蛋白质占比”指某生物功能富集的差异表达蛋白占差异表达蛋白总数的比例,下同);在细胞组成中,共富集到31条结果($P<0.05$),以细胞、细胞部分为主(见图2B);在分子功能中,共富集到116条结果($P<0.05$),以催化活性、蛋白结合等为主(见图2C)。



A.生物过程



B.细胞组成



C.分子功能

图2 GO分析结果

Fig 2 Results of GO analysis

3.6 差异表达蛋白KEGG信号通路分析

差异表达蛋白共富集到39条信号通路上,其中显著富集的有2条($P<0.05$),分别为不同环境中的微生物代谢和果糖与甘露糖代谢等两条信号通路,分别富集差异表达蛋白33、7个,详见图3(图中,*表示 $P<0.05$)。

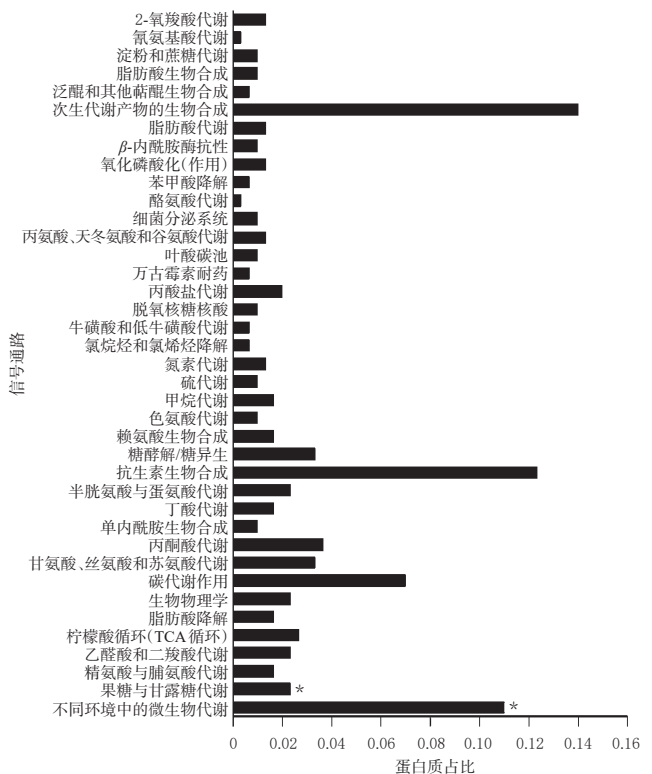


图3 KEGG信号通路富集分析结果

Fig 3 KEGG signaling pathway enrichment analysis

4 讨论

由于抗菌药物应用的不合理,使得病原菌耐药已成为严重的全球卫生问题之一,且多重耐药菌检出率的升高给医疗卫生事业带来了极大的挑战^[9]。研究显示,天然抗菌产物具有广阔的发展前景^[10-11]。为此,本研究以临床来源的多重耐药菌为对象,对内蒙古地区药用植物香青兰的抑菌活性进行了初步探讨。

香青兰经乙醇提取、溶剂萃取后,共获得石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等4个萃取部位;以临床常见革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌为对象,采用纸片扩散法对上述萃取部位的抗菌活性进行了比较和筛选。结果发现,香青兰乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌等多种革兰氏阳性球菌均具有不同程度的抑制活性,抑菌圈直径为10~16 mm;但该部位对肺炎克雷伯菌等4种革兰氏阴性杆菌均未见明显的抑制作用,可能与不同病原菌细胞壁结构差异有关^[12-13]。此外,乙酸乙酯属于中等极性萃取溶剂,其萃取物中可能含有萜类、有机酸类、黄酮类、游离生物碱类等成分,其中萜类、黄酮类成分具有一定的杀菌、消炎等生

物活性^[14],故笔者推测香青兰乙酸乙酯部位的抑菌活性可能与其含有上述化合物有关,但尚有待相关研究予以证实。本研究进一步分析了香青兰乙酸乙酯部位对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌等6种革兰氏阳性球菌的抑制作用。结果显示,该部位对上述6种病原菌的MIC为0.390 7~1.562 5 mg/mL,与诸多天然植物(如野菊花、苍术、紫珠草等,MIC分别为12.5、3.12、0.78 mg/mL^[10])相比,具有更强的抑菌活性(即MIC更低)。

为进一步探讨香青兰乙酸乙酯部位对细菌生长规律的影响,本研究以临床来源的多重耐药病原菌金黄色葡萄球菌为对象,对其生长曲线进行了分析。细菌生长曲线是基于菌悬液OD值来绘制的。有研究指出,菌悬液密度在一定范围内与其OD值存在线性关系^[15]。本研究所绘生长曲线显示,在0~4 h内,多重耐药金黄色葡萄球菌的生长处于迟缓期;培养4 h后,空白对照组和0.5倍MIC组菌株均进入对数生长期,10 h后进入稳定期;而1倍MIC组和2倍MIC组菌株则增长缓慢,且未见明显的对数生长期。这提示香青兰乙酸乙酯部位具有抑菌活性,且活性有随剂量增加而增强的趋势,这与部分天然植物(如薄荷、黄连^[16]等)对细菌生长规律的影响基本一致。

本研究比较了药物(乙酸乙酯部位)组与对照组的蛋白表达情况,并对差异表达蛋白进行了相关生物信息学分析。结果,共发现300个差异表达蛋白($P<0.01$)。GO分析结果显示,差异表达蛋白主要集中于细胞、细胞部位等,主要通过代谢过程、细胞过程以及催化活性、蛋白结合等生物过程和分子功能来发挥抑菌作用。KEGG信号通路富集结果显示,差异表达蛋白主要富集于不同环境中的微生物代谢和果糖与甘露糖代谢等两条通路($P<0.05$)。其中,不同环境中的微生物代谢共富集到33个差异表达蛋白,包括无氧代谢途径的关键酶(如丙酮酸甲酸裂解酶激活酶、丙酮酸甲酸裂解酶)以及有氧代谢途径的关键酶(如柠檬酸合成酶、琥珀酸脱氢酶);果糖与甘露糖代谢途径共富集到7个差异表达蛋白,且均与糖代谢密切相关。菌株会通过改变糖代谢相关蛋白表达等途径来调控自身代谢过程,从而抵御外界环境变化,一旦糖代谢受到抑制,就会阻碍微生物的生长繁殖,甚至导致其死亡^[17]。由此可见,香青兰乙酸乙酯部位的抑菌活性可能与其干扰细菌糖代谢有关,但具体机制尚有待基础研究予以证实。

综上所述,香青兰乙酸乙酯部位具有一定的抑菌活性,对多种葡萄球菌均具有一定的抑制作用。该部位对耐药金黄色葡萄球菌的抑制作用可能与影响微生物代谢和细菌糖代谢有关。本课题组后续将对乙酸乙酯部分具体活性成分进行分析,并深入探讨其具体抗菌机制,为香青兰的科学、合理使用提供依据。

参考文献

[1] 冯长根,李琼.香青兰化学成分与药理活性研究综述[J].

中成药,2003,25(2):154-156.

- [2] 刘建英,刘玉梅.青兰属植物的化学成分及药理作用研究进展[J].食品科学,2012,33(13):314-319.
- [3] SONBOLI A, GHOLIPOUR A, YOUSEFZADI M, et al. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Nepeta menthoides* from Iran[J]. *Nat Prod Commun*, 2009, 4(2):283-286.
- [4] 黄梦姣,卢添林,王瑶,等.粗壮女贞不同萃取部位抑菌活性成分研究[J].现代预防医学,2016,43(5):864-866、902.
- [5] 王慧芳,苏淑云,邵圣娟,等.大孔树脂分离纯化陈皮黄酮工艺及其抑菌活性[J].中成药,2018,40(12):2667-2672.
- [6] 焦岩,常影,余世锋,等.大果沙棘总黄酮体外抗氧化和抑菌作用研究[J].食品研究与开发,2015,36(19):12-15.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*[S]. 2017-01.
- [8] 管敏,张力文,徐致远,等.白毛夏枯草对金黄色葡萄球菌的作用规律及抗菌机理[J].中成药,2017,39(11):2393-2396.
- [9] 黄勋,邓子德,倪语星,等.多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J].中国感染控制杂志,2015,14(1):1-9.
- [10] 张泽萍,胡欢,左国营.23种中草药的体外抗菌活性筛选研究[J].广西植物,2019,39(4):499-510.
- [11] KHAIRON R, ZIN NM, RAHMAN MA, et al. Comparative proteomic analysis of differential proteins in response to aqueous extract of quercus infectoria gall in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Int J Proteomics*, 2016. DOI:10.1155/2016/4029172.
- [12] 贺平,朱晓莉,泽它扎西,等.15种藏药方剂抑菌作用的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2017(17):216-219.
- [13] 李绍军,曹建军,陈坤明,等.此“壁酸”非彼“壁酸”:关于“细胞生物学”教材中细菌细胞壁特征描述的高榷[J].中国细胞生物学学报,2014,36(10):1409-1412.
- [14] 牟玉兰,闫浩,龚黎黎.萜类化合物的研究概况[J].化工管理,2018(11):12-13.
- [15] 肖敏,杨峰,王旭荣,等.分光光度法测定金黄色葡萄球菌菌液浓度方法的建立[J].动物医学进展,2014,35(11):40-43.
- [16] GERSTEL J, TURNER T, RUIZ G, et al. Identification of botanicals with potential therapeutic use against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections[J]. *Phytotherapy Res*, 2018. DOI:10.1002/ptr.6198.
- [17] 毛跟年,胡家欢,刘艺秀.野艾蒿提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌机制研究[J].食品科技,2019,44(5):242-247.

(收稿日期:2019-06-26 修回日期:2019-12-09)

(编辑:张元媛)