

• 药理与临床 •

紫苏叶油对鸡大肠杆菌的抗菌活性及生物被膜形成的抑制作用

李珞炫¹, 邓榕榕², 郑诗倩², 魏来娇¹, 汪蕴祺¹, 沈志滨^{1,2*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广东植肤生物科技有限公司, 广东 广州 510006

摘要: 目的 考察紫苏叶 *Perillae Folium* 油对鸡大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 的抗菌活性、生物被膜形成以及群体感应相关系统表达的影响, 为开发紫苏叶油为新型抗菌药物以替代饲用抗生素提供实验数据和理论基础。方法 采用微量稀释法测定紫苏叶油对 4 株 APEC 临床分离株的体外抗菌活性, 筛选敏感株; 活菌计数法测定紫苏叶油作用于 APEC 的时间-杀菌曲线。通过微板法构建 APEC 生物被膜体外模型, 用 CCK-8 法及结晶紫半定量黏附法测定 APEC 的生物被膜生长动力及总量生长曲线, 并测定紫苏叶油对 APEC 生物被膜的影响, 用扫描电子显微镜确认微观形态变化。通过 qRT-PCR 检测紫苏叶油对 APEC 群体感应系统的影响。结果 紫苏叶油对 APEC 的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 2.000~2.667 mg/mL, 其中对紫苏叶油敏感性最强的是 APEC-3。时间-杀菌曲线结果显示, 紫苏叶油可延迟 APEC-3 进入对数生长期。生长曲线确定 APEC-3 的黏附、聚集及成熟期给药时间为 6、24、48 h。2MIC、MIC 紫苏叶油显著降低 APEC-3 生物被膜生长动力 ($P < 0.05$ 、 0.01), 2MIC、MIC、1/2MIC 紫苏叶油均可减少生物被膜总量 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 紫苏叶油可下调成熟期 APEC-3 群体感应系统 *luxS* 和 *sdia* 基因表达 ($P < 0.001$)。结论 紫苏叶油对 APEC 有良好的抗菌活性, 且对 APEC-3 不同生长阶段的生物被膜有一定的抑制作用。群体感应抑制可能是通过单独或同时下调细菌群体感应系统的 *luxS* 和 *sdia* 来介导的。

关键词: 紫苏叶油; 鸡大肠杆菌; 生物被膜; 群体感应; 抗菌活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)08-2840-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.019

Antibacterial activity of oil from *Perillae Folium* against avian pathogenic *Escherichia coli* and its inhibitory effect on biofilm formation

LI Luoxuan¹, DENG Rongrong², ZHENG Shiqian², WEI Lajiao¹, WANG Yunqi¹, SHEN Zhibin^{1,2}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Skin Transplant Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the antibacterial activity, biofilm formation, and modulation of quorum sensing-related systems of oil from Zisuye (*Perillae Folium*, PO) against avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), thereby providing experimental data and a theoretical foundation for developing PO as a novel antibacterial agent to replace feed antibiotics. **Methods** The microdilution method was used to determine the *in vitro* antibacterial activity of PO against four APEC clinical isolates and screen sensitive strains; The viable count method was employed to measure the time-kill curve of PO against APEC. An *in vitro* APEC biofilm model was constructed using the microplate assay. The biofilm growth dynamics and total growth curve of APEC were evaluated via the CCK-8 assay and crystal violet semi-quantitative adhesion assay, and the effect of PO on APEC biofilms was assessed. Scanning electron microscopy was applied to confirm microscopic morphological changes. The effect of PO on the quorum sensing system of APEC was analyzed by qRT-PCR. **Results** The minimum inhibitory concentration (MIC) of PO against APEC ranged from 2.000 to 2.667 mg/mL, with APEC-3 exhibiting the highest sensitivity to PO. Time-kill curve results demonstrated that PO delayed the entry of APEC-3 into the logarithmic growth phase. Growth

收稿日期: 2024-10-24

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项项目 (2018YFC1707100)

作者简介: 李珞炫, 硕士研究生, 研究方向为中药药效评价与应用。E-mail: 845127105@qq.com

*通信作者: 沈志滨, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及新药研发研究。E-mail: szb8113@126.com

curve analysis identified the adhesion, aggregation, and maturation phases of APEC-3 at 6 h, 24 h, and 48 h, respectively. PO at 2MIC and MIC significantly reduced the biofilm growth dynamics of APEC-3 ($P < 0.05, 0.01$). PO at 2MIC, MIC and 1/2MIC decreased the total biofilm biomass ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). PO down-regulated the expression of the quorum sensing-related genes *luxS* and *sdhA* in APEC-3 during the maturation phase ($P < 0.001$). **Conclusion** PO exhibits potent antibacterial activity against APEC and effectively inhibits biofilm formation in APEC-3 across its different developmental stages. The quorum sensing inhibition is mediated by down-regulating the *luxS* and/or *sdhA* genes of the bacterial quorum sensing system, either individually or concurrently.

Key words: oil from *Perillae Folium*; avian pathogenic *Escherichia coli*; biofilm; quorum sensing; antibacterial activity

鸡腹泻病是由多重因素诱发的鸡只拉稀、下痢症状的统称，广泛肆虐于养鸡场，是目前养鸡业防治之难题^[1]。此病多发生于雏鸡，死亡率颇高，严重制约养鸡业的发展，造成巨大的经济损失。调查显示，1 月龄内的雏鸡群中腹泻发病率为 10%~30%，致死率高达 50%。根据鸡腹泻的致病缘由，可将其划分为细菌性、真菌性、病毒性、寄生虫性、营养性等^[2]。其中，肠道细菌感染是引起腹泻的主要原因，其症状主要表现为排灰白色、白色、黄色、淡绿色或黄绿色稀粪便^[3-4]。细菌性腹泻常与其他病并发或继发感染，导致鸡的死亡率攀升、生长发育受阻、饲料转化率降低等一系列问题，严重危害养鸡业。病鸡中致病菌的检出率由高至低依次为鸡大肠杆菌（avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC）、鸡白痢沙门氏菌（*Salmonella pullorum*, SP）、志贺氏菌（*Shigella*）等。其中，福氏志贺氏菌（*Shigella flexneri*, SF）为检出志贺氏菌的优势血清型^[5-7]。随着饲用抗生素的滥用陆续引发的各种不良事件，世界各国逐步建立和完善禁用饲用抗生素的相关法规^[8]。

本课题组前期研究发现，紫苏叶油^[9]对鸡大肠杆菌临床分离株具有良好的抑制活性。目前关于紫苏叶油抑菌活性的研究主要集中在临床常见菌大肠杆菌，但对其他高检出率的致病菌的抗菌活性、生物被膜抑制作用及机制未见报道。因此，本研究以紫苏叶油为受试药物，鸡细菌性腹泻常见病原菌 APEC 为研究对象，考察紫苏叶油对该病原菌的抗菌活性^[10]、生物被膜形成的作用及群体感应关键基因的影响，探讨紫苏叶油对病原菌的抗菌效果及生物被膜形成的作用机制，为其开发成为新型饲用抗菌药物提供理论支持，为细菌性感染引起的鸡腹泻的治疗提供指导意义。

1 材料

1.1 菌株

鸡大肠杆菌临床分离株共 4 株（APEC-1~APEC-4），购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心；

大肠杆菌质控菌株（*Escherichia coli*, ATCC@25922），购自广东省微生物菌种保藏中心。

1.2 药品与试剂

紫苏叶油（批号 C10224610，淡黄色油状液体，比重 1.498 5~1.512 0，其中紫苏醛质量分数 $\geq 55\%$ ）购自上海麦克林生化科技有限公司；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO，批号 20190616）购自天津百世化工有限公司；盐酸金霉素（质量分数 $\geq 99\%$ ，批号 20200812057HX）购自合肥普润斯生物科技有限公司；CCK-8 试剂盒（批号 MA218-5-Sep-08F）购自大连美仑生物技术有限公司；结晶紫（批号 20181202）购自美国 Amresco 公司；戊二醛固定液（批号 L17D11G134782）购自上海源叶生物科技有限公司；DEPC（批号 1609-47-8）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；Trizol（批号 AKF0723A）购自美国 Invitrogen 公司；SYBR Premix EX Taq II Kit（批号 AHX1211N）、Prime Script™ RT reagent Kit（批号 AK2704）购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 仪器

JSM-7610F 型 Plus 场发射扫描电子显微镜（scanning electron microscope, SEM，日本电子株式会社）；iMark 酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；DHP-9032B 型电热恒温培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）；FA2104 型电子分析天平（上海天平仪器厂）；7300 型荧光定量仪（美国 ABI 公司）；C1000 Thermal cycler PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 样品和菌液的制备

2.1.1 紫苏叶油和盐酸金霉素溶液的制备 紫苏叶油和盐酸金霉素分别以 DMSO 溶解，制成 400 mg/mL 紫苏叶油贮备液和 200 mg/mL 盐酸金霉素贮备液，用封口膜密封贮备液离心管口，避光保存于 4 °C 冰箱，备用。

2.1.2 菌悬液的制备 将受试菌活化 2 代后接种于营养琼脂培养基上，35 °C 培养 18 h。采用菌液倍比稀释法配成终浓度为 1×10^6 CFU/mL 菌液，作为实

验菌悬液。

2.2 紫苏叶油对 APEC 的体外抑菌活性测定

2.2.1 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 的测定 参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 制定的 M07-A9 方案中的微量稀释法^[11-13]测定紫苏叶油对 APEC 的 MIC 和 MBC。无菌 96 孔板中加入不同质量浓度的紫苏叶油 (62.5~32 000 μg/mL) 或盐酸金霉素 (3.906~2 000 μg/mL), 加入菌悬液混合, 同时设置生长对照孔和空白对照孔。至 35 °C 恒温箱中培养 18~24 h, 肉眼观察, 无菌生长的各孔质量浓度最低者即为 MIC。吸取无菌生长所在孔的培养液 10 μL 接种于固体培养基上, 35 °C 恒温培养 18~24 h, 肉眼观察, 以少于 3 个菌落生长的药物孔相应的质量浓度为 MBC。

2.2.2 时间-杀菌曲线 将紫苏叶油和盐酸金霉素组分别设置 3 个质量浓度 (1/2MIC、MIC、2MIC), 与菌液混匀, 同时设置生长对照组, 于 35 °C 恒温振荡箱中培养^[14-16]。各组每隔 2 h 取培养液合理稀释后, 取 20 μL 均匀涂布在固体培养基上, 35 °C 恒温静置培养 24 h 后计算菌落数。根据实验结果, 以时间为横坐标 (X), 活菌量取对数值为纵坐标 (Y), 绘制时间-杀菌曲线。

2.3 紫苏叶油对 APEC 生物被膜活性的抑制作用

2.3.1 CCK-8 法测定 APEC 生物被膜生长动力 取 200 μL APEC-3 菌悬液 (1×10⁶ CFU/mL) 接种于平底 96 孔板, 于 35 °C 分别静置培养 0、3、6、12、24、36、48、72、96 h 取出, 吸弃孔内液体, 无菌 PBS 冲洗 3 次, 除去浮游细菌, 制得不同生长时段的生物被膜微量平板。避光条件下, 各孔加入培养基 100 μL 和 CCK-8 溶液 10 μL, 混匀, 35 °C 避光孵育 1 h。采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次, 绘制受试菌株生物被膜生长动力曲线^[10,17]。

2.3.2 结晶紫半定量黏附法测定 APEC 生物被膜总量 取 200 μL APEC-3 菌悬液 (1×10⁶ CFU/mL) 接种于平底 96 孔板, 于 35 °C 分别静置培养 0、3、6、12、24、36、48、72、96 h 取出, 吸弃孔内液体, 无菌 PBS 冲洗 3 次, 除去浮游细菌。200 μL 甲醇固定生物被膜 30 min, 弃去甲醇, 加入 0.1% 结晶紫染液 200 μL, 染色 15 min 后用 PBS 洗去未黏附染料。加入 200 μL 95% 乙醇溶解生物被膜结合染料, 静置

10 min, 采用酶标仪测定 570 nm 处的 A 值, 绘制受试菌株生物被膜总量生长曲线^[18-21]。

2.3.3 活菌计数法测定药物对生物被膜活菌量的影响 根据“2.3.1”与“2.3.2”项下生物被膜体外模型建立结果, 确定黏附期、聚集期、成熟期的生物被膜并建立后, 用 PBS 漂洗。分别加入 3 个梯度浓度药物 200 μL (1/2MIC、MIC、2MIC 紫苏叶油和盐酸金霉素)。生长对照组只加空白培养基, 空白对照组仅含 TSB。35 °C 培养 24 h, 按“2.3.1”和“2.3.2”项下方法进行测定, 计算生物被膜的生长动力和生物被膜总量。

2.3.4 SEM 观察药物对不同阶段生物被膜微观形态结构的影响 将 1 mL APEC-3 菌悬液 (1×10⁶ CFU/mL) 接种至放置有细胞爬片的 24 孔板中, 35 °C 恒温静置培养 12、24、48 h, 用 PBS 漂洗; 分别加入 3 个梯度浓度药物 200 μL (1/2MIC、MIC、2MIC 的紫苏叶油和盐酸金霉素)。生长对照组只加空白培养基, 35 °C 继续培养 24 h, 吸弃孔内液体, 取出爬片, 用 PBS 漂洗; 加入预冷的 2.5% 戊二醛固定液, 于 4 °C 固定过夜; 使用梯度乙醇进行梯度洗脱, 以 100% 叔丁醇置换乙醇, 室温挥干, 喷金进行 SEM 观察^[22-24]。

2.4 紫苏叶油对 APEC 生物被膜各阶段的群体感应相关基因表达的影响

设置对照组、1/2MIC 紫苏叶油组、MIC 紫苏叶油组和 2MIC 紫苏叶油组。将 1 mL APEC-3 菌悬液 (1×10⁶ CFU/mL) 接种于无菌 24 孔板, 35 °C 恒温静置培养 12、24、48 h, 用 PBS 漂洗; 各组分别加入相应质量浓度的含药 TSB 培养基, 对照组加入等量空白培养基, 培养 24 h, 离心获得培养物, 于 -80 °C 保存。提取细菌 RNA 后进行总 RNA 纯度检测。制备去基因组后进行逆转录反应, 进行 qRT-PCR 反应^[25-28]。引物序列见表 1。

2.5 统计学分析

所有实验数据均在相同的条件下重复 3 次, 数

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>sidA</i>	F: GGGAAAAGGACAAAAAGCCC R: CGAAGCACAGCCGTTATGG
<i>luxS</i>	F: CAGCCATTGGCGAGATATC R: AGGGATCCATACCCTGGAGC
<i>16S RNA</i>	F: CATGCCGCGTGTATGAAGAA R: TTCTGCGGGTAACGTC AATG

据分析采用 Graphpad 14.0 统计学软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 紫苏叶油对 APEC 的体外抑菌活性

3.1.1 紫苏叶油对 APEC 的 MIC 和 MBC 如表 2

表 2 紫苏叶油对 APEC 的体外抑菌活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 *In vitro* antibacterial activity of oil from *Perillae Folium* against APEC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

菌株编号	紫苏叶油		盐酸金霉素	
	MIC/(mg·mL ⁻¹)	MBC/(mg·mL ⁻¹)	MIC/(mg·mL ⁻¹)	MBC/(mg·mL ⁻¹)
APEC-1	2.667 ± 0.940	4.000 ± 0.000	0.125 ± 0.000	0.485 ± 0.386
APEC-2	2.667 ± 0.940	4.000 ± 0.000	0.168 ± 0.589	0.500 ± 0.354
APEC-3	2.000 ± 0.000	4.000 ± 0.000	0.250 ± 0.000	0.500 ± 0.354
APEC-4	2.667 ± 0.940	4.000 ± 0.000	0.125 ± 0.000	0.333 ± 0.118

3.1.2 时间-杀菌曲线 如图 1 所示, APEC-3 在 2 h 进入对数生长期, 24 h 后达到成熟期。给药组 lg 活菌量下降 1~2 CFU/mL 判定具有抑菌活性, lg 活菌量下降 ≥ 3 CFU/mL 判定为具有杀菌活性。1/2MIC 紫苏叶油组在 4~12 h 对 APEC-3 显示为杀菌作用 (6.302 0~8.862 6 CFU/mL), 随着时间延长其杀菌作用减弱。MIC 紫苏叶油组、2MIC 紫苏叶油组在 0~12 h 对 APEC-3 的杀菌作用较强于 1/2MIC 组 (MIC 紫苏叶油组 5.499 4~5.833 3 CFU/mL, 2MIC 紫苏叶油组 5.503 5~4.465 1 CFU/mL)。2MIC 盐酸金霉素组在 2~8 h 有明显杀菌作用 (5.428 1~7.176 0 CFU/mL), MIC 盐酸金霉素组在 8~24 h 有杀菌作用, 1/2MIC 盐酸金霉素组未见杀菌效果。

3.2 紫苏叶油对 APEC 不同阶段生物被膜的影响

3.2.1 APEC 生物被膜模型曲线 APEC-3 生物被

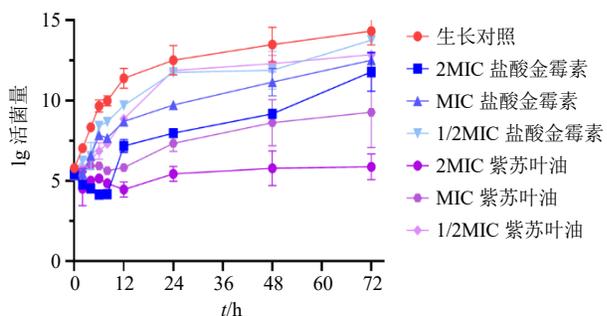


图 1 紫苏叶油对 APEC-3 的时间-杀菌曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Time-kill curve of oil from *Perillae Folium* against APEC-3 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

所示, 紫苏叶油和盐酸金霉素对 4 株 APEC 临床株的 MIC 为 2.000~2.667 mg/mL 和 0.125~0.168 mg/mL; MBC 为 4.000 和 0.333~0.500 mg/mL, 表明紫苏叶油对 4 株 APEC 均有良好的抑制作用。其中 APEC-3 对盐酸金霉素较不敏感, 对紫苏叶油敏感, 由于 APEC-3 血清型属于临床检出常见的血清型 O78, 因此后续选择 APEC-3 作为受试菌株。

膜生长动力曲线见图 2-A, APEC-3 生物被膜生长动力曲线主要分为 3 个阶段: 黏附阶段 (0~24 h), 曲线呈指数增长, 细菌快速繁殖; 聚集生长阶段 (24~36 h), 细菌生长速率减慢, 聚集准备形成生物被膜; 成熟阶段 (36~72 h), 曲线趋于平缓, 细菌活细胞量保持不变。APEC-3 生物被膜总量生长曲线如图 2-B 所示, APEC-3 生物被膜总量生长曲线有 3 个阶段, 分别对应黏附期 (0~24 h), 曲线上升速度最快, 细菌大量繁殖; 聚集期 (24~36 h), 细菌开始形成微菌落; 成熟期 (36~72 h), 生物被膜总量相对稳定, 微菌落发育成生物被膜。

3.2.2 紫苏叶油对 APEC-3 生物被膜形成的影响 采用 CCK-8 试剂盒测定不同质量浓度的药物对黏附期 (12 h)、聚集期 (24 h) 和成熟期 (48 h) APEC-3 生物被膜黏附率的影响, 结果见图 3。与生长对照组相比, 2MIC、MIC 紫苏叶油显著降低 APEC-3 生物被膜内活菌量 ($P < 0.05, 0.001$), 且呈剂量相关性, 1/2MIC 紫苏叶油对生物被膜无明显影响。2MIC、MIC、1/2MIC 紫苏叶油在黏附、聚集、成熟期生物被膜活菌量分别减少 96.30%、56.88%、76.26%, 83.52%、31.70%、32.40% 和 11.27%、17.62%、16.59%, 作用效果依次为黏附期 > 成熟期 > 聚集期。在黏附阶段, 2MIC 和 MIC 紫苏叶油对生物被膜内细菌代谢活性抑制作用优于相同质量浓度下的盐酸金霉素; 聚集期在相同质量浓度下, 紫苏叶油和盐酸金霉素之间未见显著差异; 2MIC 紫苏叶油对成熟期生物被膜内细菌代谢活性的作用效果显著优于相同质量浓度的盐酸金霉素 ($P < 0.01$)。

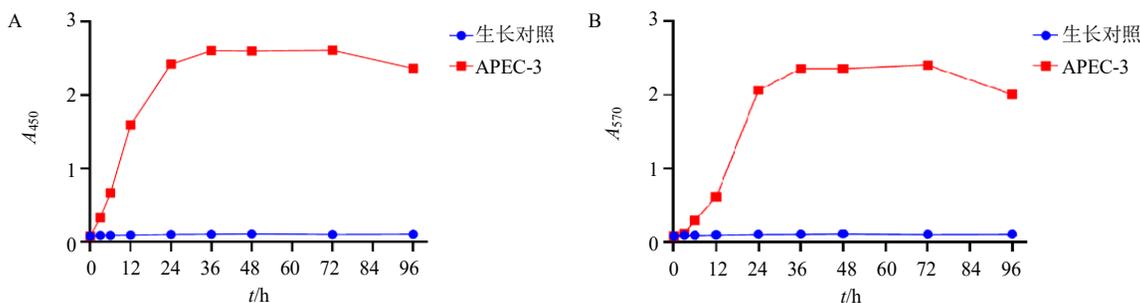
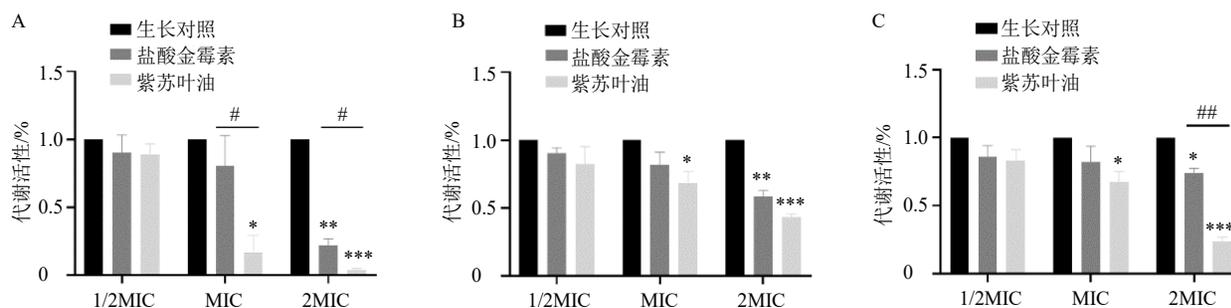


图 2 APEC-3 生物被膜生长动力曲线 (A) 和总量生长曲线 (B)

Fig. 2 Growth kinetic curve (A) and total growth curve (B) of biofilm in APEC-3



A~C 分别为药物在 12 h (黏附阶段)、24 h (聚集阶段)、48 h (成熟阶段) 对 APEC-3 代谢活性的作用; 与生长对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与盐酸金霉素组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 图 4 同。

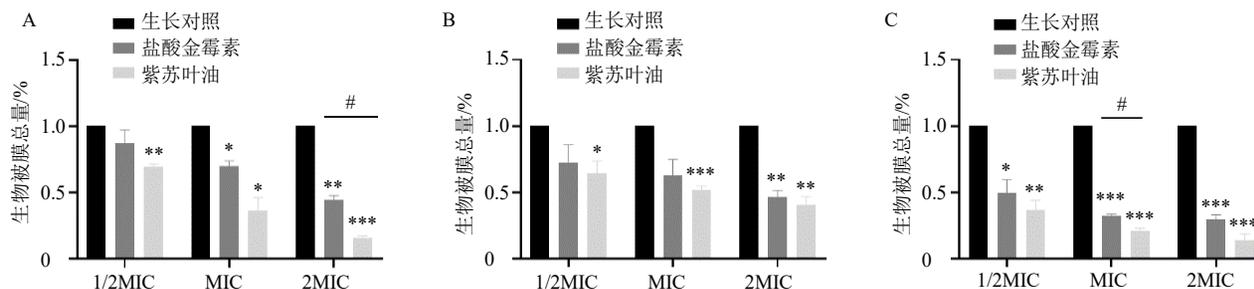
A—C are effects of drugs on APEC-3 metabolic activity at 12 h (adhesion stage), 24 h (aggregation stage) and 48 h (maturation stage), respectively; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs growth control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs chrysomycin hydrochloride group, same as Fig. 4.

图 3 CCK-8 法测定紫苏叶油对 APEC-3 生物被膜形成各阶段膜内细菌代谢活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of oil from *Perillae Folium* on bacterial metabolic activity in APEC-3 biofilm formation at different stages detected by CCK-8 method ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

使用结晶紫半定量黏附法测定药物作用于 APEC-3 黏附、聚集、成熟阶段的生物被膜后其生物被膜总量的变化, 结果见图 4。与生长对照组相比, 紫苏叶油各剂量组均有效减少生物被膜总量 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且呈剂量相关性。2MIC、MIC、1/2MIC 紫苏叶油在黏附、聚集、成熟期生物被膜总量分别下降了 84.45%、59.58%、85.86%,

63.63%、47.89%、79.13%, 30.81%、35.79%、63.05%, 作用效果依次为成熟期 > 黏附期 > 聚集期。在黏附阶段, 2MIC 紫苏叶油对生物被膜总量的清除作用优于相同质量浓度的盐酸金霉素 ($P < 0.05$); 聚集期紫苏叶油各剂量组与盐酸金霉素的作用均无显著差异; 成熟期 MIC 紫苏叶油对生物被膜总量的清除作用优于相同质量浓度的盐酸金霉素 ($P < 0.05$)。



A~C 分别为药物作用于 APEC-3 黏附、聚集、成熟阶段的生物被膜总量。

A—C are total biofilm of APEC-3 affected by drug during adhesion, aggregation and maturation stages.

图 4 结晶紫半定量黏附法测定紫苏叶油对 APEC-3 生物被膜形成各阶段生物被膜总量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of oil from *Perillae Folium* on total biofilm in APEC-3 biofilm formation at different stages detected by crystal violet semi-quantitative adhesion method ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2.3 SEM观察紫苏叶油对APEC-3生物被膜微观结构的影响 紫苏叶油与阳性对照药盐酸金霉素对APEC-3生物被膜黏附期(12h)、聚集期(24h)和成熟期(48h)的微观形态见图5。在黏附期,各

质量浓度的药物作用下细菌数量均相对减少,菌体结构变形,相同质量浓度的紫苏叶油组和盐酸金霉素组细菌量差异不大;2MIC和MIC药物处理下,菌体呈短杆状,细菌的分裂分化停滞。在聚集期,

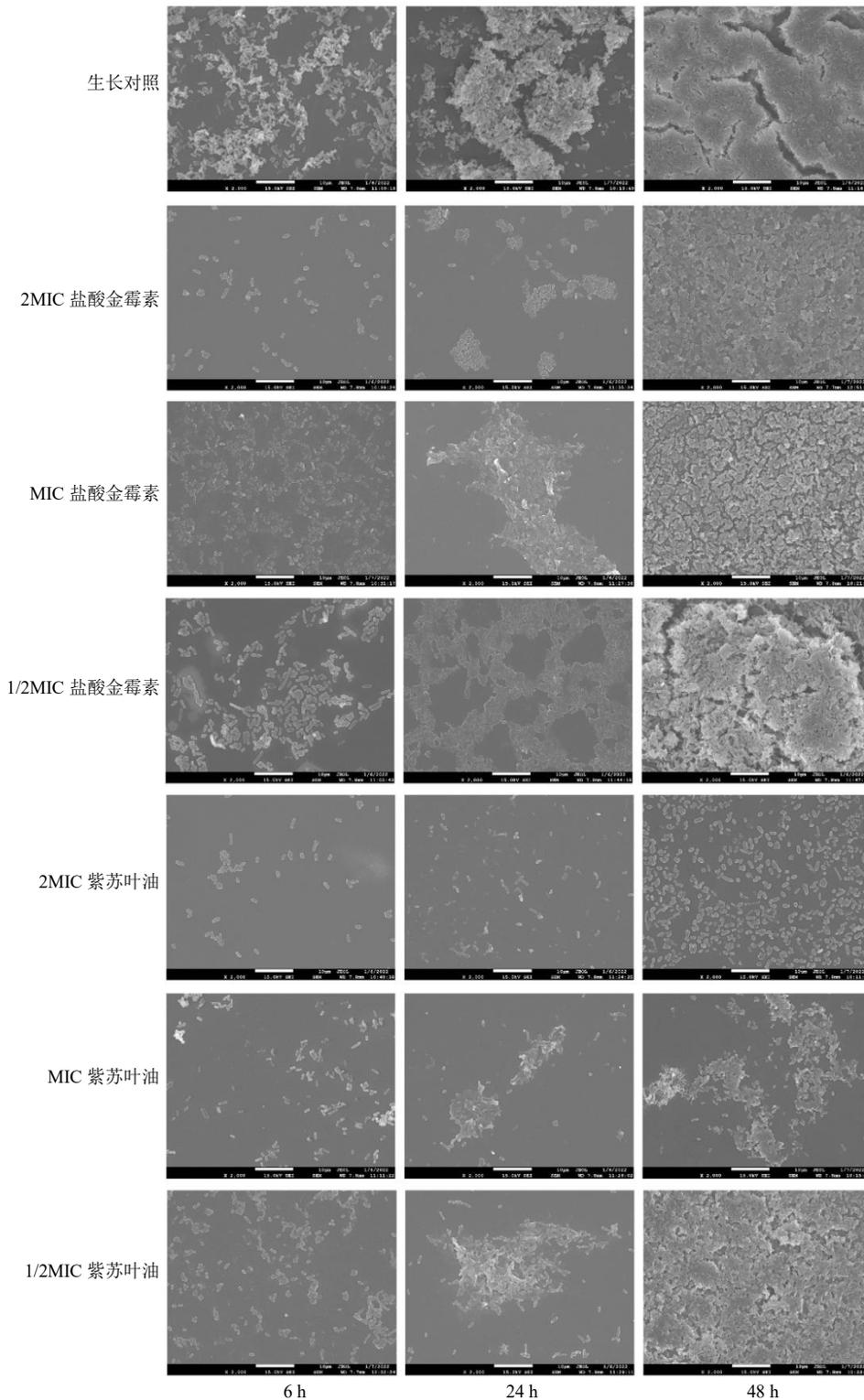


图5 SEM观察紫苏叶油对APEC-3不同阶段生物被膜形态结构的影响(×2000)

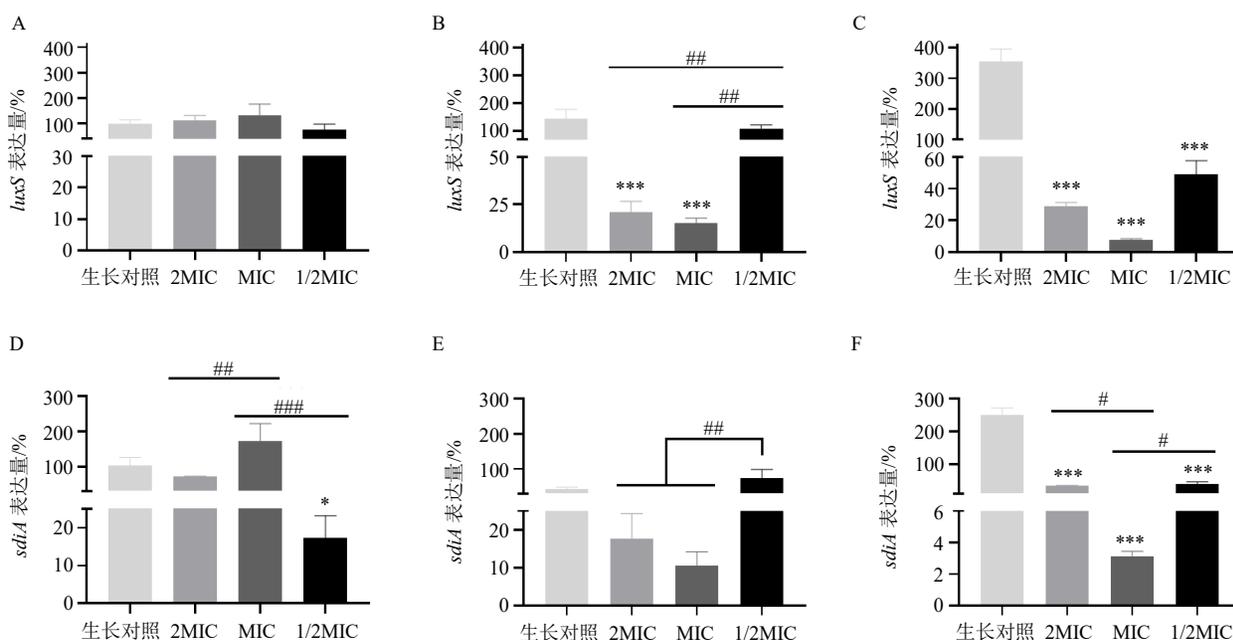
Fig. 5 Effect of oil from *Perillae Folium* on morphology of APEC-3 biofilm at different stages observed by SEM (×2000)

药物作用下细菌菌体出现变形、破裂，细菌数量大幅度减少；与盐酸金霉素相比，相同质量浓度的紫苏叶油组细菌量均相对较少，细菌团块相对破碎。在成熟期，各给药组均可一定程度减少细菌量，且呈剂量相关性，相较生长对照组和相同质量浓度的盐酸金霉素组，紫苏叶油使细菌量大幅减少，细菌外部胞外基质量减少，细菌间黏附程度降低。

3.3 紫苏叶油对 APEC 生物被膜各阶段的群体感应相关基因表达的影响

如图 6 所示，在黏附期，不同质量浓度的紫苏

叶油对 *luxS* 基因表达无明显影响，1/2MIC 紫苏叶油显著降低 *sdiA* 基因表达 ($P < 0.05$)，且 1/2MIC 组 *sdiA* 表达量显著低于 MIC 组 ($P < 0.001$)。在聚集期，2MIC、MIC 紫苏叶油显著降低 *luxS* 基因表达 ($P < 0.001$)，且 2MIC 组和 MIC 组 *luxS* 表达量均明显低于 1/2MIC 组 ($P < 0.01$)；各给药组 *sdiA* 基因表达量与生长对照组均无显著性差异。在成熟期，2MIC、MIC、1/2MIC 紫苏叶油均显著降低 *luxS* 和 *sdiA* 的表达 ($P < 0.0001$)，其中 MIC 组对 *sdiA* 表达的抑制作用优于其他剂量组 ($P < 0.05$)。



A~C 为 *luxS* 表达情况；D~F 为 *sdiA* 表达情况；A、D 为黏附期（12 h）；B、E 为聚集期（24 h）；C、F 为成熟期（48 h）；与生长对照组比较；* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ ；# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A—C are *luxS* expression; D—F are *sdiA* expression; A, D are adhesion phase (12 h); B, E are aggregation phase (24 h); C, F are maturation phase (48 h); * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs growth control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

图 6 紫苏叶油对 APEC-3 生物被膜各阶段的群体感应关键基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of oil from *Perillae Folium* on expressions of key genes involved in quorum sensing at various stages of APEC-3 biofilm ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

大肠杆菌作为鸡群中最常见的病原体之一，不仅威胁鸡的健康，还可以感染其他常见的经济动物。尤为严重的是，大肠杆菌生物被膜这一复杂的结构的形成会导致各种感染的发生且根除困难。目前，针对鸡细菌性疾病的治疗基本以抗生素药物为主，但频繁、大量使用抗生素治疗不但会导致病原菌耐药性不断攀升，而且会削弱动物机体免疫力，从而更容易引起细菌性疾病，造成重大经济损失^[29]。抗生素在养殖业中长期不合理使用，已使得大肠杆菌等病原菌对抗生素产生多重耐药和交叉耐药现象^[30-31]，

严重影响了养殖业的可持续发展。同时，养殖业产品中抗生素残留超标带来了严重的食品安全和公共卫生隐患，严重威胁人类健康^[32-33]。紫苏叶油作为天然来源的植物提取物，来源广泛、价格低廉，具有较好的抑菌作用，本研究还发现了其对 APEC 的生物被膜有显著的清除作用，为生产肉鸡养殖行业替抗产品原料开发提供了新思路。

细菌生物被膜的形成是造成细菌性感染疾病反复、耐药、难以根治等问题的主要原因之一。细菌生物被膜是浮游状态下的细菌黏附于生物或非生物表面，通过自身分泌蛋白、多糖等胞外基质，

促进细菌间黏附并将自身包裹其中的一种膜状聚合物,是微生物适应环境生存的一种特殊生存模式^[34]。生物被膜的形成过程与细菌耐药程度密切相关,其形成时间与耐药程度呈正相关。本研究通过 CCK-8 法检测了紫苏叶油和盐酸金霉素对 APEC-3 生物被膜形成的黏附阶段、聚集阶段和成熟阶段膜内细菌的代谢活性,通过结晶紫半定量黏附法测定了紫苏叶油和盐酸金霉素对 APEC-3 生物被膜形成各阶段生物被膜总量的影响,利用 SEM 观察紫苏叶油和盐酸金霉素对 APEC-3 生物被膜微观结构的影响。结果显示,各质量浓度的紫苏叶油均可一定程度上降低受试菌株各阶段生物被膜内细菌的代谢活性及生物被膜总量,其中 2MIC 紫苏叶油对黏附期 APEC 生物被膜的代谢活性及其总量的清除作用均显著优于相同质量浓度的盐酸金霉素;SEM 结果表明,紫苏叶油可有效减少受试菌株的细菌黏附,抑制细菌发育繁殖,并破坏其细胞结构。

群体感应系统调节的基因表达有助于生物被膜的形成和维持,并提高对常规抗菌药物和宿主先天免疫系统的耐受性^[35-36]。酰化高丝氨酸内酯 (acyl-homoserine lactones, AHLs) 和 LuxS/2 型自诱导物 (autoinducer 2, AI-2) 是大肠杆菌、沙门氏菌等革兰阴性菌常见的群体感应系统^[37-38]。在菌株体内, *sdiA* 基因编码的 SdiA 蛋白诱导合成 AHLs 信号分子后扩散到细胞外,当环境中 AHLs 浓度达到阈值时,与 LuxR 受体结合,激活下游基因的表达,从而引起各种生物活动包括促进生物被膜的形成^[39-41]。而由 *luxS* 基因编码的 LuxS 蛋白酶催化产生 AI-2 分子, AI-2 信号分子介导同种或不同种细菌间的信息交流方式,是调节与鞭毛生物合成、运动以及趋化作用相关的基因,进而影响生物被膜的形成^[42-43]。本研究通过 qRT-PCR 技术测定不同质量浓度的紫苏叶油对 APEC 不同阶段的生物被膜的群体感应相关基因 *luxS* 及 *sdiA* 表达的影响。结果表明,在黏附期,不同质量浓度的紫苏叶油对 *luxS* 表达无明显影响,1/2MIC 紫苏叶油可显著降低 *sdiA* 基因的表达量;在聚集期,各质量浓度的紫苏叶油对 *sdiA* 基因的表达量无明显影响,2MIC、MIC 紫苏叶油可显著降低 *luxS* 的表达量;在成熟期,各质量浓度的紫苏叶油均可显著降低 *sdiA* 和 *luxS* 的表达量。

综上,本研究发现紫苏叶油对 APEC 有良好的体外抗菌活性,对 APEC 不同生长阶段的生物被膜均有一定程度的清除作用。此外,紫苏叶油对 APEC

的作用效果部分优于阳性对照药盐酸金霉素,表明天然的紫苏叶油具有替代盐酸金霉素的潜力。本研究为紫苏叶油开发成替抗鸡饲料添加剂提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 程立功. 浅谈鸡腹泻的发病原因及诊治 [J]. 农技服务, 2014, 31(11): 140.
- [2] 管华新. 鸡腹泻发生的原因、诊断及治疗措施 [J]. 现代畜牧科技, 2018(8): 84.
- [3] 屈培成, 杜春仙, 窦婕香. 鸡腹泻的原因与防治 [J]. 河南畜牧兽医, 2006, 27(6): 26-27.
- [4] 张继军. 鸡开产后腹泻病因分析与防治 [J]. 山东畜牧兽医, 2007, 28(6): 65-66.
- [5] 詹先强, 俞建萍. 鸡腹泻常见病原菌的分离与鉴定 [J]. 福建畜牧兽医, 2014, 36(1): 7-9.
- [6] 苗银萍, 蒋大伟, 许兰菊, 等. 鸡腹泻病原菌的分离鉴定及药敏试验研究 [J]. 河南农业大学, 2012, 41(4): 148-153.
- [7] 宋海霞. 河南省鸡腹泻重要病原菌的分离鉴定与耐药性及 PCR 检测方法的研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [8] 王静慧. 血根碱对细菌生物被膜的作用研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012.
- [9] 魏长玲, 郭宝林. 紫苏叶挥发油的不同化学型及研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 2937-2944.
- [10] 左娟. 鸡蛋涂膜保鲜剂的配制及其保鲜效果的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2020. Performance standards for institute antimicrobial susceptibility testing [S]. Twenty-Second Informational Supplement. M100-S22.
- [12] Kipre B G, Guessennd N K, Koné M W, et al. Antibacterial activity of the stem bark of *Tieghemella heckelii* Pierre ex. A Chev against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 170.
- [13] Voukeng I K, Beng V P, Kuete V. Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against Gram-positive and Gram-negative multidrug resistant phenotypes [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 388.
- [14] Cunningham-Oakes E, Soren O, Moussa C, et al. Nordihydroguaiaretic acid enhances the activities of aminoglycosides against methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1195.
- [15] 陈浩. 利奈唑胺联合磷霉素对金黄色葡萄球菌的体外

- 抗菌活性及抗菌后效应研究 [J]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
- [16] Gupta P, Patel D K, Gupta V K, *et al.* Citral, a monoterpene aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Phytomedicine*, 2017, 34: 85-96.
- [17] 李娜. 紫苏精油提取及其防腐复合材料的制备和性能研究 [D]. 太原: 中北大学, 2018.
- [18] 闫玉卿, 张一敏, 董鹏程, 等. 次氯酸钠对德尔卑沙门氏菌生物被膜的抑制作用及机制 [J]. 食品科学, 2021, 42(13): 1-9.
- [19] 回丽媛, 李军, 朱明星, 等. 抗菌肽 17BIPHE2 对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 872-880.
- [20] 李小宁, 余潇, 黄晨蕾, 等. 氨溴索联合左氧氟沙星对肺炎克雷伯菌生物膜抑制和清除能力的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(10): 1103-1110.
- [21] 曾爱英, 廖星, 戴木森. 磷霉素联合美罗培南对铜绿假单胞菌生物被膜的影响 [J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(12): 158-159.
- [22] Ahn K B, Baik J E, Yun C H, *et al.* Lipoteichoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 327.
- [23] Kang J M, Liu L, Liu M H, *et al.* Antibacterial activity of gallic acid against *Shigella flexneri* and its effect on biofilm formation by repressing mdoH gene expression [J]. *Food Contr*, 2018, 94: 147-154.
- [24] Zou M M, Tao W Y, Ye X Q, *et al.* Evaluation of antimicrobial and antibiofilm properties of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves against *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 8(1): 139-149.
- [25] 贾沅铮. 鸡源奇异变形杆菌生物学特性及其 LuxS/AI-2 型群体感应系统研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [26] 杨清兰. 探究 LuxS/AI-2 对柠檬色明串珠菌 37 生物被膜形成的调控 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.
- [27] Xavier K B, Bassler B L. LuxS quorum sensing: More than just a numbers game [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(2): 191-197.
- [28] 吕小龙, 胡剑刚, 陈兆国, 等. luxS 基因缺失对禽致病性大肠杆菌 O₁、O₂ 和 O₇₈ 三种血清型分离株的生物学特性影响 [J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 238-246.
- [29] 陶梦珂, 李苗苗, 石晴晴, 等. 鸡源大肠杆菌生物被膜形成与耐药性、毒力基因的关联性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56(6): 86-93.
- [30] 张珍, 施开创, 王孝德, 等. 2015—2017 年广西鸡源沙门氏菌耐药性与致病性的相关性分析 [J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2350-2358.
- [31] 麻海澜, 樊宏亮, 周伟光, 等. 内蒙古地区犊牛源大肠杆菌的分离鉴定及其生物被膜的形成与耐药性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(2): 74-78.
- [32] 郝运, 周沁怡, 李锐, 等. 四川省动物源常见细菌耐药性现状 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(8): 107-111.
- [33] 任书麟, 刘峻诚, 吴淑玉, 等. 中草药防治鸡大肠杆菌病的研究进展 [J]. 山东畜牧兽医, 2024, 45(11): 96-98.
- [34] 阴银燕, 何凯明, 吴梦星, 等. 细菌生物被膜拮抗剂的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(10): 1162-1165.
- [35] 李苗苗. 亚抑菌浓度阿米卡星、环丙沙星及头孢曲松诱导对大肠埃希菌生物被膜形成的影响 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2024.
- [36] Pappenfort K, Bassler B L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(9): 576-588.
- [37] 宋茂林, 徐飞, 王浩, 等. 胞外聚合物作用机理及其在生态学中的应用 [J]. 山东林业科技, 2024, 54(4): 75-79.
- [38] Pacheco T, Gomes A É I, Siqueira N M G, *et al.* SdiA, a quorum-sensing regulator, suppresses fimbriae expression, biofilm formation, and quorum-sensing signaling molecules production in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 597735.
- [39] 王志豪, 左佳坤, 蒋蔚, 等. 酰基高丝氨酸内脂合成酶 LasI 对禽致病性大肠杆菌生物学特性的影响 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3355-3362.
- [40] 颜承海, 陈方惠, 詹彧繁, 等. 群体感应系统受体 SdiA 对大肠杆菌生物学特性的影响 [J]. 生物加工过程, 2024, 22(5): 560-568.
- [41] Yi L, Dong X, Grenier D, *et al.* Research progress of bacterial quorum sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 763: 143031.
- [42] Meng F Q, Zhao M W, Lu Z X. The LuxS/AI-2 system regulates the probiotic activities of lactic acid bacteria [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2022, 127: 272-279.
- [43] 孔兰芳. LsrR 调控 LuxS/AI-2 型群体感应系统影响禽致病性大肠杆菌胞内存活的机制 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.

[责任编辑 李亚楠]