

丁香酚对压疮致病菌金黄色葡萄球菌及其耐药菌的抑菌作用及机制

于杰^{1,2}, 郑淑媚³, 张文海³, 周瑞刚³, 赵钢¹, 李金贵^{3*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 南京医科大学附属宿迁第一人民医院, 江苏 宿迁 223800

3. 扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009

摘要: **目的** 明确丁香酚对压疮致病菌金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的体外抑菌作用及机制。**方法** 采用微量肉汤稀释法和和生长曲线确定丁香酚对金黄色葡萄球菌的抑菌活性; 通过碱性磷酸酶 (AKP) 活性、细菌核酸蛋白泄漏的检测, 细菌超微结构的扫描和透射电镜观察以及菌体对碘化丙啶 (PI) 和 N-菲酰-次巯基-L-丙氨酸 (NPN) 的摄取来探讨丁香酚处理后金黄色葡萄球菌细胞膜的通透性和完整性; 以结晶紫染色法和实时荧光定量 PCR 法研究丁香酚对菌体生物被膜 (BF) 生成、成熟以及菌体黏附、侵袭相关毒力因子表达水平的影响。**结果** 丁香酚对金黄色葡萄球菌标准菌和耐甲氧西林金葡菌 (MRSA) 的最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 0.25、0.125 mg/mL。丁香酚处理后可以提高细菌培养液中核酸、蛋白浓度及 AKP 的活性; 菌体出现皱缩和破裂, 菌体内膜和外膜中分别出现 PI 和 NPN 荧光, 菌体结构破坏和荧光强度与丁香酚浓度呈正相关。丁香酚能够抑制金黄色葡萄球菌菌株 BF 的生成, 且对成熟 BF 具有明显清除作用, 显著降低 BF 生成相关基因 *agrA*、*sarA*、*cidA* 和 *icaA* 及黏附因子 *clfA*、*clfB*、*fnbA* 和 *fnbB* 的基因表达水平; 与标准菌株相比, 丁香酚对 MRSA 的作用更明显。**结论** 丁香酚对金黄色葡萄球菌标准菌株和耐药菌株均具有显著抗菌作用, 可破坏菌体细胞结构, 改变细胞膜通透性和完整性, 抑制 BF 的生成, 并对成熟 BF 具有清除作用, 抑制细菌 BF 及黏附侵袭相关毒力因子的转录和表达, 可能是艾灸促进压疮创面修复的机制之一。

关键词: 丁香酚; 压疮; 金黄色葡萄球菌; 抑菌; 艾烟; 创面修复; 艾灸

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)09-2184-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.09.009

Study on inhibitory effect and mechanism of eugenol against *Staphylococcus aureus* and its drug-resistant bacteria that causes pressure sores

YU Jie^{1,2}, ZHENG Shu-mei³, ZHANG Wen-hai³, ZHOU Rui-gang³, ZHAO Gang¹, LI Jin-gui³

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. The Affiliated Suqian First People's Hospital of Nanjing Medical University, Suqian 223800, China

3. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: Objective To identify the antibacterial mechanism of eugenol against *Staphylococcus aureus* that causes pressure sores. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of eugenol on *S. aureus* was determined by microbroth dilution method and growth curve. Subsequently, AKP activity, bacterial nucleic acid protein leakage, bacterial ultrastructure observed by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy, as well as PI and NPN uptake of eugenol on *S. aureus* were detected to determine its permeability and integrity of cell membrane of *S. aureus* treated with eugenol. The effect of eugenol on the formation and maturation of *S. aureus* ATCC29213 and MRSA biofilms was studied by crystal violet staining. The expression levels of eugenol on biofilms and adhesion and invasion-related virulence factors were detected by real-time fluorescent quantitative PCR after exposure. **Results** The results showed that the MIC of eugenol against *S. aureus* ATCC29213 and MRSA were respectively 0.25 and 0.125 mg/mL. After eugenol intervention, the concentration of nucleic acid and protein as well as the activity of AKP can be increased in bacterial culture medium. The bacteria were crumpled and ruptured, and PI and NPN fluorescence appeared in the inner membrane and outer membrane.

收稿日期: 2023-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82004375); 中国博士后科学基金资助项目 (2021MD703836); 宿迁市“西楚英才”雄英计划双创人才资助项目 (卫生创新) ((2022)-0051)

作者简介: 于杰, 医学博士, 在站博士后, 讲师, 主治医师, 硕士研究生导师, 研究方向为中医药防治组织损伤。E-mail: hecafei@sina.com

*通信作者: 李金贵, 教授, 博士研究生导师。

respectively. The damage of cell structure and fluorescence intensity were positively correlated with eugenol concentration. Eugenol can inhibit the BF formation of *S. aureus* strain, and has obvious scavenging effect on mature BF. Eugenol significantly reduced the expression levels of biofilm related genes including *agrA*, *sarA*, *cidA* and *icaA* and significantly inhibited the expression levels of adhesion factors such as *clfA*, *clfB*, *fnbA* and *fnbB*. It was also found that eugenol had a more significant inhibitory effect on MRSA. **Conclusion** Eugenol has significant antibacterial effect on both standard and drug-resistant strains of *S. aureus*. Eugenol can damage the cell structure of *S. aureus*, change both the permeability of cell membrane and the integrity of cell wall. Eugenol can inhibit the generation of biofilms of *S. aureus*, promote the removal of mature biofilms as well. It does inhibit the transcription and expression of virulence factors related to bacterial biofilm and adhesion invasion, and it may be one of the mechanisms by which moxibustion can promote the wound repair on pressure ulcer.

Key words: eugenol; pressure ulcer; *Staphylococcus aureus*; bacteriostatic; moxa smoke; wound repair; moxibustion

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是一种常见的可引起人和动物广泛感染的革兰阳性化脓性细菌, 入侵机体后, 轻则引起轻微的皮肤感染, 如毛囊炎、压疮等, 重则深入深层的组织, 危及生命, 引起败血症、菌血症、心内膜炎和肺炎等^[1]。老年压疮患者创面多重耐药菌感染的病原菌中以超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌科细菌为首, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 检出率位居第 2 位, 为了减少压疮的发生率, 应对金黄色葡萄球菌及其耐药菌株给予重点关注^[3]。近年来, 金黄色葡萄球菌多药耐药菌株不断出现, 其中 MRSA 更是具有发病率高、致死率高及治疗棘手的特点^[4], 致使临床中对感染性疾病的治疗更加复杂。因此, 寻找有效防治 MRSA 引起皮肤感染的新方案至关重要。

金黄色葡萄球菌存在诸多逃避宿主的机制, 细胞膜是细菌保卫自身功能的第一道屏障, 可以维持菌体形态、传递信息以及物质交换^[5]。金黄色葡萄球菌的生物被膜 (BF) 可以保护其逃避宿主细胞的免疫识别, 诱导其发生耐药或者增强其耐药性。细菌通过不断重复黏附、聚集、繁殖、成熟、扩散这一 BF 形成过程, 致使机体持续感染^[6]。其中, 金黄色葡萄球菌毒力因子的广泛表达对 BF 的定植、形成、扩散及感染具有重要作用。金黄色葡萄球菌 BF 的形成和扩散由多个基因编码及参与, 其中包括纤维连接蛋白原结合蛋白基因 (*fnbA* 和 *fnbB*)、细胞间黏附基因 (*icaA*)、凝聚因子基因 (*clfA* 和 *clfB*) 等基因参与形成, 而 *agr* 基因和葡萄球菌附属调节剂基因 (*sarA*) 的表达也可以促进 BF 的形成和扩散^[7]。因此, 破坏细菌细胞膜、BF 生成的抑制及促进成熟 BF 的降解是控制金黄色葡萄球菌感染的重要研究方向。

在祖国医学中, 药用植物及其化合物被广泛用于治疗各种疾病, 许多植物化学物质具有抗菌、抗

真菌和抗病毒特性^[8]。丁香是桃金娘科蒲桃属植物, 丁香酚是丁香油的主要成分, 亦是艾条艾烟的主要药效成分之一^[9], 具有较强的抗菌、抗病毒、抗真菌、抗炎和抗氧化等生物学特性。近年来, 丁香酚对革兰阴性菌和革兰阳性菌的抑菌机制研究成为热点^[10]。在心内科住院患者压疮病原菌分布情况研究分析发现, 压疮主要致病菌之一为金黄色葡萄球菌, 且其毒力基因 *tst* 和 *pvl* 均有检出^[11], 金黄色葡萄球菌严重延迟并阻碍创面愈合的进程。本项目组前期致力于艾灸促进压疮组织血管新生及调控巨噬细胞极化的机制研究, 发现艾灸分别从炎症期、增生期及重塑期促进创面修复, 提前炎症细胞浸润高峰, 促进血管内皮细胞增殖^[12-17]。丁香酚作为艾烟化学成分的主要药效成分之一, 是否对压疮致病菌中的金黄色葡萄球菌发挥抗菌、抑制 BF 形成的作用? 本研究旨在通过最小抑菌实验、生长曲线、菌体超微结构、细胞膜的通透性和完整性、BF 及其相关毒力因子的检测等方面明确丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 的体外抗菌效果, 为丁香酚在防治金黄色葡萄球菌及其耐药菌株引起的皮肤感染及压疮提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株的来源、保存和培养 金黄色葡萄球菌 (菌号 ATCC29213) 购自中国药物及生物制品检定所医学细菌保藏管理中心。猪源 MRSA 由扬州大学兽医学院提供。2 株菌种均长期冻存于本教研室中 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。实验阶段取出菌株, 接种环挑取菌液后 3 区划线接种于 Luria-Bertani (LB) 琼脂平板上, $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 12~16 h。再从 LB 琼脂平板上挑取单一菌落于 LB 肉汤培养基, 180 r/min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 12~16 h 进行细菌的培养传代 3~4 次后用于实验。

1.1.2 主要试剂 丁香酚(质量分数 $\geq 98.5\%$)购自上海麦克林生化科技有限公司(货号 O994145-100mg); 酵母浸粉(货号 HB8273), 胰蛋白胨(货号 HB8270), 可溶性淀粉(货号 HB8513-1), 牛肉浸粉(货号 HB8272), 琼脂粉(货号 HB8274-1), 酸水解酪蛋白(货号 HB8291)均购自青岛高科园海博科技有限公司; 氯化钠(货号 73522260), 十二水磷酸氢二钠(货号 20040718), 氯化钾(货号 H005376HY), 磷酸二氢钾(货号 10017608)和戊二醛(货号 30092582), 结晶紫(货号 71012314)均购自南京国药集团化学试剂有限公司; RNA-easy isolation Reagent(货号 R701), 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)(货号 11141ES10)和 Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)(货号 11201ES60)购自上海 Yeasen Biotechnology 有限公司; 碘化丙啶(PI)染液(货号 P8080)购自索莱宝有限公司; N-菲酰-次巯基-L-丙氨酸(NPN)染色(货号 N14900-25g)购自 TCI 化成工业发展有限公司。

1.1.3 主要溶液的配制 2.5%戊二醛固定液: 戊二醛原液(25%)与超纯水按照 1:9 的比例进行稀释。结晶紫溶液: 精密称取 0.1 g 结晶紫粉末, 用 100 mL 超纯水进行溶解, 并使用涡旋仪进行震荡以便于充分溶解。将配好的溶液分装, 室温保存备用。

1.2 方法

1.2.1 最低抑菌浓度(MIC)及生长曲线的测定 根据临床实验室标准化协会(CLSI)发布的标准(M100, 2019), 采用肉汤微量稀释法测定丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 的 MIC, 以金黄色葡萄球菌为质量控制菌株。将 MH 肉汤和一定浓度的丁香酚加至无菌 96 孔板内, 使用二倍稀释法将丁香酚稀释到相应浓度; 将对数增长期的菌液用 MH 肉汤稀释至 1.0×10^6 cfu/mL, 并按照 100 μ L/孔接种受试菌株的细菌悬液, 各孔终体积达到 200 μ L。分别设置空白对照组、不同浓度(1/4 MIC、1/2 MIC、MIC、2 MIC)丁香酚组, 每孔设置 3 个重复。37 $^{\circ}$ C 培养 16~18 h 后, 以孔内完全没有细菌生长的最低浓度, 即丁香酚对该菌株的 MIC。

用 TSB 肉汤培养基将对数生长期的金黄色葡萄球菌和 MRSA 稀释并调整菌液浓度至 1×10^5 cfu/mL, 用 1%接种量接种于 TSB 肉汤培养液中。分别加入 1/4 MIC、1/2 MIC、MIC、2 MIC 的丁香酚, 同时设

置空白对照组, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 摇床培养 24 h, 使用酶标仪测定 600 nm 处的吸光度(A)值, 并绘制生长曲线图。

1.2.2 丁香酚对金黄色葡萄球菌细胞膜渗透性的测定

(1)碱性磷酸酶(AKP)活性的检测: 将金黄色葡萄球菌和 MRSA 培养至对数生长期, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2)重悬以获得 1×10^6 cfu/mL 的菌液; 然后在细菌重悬液中加入丁香酚, 使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、MIC、2 MIC, 并设置空白对照组。摇床设置条件为 180 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养, 在 0、2、4、6、8 h 分别收集菌液, 3 500 r/min 离心 10 min 后收集上清液用于 AKP 检测(实验步骤参照 AKP 试剂盒使用说明书)。

(2)NPN 染色: 将金黄色葡萄球菌和 MRSA 培养至对数生长期, 用 MH 肉汤培养液稀释为 1×10^6 cfu/mL 的菌液; 然后在细菌重悬液中加入丁香酚使其终浓度为 1/4 MIC、1/2 MIC、MIC, 并设置空白对照, 摇床设置条件为 180 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。无菌 PBS 清洗 3 次后重悬, 再加入 NPN 染液 5 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h 后, 再用无菌 PBS 清洗 3 次并重悬。吸取重悬菌液于载玻片上并均匀涂布, 酒精灯烘烤固定, 滴加 3 μ L 抗荧光淬灭剂后封片, 避光 4 $^{\circ}$ C 保存。通过激光共聚焦显微镜(TCS SP8 STED)进行观察 NPN 荧光强度, 用于评价丁香酚对细菌外膜渗透性的作用, 激发光波长为 350 nm, 发射光波长为 420 nm。

(3)PI 染色: 细菌与药物处理同 1.2.2 (2), 向 PBS 清洗并重悬的菌液内加入 PI 染液(1 μ mol/L), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min 后, 使用激光共聚焦显微镜进行观察 NPN 荧光强度, 用于评价丁香酚对细菌内膜渗透性的作用, 激发光波长为 535 nm, 发射光波长为 617 nm。最后采用 Image J 软件进行荧光强度的分析。

1.2.3 丁香酚对金黄色葡萄球菌胞内核酸和蛋白表达的影响 将金黄色葡萄球菌和 MRSA 培养至对数生长期, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2)重悬以获得 1×10^6 cfu/mL 的菌液; 然后在细菌重悬液中加入丁香酚使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC、MIC、2 MIC, 并设置空白对照组。摇床设置条件为 180 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后, 将细菌悬液 3 500 r/min, 离心 10 min, 收集上清, 使用酶标仪测定 260、280 nm 处的吸光度(A)值, 来确定胞内核酸和蛋白的泄露水平。

1.2.4 丁香酚对金黄色葡萄球菌表面超微结构的影响

(1)细菌处理: 将金黄色葡萄球菌和 MRSA 培

养至对数生长期, 使用 MH 肉汤培养基调整浓度至 1×10^6 cfu/mL, 并加入丁香酚使其终浓度分别为 1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC。180 r/min、37 °C 摇床培养 4 h, 再用无菌 PBS 清洗 3 次, 3 500 r/min 离心 5 min 后, 将细菌重悬于 PBS 中。

(2) 扫描电镜处理: 将上述菌液滴在无菌爬片上, 加入 2.5% 戊二醛, 4 °C 固定 12 h 后进行梯度脱水处理。PBS 洗玻片 3 次, 30%、50%、70%、85%、95%、100% 的乙醇依次梯度脱水, 各梯度 15 min; 然后在干燥器中干燥、喷金; 最后, 通过 Geminisem 300 蔡司场发射扫描电子显微镜系统进行观察和拍照。

(3) 透射电镜处理: 取上述 PBS 重悬菌液直接滴于带有支持膜的载网上, 静置 10 min。用滤纸条从液滴边缘吸去多余液体, 稍做干燥, 载网置于 5% 磷钨酸负染色液上漂染 1 min。除去多余染色液, 红外灯烘烤 30 min, 使用 Tecnai 12 透射电镜观察并成像。

1.2.5 丁香酚对金黄色葡萄球菌毒力因子基因的转录水平的影响

(1) 细菌制备与处理: 用 LB 肉汤培养基将对数生长期的金黄色葡萄球菌和 MRSA 浓度调整至 1×10^6 cfu/mL, 分别加入 1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC、MIC 的丁香酚, 180 r/min、37 °C 培养 4 h 后, 用无菌 PBS 洗 3 次, 3 500 r/min 离心 10 min 后收集细菌团块。

(2) 细菌总 RNA 提取: 在上述细菌团块中, 加入 1 mL 的 Trizol 并均匀吹打混匀菌体后, 静置 10 min。4 °C 下 $13\ 201 \times g$ 离心 10 min, 小心吸取上清于新的离心管, 加入 200 μ L 氯仿进行抽提, 充分震荡后静置 10 min。4 °C 下 $13\ 201 \times g$ 离心 10 min, 小心吸取上水相于新的 1.5 mL 离心管, 重复此过程 2 次。随后加入等体积异丙醇颠倒混匀, 静置 10 min, 4 °C 下 $13\ 201 \times g$ 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇轻柔震荡洗涤产物, 4 °C 下 $13\ 201 \times g$ 离心 10 min, 重复 2 次; 弃去上清, 晾置离心管直至乙醇完全挥发; 加入 30 μ L DEPC 水溶解总 RNA, 并将其置于 -80 °C 冰箱保存, 或直接检测浓度进行反转录。

(3) 合成 cDNA: 测定总 RNA 的浓度并用 DEPC 水调至 75 ng/ μ L, 采用两步法反应体系制备 cDNA。首先取 75 ng/ μ L 的 RNA 12 μ L, 加入 3 μ L 5 \times gDNA digester Mix, 42 °C 金属浴中反应 2 min, 充分去除残留的基因组 DNA; 然后加入 5 μ L 4 \times Hifair[®] qRT SuperMix, 混匀后置于 PCR 仪中, 25 °C 反应 5 min,

55 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 min, 所获得产物可以立即用于 PCR 反应, 也可以在 -20 °C 短期保存。

(4) 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR): 将 cDNA 稀释 5 倍, 并把引物稀释为 0.2 μ mol/L。按说明书预混 20 μ L RT-qPCR 反应体系: 10 μ L Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix, 2 μ L 正向引物, 2 μ L 反向引物, 6 μ L 稀释的 cDNA。反应体系如下: 95 °C 反应 5 min, 95 °C 反应 10 s, 60 °C 反应 30 s, 循环 40 次。以 16S RNA 为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 C_t 值进行相对定量分析。目的基因引物序列见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌的基因引物序列

Table 1 Primers to target genes of *Staphylococcus aureus*

基因	引物序列 (5'-3')
<i>agrA</i>	正向 TGCCCTCGCAACTGATAATCC
	反向 ACCAACTGGGTCATGCTTACG
<i>cidA</i>	正向 ATCTTCCCTTAGCCGGCAGT
	反向 TGCACCGTCTTCTACCCAAG
<i>clfA</i>	正向 TTACGAATCAGTTGACGAATGTG
	反向 AGGCACTGAAAAACCATAATTCA
<i>clfB</i>	正向 TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAC
	反向 CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTTG
<i>fnbA</i>	正向 CGACACAACCTCAAGACAATAGCGG
	反向 CGTGGCTTACTTTCTGATGCCGTTG
<i>fnbB</i>	正向 ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG
	反向 ACCTTCTGCATGACCTTCTGCACCT
<i>icaA</i>	正向 CTTGCTGGCGCAGTCAATAC
	反向 CCAACATCCAACACATGGCA
<i>sarA</i>	正向 CGCTGTATTGACATACATCAGCGA
	反向 TGCTTTAACAACCTGTGGTTGTTTG
16S RNA	正向 TACACACCGCCCGTCACA
	反向 CTTCGACGGCTAGCTCCTAAA

1.2.6 丁香酚对金黄色葡萄球菌成熟 BF 的清除能力 将对数生长期的金黄色葡萄球菌和 MRSA 用无菌的 TSB 培养基调整浓度至 1×10^6 cfu/mL, 然后接种至 96 孔板中 37 °C 静置培养 2 d, 每天更换无菌的 TSB 培养基。培养结束后, 用无菌 PBS 清洗两次以清除培养基和游离的细菌, 再向每孔中分别加入 1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 的丁香酚稀释液 (TSB 培养基倍比稀释, 具体浓度可依据 MIC 为 0.25 mg/mL 换算), 并设立空白对照组 (不含丁香酚), 37 °C 培养 8 h。

结晶紫染色: 弃去 96 孔板内上清液, PBS 清洗

3 次后, 各孔加入 500 μL 甲醇进行固定; 15 min 后弃去固定液, 加结晶紫稀液 200 μL /孔染色 8 min, PBS 清洗后室温干燥, 再加入 200 μL /孔的丙酮 - 乙醇 (20 : 80) 溶液进行细菌重悬, 最后用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度值 (A_{570})。

1.2.7 丁香酚对金黄色葡萄球菌 BF 形成抑制能力将对数生长期的金黄色葡萄球菌和 MRSA 用无菌的 TSB 培养基调整浓度至 1×10^6 cfu/mL, 然后接种至 96 孔板中, 再向每孔中分别加入 1/8 MIC、1/4 MIC、1/2 MIC 和 MIC 的丁香酚稀释液, 并设立空白对照组 (不含丁香酚), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 h。培养结束后, 用无菌 PBS 清洗 2 次以清除培养基和游离的细菌。

结晶紫染色: 弃去 96 孔板内上清液, PBS 清洗 3 次后, 各孔加入 500 μL 甲醇进行固定; 15 min 后弃去固定液, 加结晶紫稀液 200 μL /孔染色 8 min, PBS 清洗后室温干燥, 再加入 200 μL /孔的丙酮 - 乙醇 (20 : 80) 溶液进行细菌重悬, 最后用酶标仪测定 A_{570} 。

1.2.8 统计学方法 使用 SPSS 25.0 统计软件进行分析, 通过单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 多重比较检验来对比不同组别间的统计结果, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。GraphPad Prism 8.0 软件用于绘制直方图和折线图。

2 结果

2.1 丁香酚的抑菌活性以及对菌体细胞膜完整性的影响

首先以金黄色葡萄球菌标准菌株为质控菌株, 通过肉汤微量稀释法测定丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 的 MIC 分别为 0.25、0.125 mg/mL。由于金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.25 mg/mL, 故 1/4 MIC、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 分别为 0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0 mg/mL。MRSA 的 MIC 为 0.125 0 mg/mL, 故 1/4 MIC、1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 分别为 0.031 25、0.062 5、0.125 0 和 0.250 0 mg/mL。如图 1、2 所示, 空白对照组均在 2 h 后快速增殖并进入对数生长期, 随后在 10 h 后达到平台期, 1/4 MIC 和 1/2 MIC 的丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 的生长具有抑制作用, 而 MIC 和 2 MIC 丁香酚处理后在 8 h 后不再增长, 说明丁香酚对 2 菌株有杀菌作用。

如图 1、2 所示, 培养液上清液中泄漏核酸的量与丁香酚的质量浓度及处理时间呈正相关; 同核酸含量的变化趋势一致, 当用 MIC 和 2 MIC 处理细菌后, 上清液中蛋白的含量以及 AKP 的活性显著增加。由此可见, 丁香酚可以破坏细菌细胞膜的完整性, 引起菌体内容物外漏。

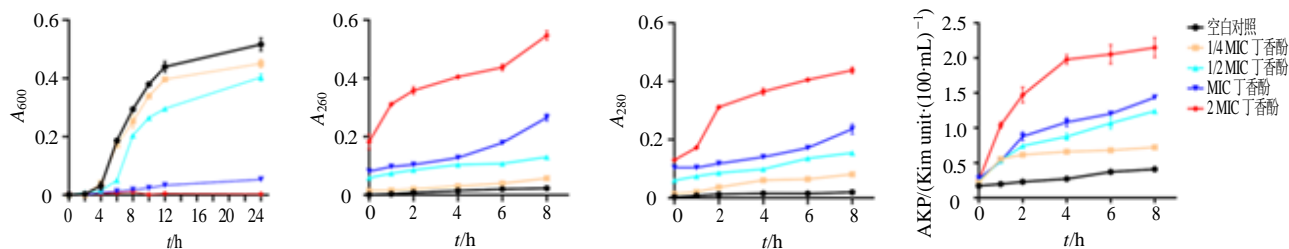


图 1 丁香酚对金黄色葡萄球菌生长曲线和细胞膜完整性的影响

Fig. 1 Growth curve and cell membrane integrity of *S. aureus* treated with eugenol

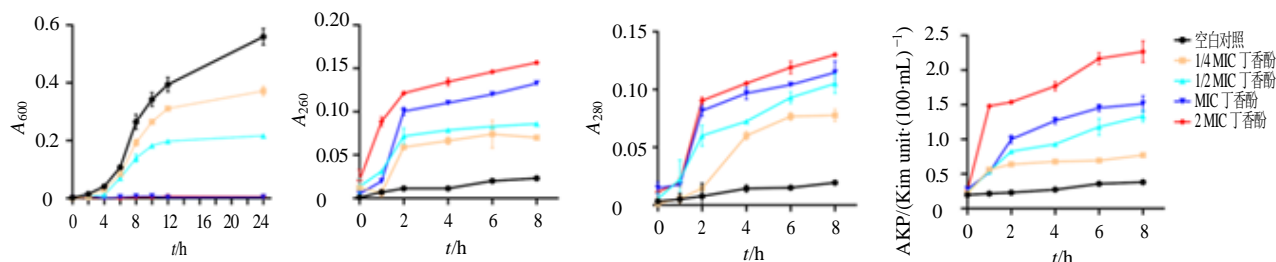


图 2 丁香酚对 MRSA 生长曲线和细胞膜完整性的影响

Fig. 2 Growth curve and cell membrane integrity of MRSA treated with eugenol

2.2 丁香酚破坏金黄色葡萄球菌和 MRSA 细胞内、外膜的完整性

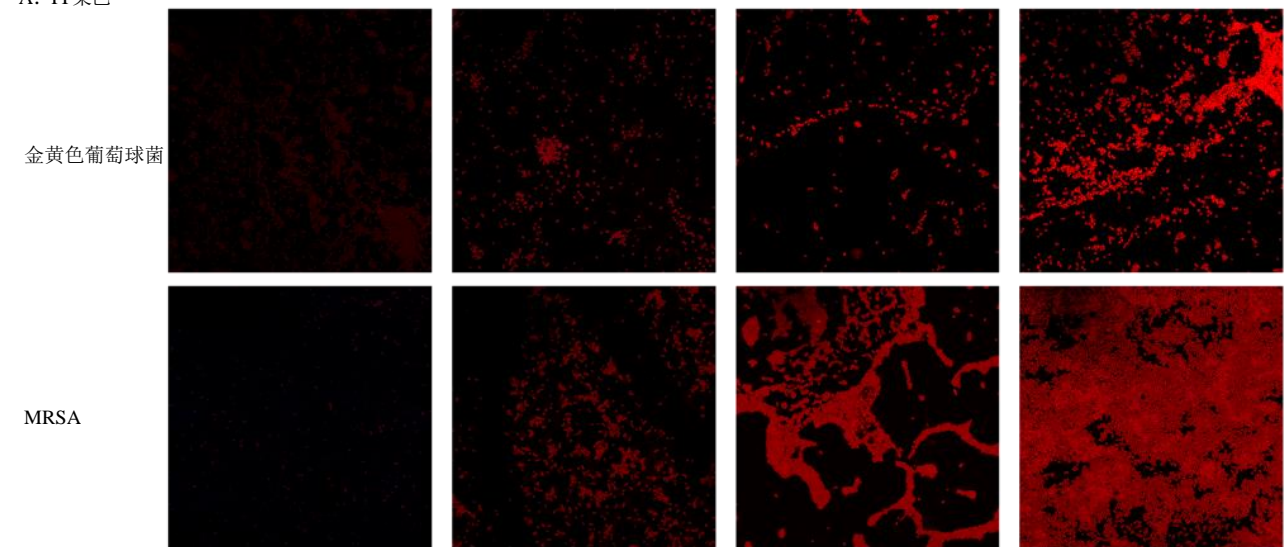
如图 3A、3B 所示, 1/2 MIC 和 MIC 丁香酚处理后, 细菌细胞内的 PI 和 NPN 荧光强度明显增强, 特别是高浓度处理组, 说明丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 的内、外膜均造成了损害, 且具有浓度相关性。

2.3 丁香酚破坏金黄色葡萄球菌和 MRSA 的菌体细胞形态

如图 4A、5A 所示, 空白对照组的金黄色葡萄

球菌和 MRSA 表面相对光滑, 形态饱满, 呈葡萄状, 经 1/4 MIC 丁香酚处理后, 金黄色葡萄球菌菌体表面出现轻微皱缩, 边界模糊; 经 1/2 MIC 和 MIC 丁香酚处理后, 金黄色葡萄球菌细胞膜出现了明显的凹陷、崩解; 相同浓度处理的 MRSA 菌体表现为严重破裂。与扫描电镜趋势一致, 透射电镜下亦发现 MIC 丁香酚作用菌体后可引起金黄色葡萄球菌菌体膜结构破裂, MRSA 则见有更明显内容物外漏 (图 4B、5B)。由此说明, 丁香酚能够引起菌体形态发生显著变化, 且其变化情况与丁香酚的浓度呈正相关。

A: PI 染色



B: NPN 染色

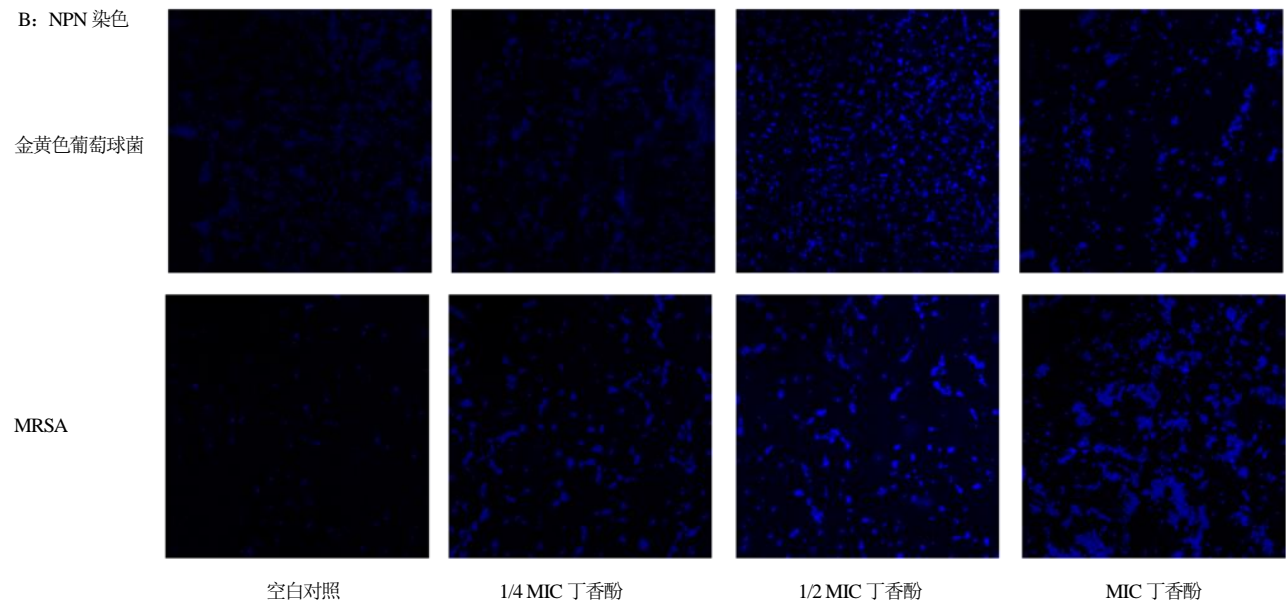


图 3 丁香酚处理后金黄色葡萄球菌和 MRSA 对 PI (A) 和 NPN (B) 摄取 ($\times 1000$)

Fig. 3 PI (A) and NPN (B) uptake of *S. aureus* and MRSA after treated with eugenol ($\times 1000$)

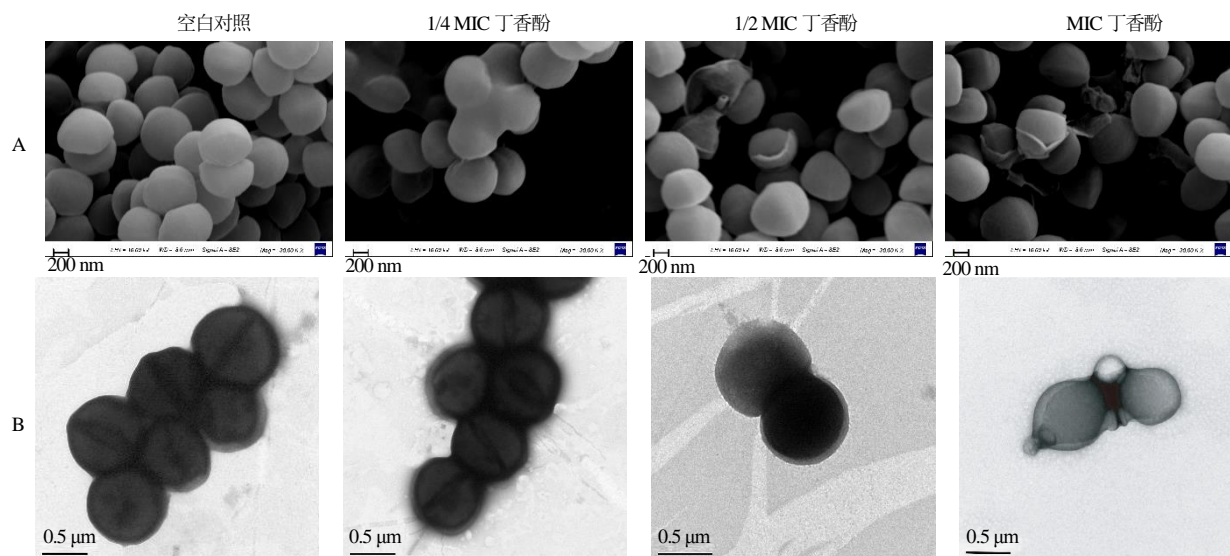


图 4 扫描电镜 (A) 和透射电镜 (B) 观察丁香酚处理对金黄色葡萄球菌超微结构的破坏
Fig. 4 Damage to ultrastructure of *S. aureus* treated with eugenol by SEM (A) and TEM (B)

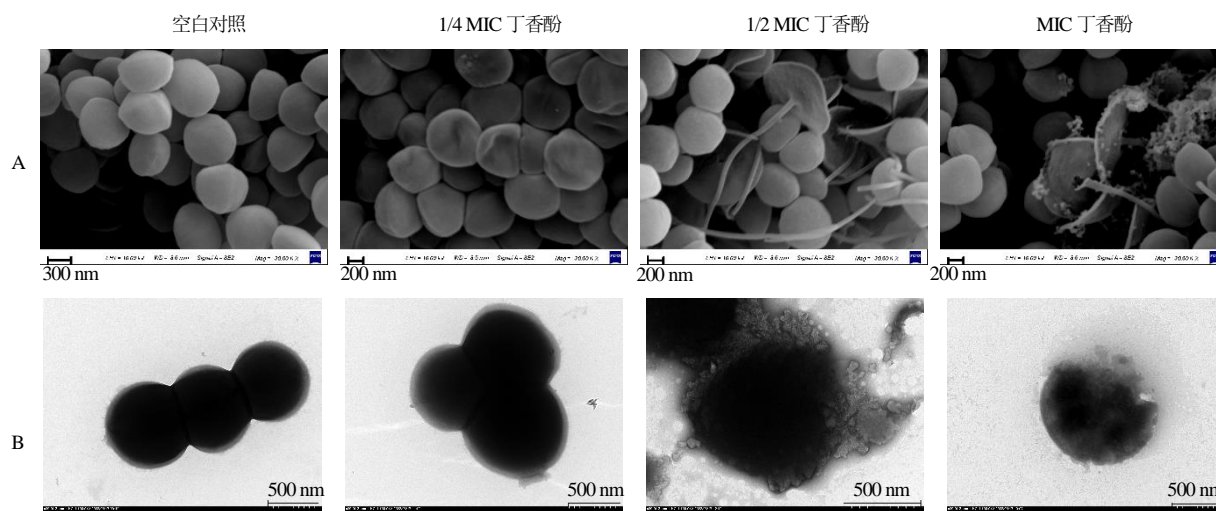


图 5 扫描电镜 (A) 和透射电镜 (B) 观察丁香酚处理对 MRSA 超微结构的破坏
Fig. 5 Damage to ultrastructure of MRSA treated with eugenol by SEM (A) and TEM (B)

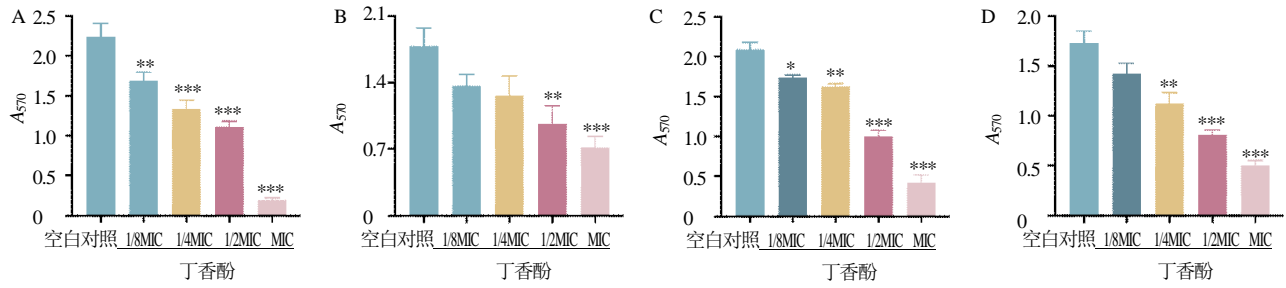
2.4 丁香酚可抑制菌体生物被膜的生成并促进成熟生物膜的清除

如图 6A、6C 所示, 丁香酚对 2 种菌株 BF 形成的抑制作用随着质量浓度的升高而增强。与空白对照组相比, 1/8 MIC 丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 生物膜形成产生抑制作用 ($P < 0.05, 0.01$), 而 1/2 MIC 和 MIC 丁香酚则可以显著抑制 BF 的形成 ($P < 0.001$)。如图 6B、6D 所示, 丁香酚对成熟 BF 的清除作用与其对 BF 形成的抑制作用一致, 且具有浓度相关性。可见, 丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 生物膜的形成抑制作用和促进成熟生物

膜的清除作用均具有显著效果。

2.5 丁香酚抑制菌体毒力因子的转录水平

如图 7A、7B 所示, 空白对照组金黄色葡萄球菌中存在与 BF 形成和扩散相关的 *sarA*、*agrA*、*icaA*、*cidA*、*clfA*、*clfB*、*fnbA*、*fnbB* 基因表达, 丁香酚处理后对它们具有抑制作用。此外, 1/2 MIC 和 MIC 丁香酚可以显著抑制金黄色葡萄球菌和 MRSA 的 *sarA*、*agrA* 基因表达 ($P < 0.001$); 受两者调控的 *icaA*、*cidA* 操纵子基因的表达水平也显著降低 ($P < 0.001$); 1/2 MIC 和 MIC 丁香酚显著抑制了 *clfA*、*clfB*、*fnbA*、*fnbB* 基因的表达 ($P < 0.01, 0.001$)。

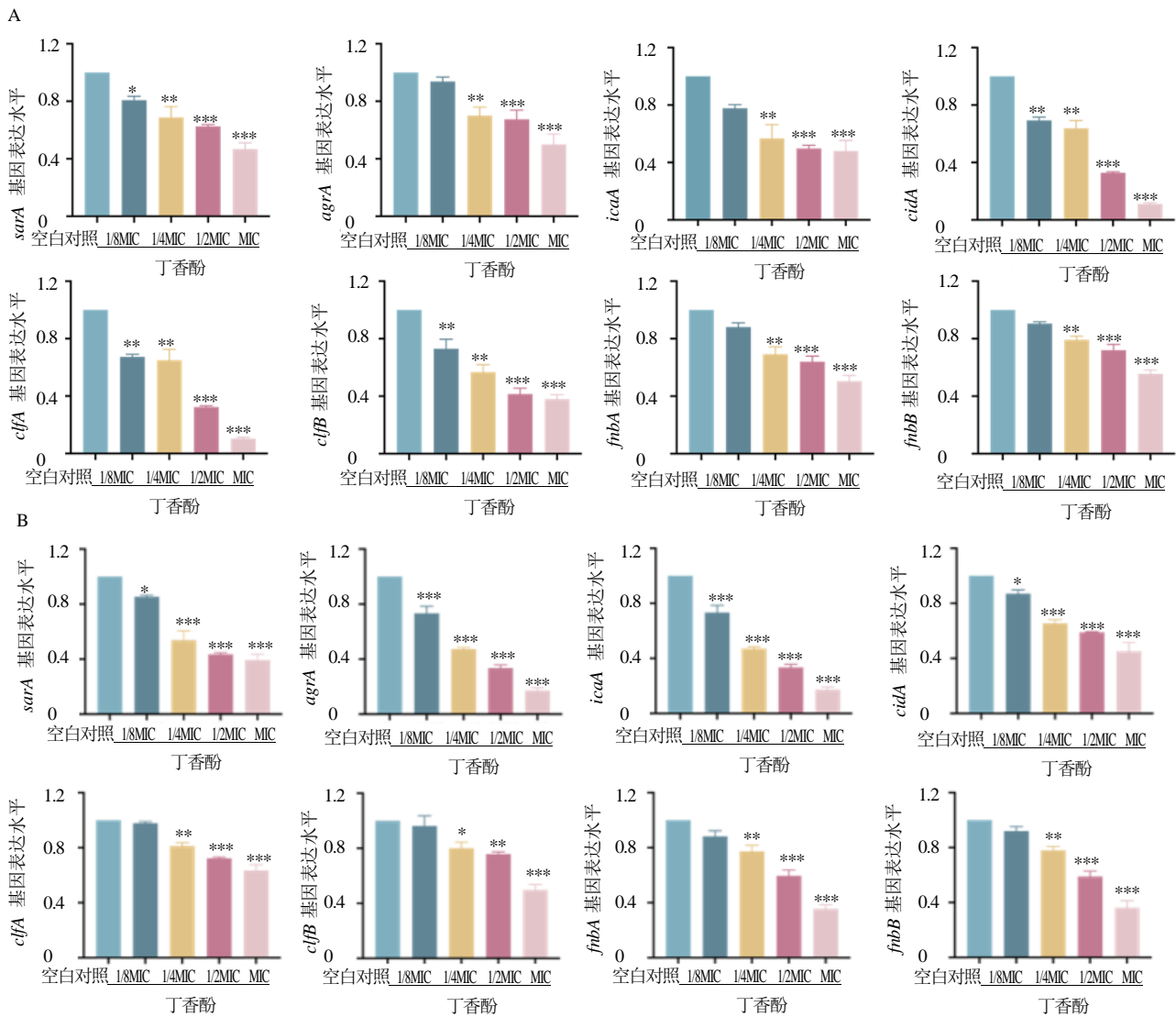


A-丁香酚对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用; B-丁香酚对金黄色葡萄球菌成熟生物膜的降解作用; C-丁香酚对 MRSA 生物膜形成的抑制作用; D-丁香酚对 MRSA 成熟生物膜的降解作用。与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

A-inhibitory effect of eugenol on biofilm formation of *S. aureus*; B-degradation of eugenol to *S. aureus* mature biofilm; C-inhibitory effect of eugenol on biofilm formation of MRSA; D-degradation of eugenol to MRSA mature biofilm. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank control group

图 6 丁香酚对金黄色葡萄球菌和 MRSA 生物膜的形成抑制和促进降解作用 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 6 Inhibitory effect of biofilm formation and degradation of mature biofilm of *S. aureus* and MRSA treated with eugenol ($\bar{x} \pm s$)



与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank control group

图 7 丁香酚抑制金黄色葡萄球菌 (A) 和 MRSA (B) 毒力因子基因的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 7 Inhibition on gene expressions of *S. aureus* and MRSA virulence factors by eugenol ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

3.1 压疮与金黄色葡萄球菌之间关系

金黄色葡萄球菌感染常定植于人和动物的皮肤、黏膜(肠道、鼻腔),是造成大多数皮肤感染的主要原因,包括皮下脓肿、蜂窝组织炎、毛囊炎、感染性擦伤和压疮。感染金黄色葡萄球菌通常会引起 2 类疾病:一种是化脓性疾病,包括动物的创伤性感染、压疮、皮下脓肿、蜂窝组织炎、败血症、脓毒败血症以及奶牛乳房炎;另一种则是毒性性疾病,主要是因食用被金黄色葡萄球菌污染的饲料或食物,而引起家畜或人的中毒性肠炎、腹泻以及毒素休克综合征等。研究发现,IV 期压疮合并感染患者的创面分泌物细菌培养中以金黄色葡萄球菌等革兰阳性菌作为主要病原菌存在,且具有较强的耐药性,因此制定合理、有效的感染预防及控制方案尤为重要^[18]。对 III~IV 期压疮伴中重度感染患儿创面培养发现,革兰阴性菌占 50.53%,革兰阳性菌占 38.95%,其中病原体构成比依次为大肠埃希菌>金黄色葡萄球菌>表皮葡萄球菌^[19]。在欧美地区近年的流行病学调查中发现,金黄色葡萄球菌感染人数占皮肤感染和软组织感染的 76%,导致每年近 50 万人次住院和 1 160 万人次的门诊就医,成为公共卫生安全的重要难题之一^[20]。由于抗生素的滥用和细菌的不断进化,金黄色葡萄球菌的耐药性逐年增多,尤其是 MRSA 会导致感染程度增加、高发病率和死亡率高;加之耐药机制非常复杂,无疑增加了临床针对 MRSA 抗感染的治疗难度。

3.2 丁香酚对细菌细胞膜完整性的破坏作用分析

本研究结果表明,丁香酚对金黄色葡萄球菌具有较好的抗菌活性。通过生长曲线发现丁香酚可以有效抑制金黄色葡萄球菌的生长,并具有浓度相关性。随后观察丁香酚对金黄色葡萄球菌细胞膜的完整性和细菌形态结构的影响,金黄色葡萄球菌细胞膜的完整性是其存活、繁殖、感染的重要保障,然而,当细菌细胞膜完整性受到破坏后,会引起细胞膜的破裂,胞内外物质交换发生障碍,最终导致菌体形态结构受损,甚至引起菌体死亡^[21]。AKP 是位于细胞膜和细胞壁之间的磷酸酶,细菌的核酸、蛋白质存在于细菌内部,当细菌细胞壁结构改变,膜通透性变化,就会引起内容物的泄漏^[22]。丁香酚的化学结构中的羟基、 γ 位置的甲基等基团均可以改变细菌膜的通透性以及完整性^[23]。本研究结果可见,1/2 MIC 和 MIC 丁香酚处理后,培养液中的核酸

(A260)、蛋白(A280)以及 AKP 活性显著增加,对 NPN 和 PI 的摄取增加。扫描电镜和透射电镜下观察发现丁香酚处理后金黄色葡萄球菌菌体皱缩、穿洞、破碎,丁香酚能够引起菌体形态发生显著变化,且其变化情况与丁香酚的浓度呈正相关。结合以上实验可以证实丁香酚对金黄色葡萄球菌细胞膜的破坏和渗透,增加细胞膜的通透性,损害细胞壁的完整性,导致细菌内容物泄漏。同时发现,丁香酚对 MRSA 细胞壁的完整性损伤要强于对金黄色葡萄球菌的损伤。

3.3 丁香酚对细菌生物膜的破坏作用分析

BF 的特性为伤口或创面中的致病菌增殖和感染提供了独特的优势,保护它们免受宿主免疫系统和抗生素的侵害。被生物膜包裹的致病菌对抗生素的耐受度是浮游菌的 10~1 000 倍,所以这些致病菌不仅很难从伤口部位根除,还会延迟伤口或创面的愈合^[24]。伤口愈合的过程可分为 4 个阶段:凝血止血、炎症、增生和重塑,由于免疫细胞无法在伤口部位积聚以根除 BF,所以创口处 BF 的形成被认为是在炎症阶段^[25]。同时,这种免疫细胞的积累刺激了伤口部位持续的炎症状态,延缓了上皮细胞的形成和闭合。BF 对慢性伤口的影响为 80%,在急性伤口中相对较低为 6%。然而,在急性伤口模型的体内研究发现,BF 最早可在创伤后 3 d 即可形成,这说明 BF 可能在急性感染进展中也有作用,作为更深层的入侵方式,导致菌血症和败血症^[26-28]。因此近年来研究焦点关注于 BF 参与皮肤疾病的发生与发展。

抗生素的大规模使用导致耐药性菌株广泛传播,这已成为较严重的全球问题,而 BF 的生成会增强细菌对抗生素的耐药性,因此亟待寻求有效的治疗方案来解决这一难题。研究表明,包括丁香酚在内的其他精油成分,如反式肉桂醛、香茅醇和萜品醇等化合物已被证实能够有效清除细菌的 BF,通过血小板计数、刃天青染料还原实验、PI 染色并结合流式细胞术和共聚焦激光扫描显微镜等实验检测精油成分对大肠杆菌 BF 的清除作用,发现 3 mmol/L 丁香酚能够破坏 BF 的形成,导致生物膜内包裹的细菌代谢活性(49%)和增殖能力(84%)显著降低^[29]。金黄色葡萄球菌形成的复杂细胞外聚合生物膜结构,为微菌落的形成、繁殖、维持和扩散及再定植提供了保障^[30]。当细菌感受到外界环境的压力后,会分泌黏性基质包裹在细菌表面,维持细菌聚

合结构,抵抗外界不良因素的攻击并且提高菌群间的能量转换,促进细菌存活^[31]。与许多其它微生物功能一样,金黄色葡萄球菌生物膜形成和扩散与某些BF相关基因密不可分。细胞间黏附基因 *icaABCD* 可以编码细菌细胞之间的黏附过程,并且可以启动BF的形成^[32]。*fnbAB* 基因编码 FnbA 和 FnbB 蛋白,是金黄色葡萄球菌表面识别黏附基质分子(MSCRAMMS)中的一份子,能够帮助细菌附着于宿主细胞表面以形成BF^[31]; ClfA 和 ClfB 蛋白由 *clfA*、*clfB* 基因编码,也是金黄色葡萄球菌表面的MSCRAMMS 蛋白,能够促进金黄色葡萄球菌在宿主的定殖,从而促进BF的形成^[33]。

本研究发现,丁香酚对BF形成的抑制作用随着其浓度的升高而增强,对成熟BF的清除作用趋势同对BF形成的抑制作用保持一致,并且随丁香酚浓度的增大,其对成熟BF的清除能力亦越强。 $1/2$ MIC 和 MIC 丁香酚可以抑制BF的生成,促进成熟BF的清除,同时可以显著下调了BF相关的毒力因子 *sarA*、*agrA*、*icaA*、*cidA*、*clfA*、*clfB*、*fnbA*、*fnbB* 基因表达水平;这表明丁香酚可能通过抑制 *sarA*、*agrA* 基因的表达来调控 *icaA* 操纵子和 *cidA* 操纵子。在整个BF形成过程中金黄色葡萄球菌黏附因子(*clfA*、*clfB*、*fnbA*、*fnbB* 基因)对细菌黏附聚集发挥重要作用。由此可见,丁香酚可通过抑制BF形成过程中的相关毒力因子的表达,调控 *icaA* 和 *cidA* 操纵子,来抑制细菌黏附聚集在宿主细胞表面,进而控制BF的成熟。结果发现,丁香酚对MRSA的抑菌效果更甚于标准菌株,对膜结构的破坏作用更明显,根据这一结果推测丁香酚不受MRSA耐药菌体中与其耐药有关的基因或毒力因子的影响,甚至可能因为其耐药后与敏感株相比靶点改变的原因,导致丁香酚可以发挥更大的抑菌作用。本研究结果显示丁香酚对MRSA的抑菌效果更甚于标准菌株及对MRSA细胞壁的完整性损伤要强于对金黄色葡萄球菌的损伤,综合分析可能与其交互敏感现象存在密切关系,有关耐药细菌附带敏感性或交互敏感性机制目前尚未明确^[34],以此作为切入点有望成为对耐药病原菌感染防治研究的突破口,亦或是艾灸促进压疮等皮肤损伤创面修复发挥疗效的潜在因素之一。

3.4 局限性和未来研究方向

丁香酚可以破坏金黄色葡萄球菌细胞结构,改变细菌细胞壁的完整性及细胞膜的通透性,抑制菌

活力,发挥直接抑菌作用;同时可以抑制BF的生成及促进成熟BF的清除,抑制细菌BF形成和扩散相关毒力因子的表达,具有较好的抑菌活性,从不同方面限制了金黄色葡萄球菌的致病能力,这可能是艾灸促进压疮创面修复的机制之一。但是在金黄色葡萄球菌感染过程中,丁香酚对宿主细胞的保护作用还需进一步研究。本项目组前期致力于艾灸防治压疮的效应及机制研究,特别对于艾灸促进压疮组织血管新生及调控巨噬细胞极化方面取得一定进展^[12-17]。金黄色葡萄球菌作为压疮创面最主要存在病原菌之一,严重阻碍并延迟创面的愈合,丁香酚作为艾灸艾烟化学成分的主要药效成分之一,不仅具有显著的抑菌活性,还可以用作抗生素的增敏剂,本项目组将继续以此作为切入点,进一步通过体外和体内实验来探讨丁香酚对MRSA及金黄色葡萄球菌生物膜及黏附侵袭的抑制效果以及对金黄色葡萄球菌引发炎症的调节作用机制,以期对丁香酚在防治金黄色葡萄球菌引起皮肤感染及压疮提供理论依据,更深层次、多维度探讨艾灸促进压疮等皮肤损伤创面修复的机制,丰富该类疾病的防治策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cheung G Y C, Bae J S, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 547-569.
- [2] 宁自林, 储卫华. 畜禽养殖环境金黄色葡萄球菌耐药性及毒力因子分析 [J]. *湖北畜牧兽医*, 2017, 38(12): 7-9.
- [3] 张萍, 谢朝云, 杨忠玲. 老年压疮创面多重耐药菌感染影响因素 [J]. *中国消毒学杂志*, 2022, 39(12): 937-940.
- [4] Oliveira H B M, Selis N D N, Sampaio B A, et al. Citral modulates virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 16482.
- [5] 关鹏, 冻梓杰, 贺舒佳, 等. 低温对不同抗性金黄色葡萄球菌细胞膜完整性及相关基因表达的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(19): 16-22.
- [6] Nasser A, Dallal M M S, Jahanbakhshi S, et al. *Staphylococcus aureus*: Biofilm formation and strategies against it [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2022, 23(5): 664-678.
- [7] Idrees M, Sawant S, Karodia N, et al. *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(14): 7602.
- [8] Xie Y, Ma C, Yang X, et al. Phytonanomaterials as therapeutic agents and drug delivery carriers [J]. *Adv Drug*

- Deliv Rev*, 2021, 176: 113868.
- [9] 许小宇, 单思, 王雯蕾, 等. 不同加工工艺艾条艾烟化学成分的分析 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1): 506-509.
- [10] Nisar M F, Khadim M, Rafiq M, *et al.* Pharmacological properties and health benefits of eugenol: A comprehensive review [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 2497354.
- [11] 张翰墨. 心内科住院患者压疮病原菌分布及耐药情况分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(11): 1346-1349.
- [12] 于杰, 孙忠人, 李洪玲, 等. 艾灸治疗压疮的研究现状 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(6): 1183-1186.
- [13] 于杰, 孙忠人, 李洪玲, 等. 艾灸促进压力性损伤组织血管新生的机制研究 [J]. 中国全科医学, 2019, 22(12): 1453-1460.
- [14] 于杰, 孙忠人, 李洪玲, 等. 艾灸对压力性损伤大鼠创面修复的影响 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(25): 4-8.
- [15] 于杰, 孙忠人, 李洪玲, 等. 艾灸对压疮大鼠创面局部平均血流灌注量影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9): 90-96.
- [16] 于杰, 孙忠人, 李洪玲, 等. 对大鼠压疮缺血-再灌注损伤模型构建及应用的思考 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(7): 1210-1214.
- [17] 于杰, 李洪玲, 赵钢, 等. 回旋灸对压力性损伤大鼠创面组织超微结构的影响 [J]. 中国全科医学, 2023, 26(11): 1375-1381.
- [18] 符秀梅, 钟书辉, 薛根山, 等. IV期压疮感染患者的临床特征、病原菌分布及耐药性分析 [J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2020, 17(2): 85-89.
- [19] 王文华, 韩晓梅, 姬响华, 等. 水胶体敷料对压疮合并中重度感染的临床疗效 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(6): 949-952.
- [20] DeLeo F R, Otto M, Kreiswirth B N, *et al.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Lancet*, 2010, 375(9725): 1557-1568.
- [21] Sutton J A F, Carnell O T, Lafage L, *et al.* *Staphylococcus aureus* cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(3): e1009468.
- [22] Song X Q, Li R, Zhang Q, *et al.* Antibacterial effect and possible mechanism of salicylic acid microcapsules against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(19): 12761.
- [23] Seo S M, Lee J W, Shin J, *et al.* Development of cellulose nanocrystal-stabilized Pickering emulsions of massoia and nutmeg essential oils for the control of *Aedes albopictus* [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 12038.
- [24] Li Y Z, Xiao P, Wang Y L, *et al.* Mechanisms and control measures of mature biofilm resistance to antimicrobial agents in the clinical context [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(36): 22684-22690.
- [25] Moser C, Jensen P Ø, Thomsen K, *et al.* Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 625597.
- [26] Brandenburg K S, Weaver A J Jr, Karna S L R, *et al.* The impact of simultaneous inoculation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* on rodent burn wounds [J]. *Burns*, 2021, 47(8): 1818-1832.
- [27] Brandenburg K S, Weaver A J Jr, Karna S L R, *et al.* Formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in full-thickness scald burn wounds in rats [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13627.
- [28] Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34(5): 877-886.
- [29] Olszewska M A, Gędas A, Simões M. The effects of eugenol, trans-cinnamaldehyde, citronellol, and terpineol on *Escherichia coli* biofilm control as assessed by culture-dependent and-independent methods [J]. *Molecules*, 2020, 25(11): 2641.
- [30] Grossman A B, Burgin D J, Rice K C. Quantification of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by crystal violet and confocal microscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2341: 69-78.
- [31] Shaghayegh G, Cooksley C, Ramezanpour M, *et al.* Chronic rhinosinusitis, *S. aureus* biofilm and secreted products, inflammatory responses, and disease severity [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1362.
- [32] Kasela M, Grzegorzczak A, Nowakowicz-Dębek B, *et al.* The prevalence of virulence determinants and antibiotic resistance patterns in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a nursing home in Poland [J]. *Pathogens*, 2021, 10(4): 427.
- [33] Negrón O, Hur W S, Prasad J, *et al.* Fibrin(ogen) engagement of *S. aureus* promotes the host antimicrobial response and suppression of microbe dissemination following peritoneal infection [J]. *PLoS Pathog*, 2022, 18(1): e1010227.
- [34] 李倩, 朱奎. 耐药细菌中交互敏感现象研究进展 [J]. 微生物学报, 2022, 62(5): 1688-1697.

[责任编辑 金玉洁]