

本文引文格式:蓝怡,戴园园,余艳妮,等.苦丁茶对大肠杆菌的抑菌作用及其机制研究[J].右江民族医学院学报,2023,45(5):741-746.

【论著与临床报道】

苦丁茶对大肠杆菌的抑菌作用及其机制研究

蓝怡¹,戴园园²,余艳妮¹,崔文卿²,葛珍珍²,何一恒²,杨珊³,李笑¹,覃艳春³

(1. 右江民族医学院药学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院,广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨苦丁茶对大肠杆菌的抑菌作用和作用机制。方法 苦丁茶作用大肠杆菌后,采用牛津杯法测定其最小抑菌浓度(MIC)、肉汤稀释法检测其最小杀菌浓度(MBC)、扫描电子显微镜观察细胞形态、结晶紫染色法检测生物被膜、胞内ATP的变化情况。结果 苦丁茶对大肠杆菌的MIC和MBC为16 mg/mL;与对照组相比,1/4 MIC作用后,大肠杆菌表面出现褶皱、粗糙、凹陷和扭曲等形态改变,随着药物浓度的升高其损伤更为明显;1/2 MIC(8 mg/mL)苦丁茶能显著抑制大肠杆菌生物膜的形成,同时8 mg/mL药物作用前后的大肠杆菌胞内ATP的差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 本研究初步揭示了苦丁茶作用大肠杆菌后,主要通过损伤大肠杆菌细胞形态、抑制生物膜的形成而发挥抗菌作用,为进一步开发其抗菌剂奠定基础。

关键词:苦丁茶;大肠杆菌;抑菌作用

中图分类号:R378.21

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)05-0741-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.05.008

Study for the antibacterial action of broadleaf holly leaf on Escherichia coli and its mechanism

Lan Yi¹, Dai Yuanyuan², Yu Yanni¹, Cui Wenqing², Ge Zhenzhen²,
He Yiheng², Yang Shan³, Li Xiao¹, Qin Yanchun³

(1. School of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 3. School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the antibacterial action of broadleaf holly leaf on Escherichia coli (E. coli) and its mechanism. **Methods** After the treatment of E. coli by broadleaf holly leaf, the minimum inhibitory concentration(MIC) was determined with Oxford cup method, the minimum bactericidal concentration (MBC) was determined with broth dilution method, the cell morphology was observed with scanning electron microscope (SEM), and the changes of ATP in biofilm and intracellular were detected with crystal violet staining method. **Results** The MIC and MBC of broadleaf holly leaf against E. coli were 16 mg/mL; Compared with the control group, the surface of E. coli had the morphological changes such as folds, roughness, depression and distortion after 1/4 MIC treatment, the damage was more obvious with the increasing drug concentra-

基金项目:大学生创新创业训练计划项目(S202110599094,S202210599107);百色市科学技术局科学研究与技术开发计划项目(20203403);右江民族医学院科研基金项目(yy2020ky025)

第一作者简介:蓝怡(2001-),女,在读本科生,E-mail:2923792646@qq.com

通讯作者简介:覃艳春(1978-),女,高级实验师,研究方向:医学微生物学与免疫学方面的研究,E-mail:404094224@qq.com

tion; Broadleaf holly leaf at 1/2 MIC (8 mg/mL) could significantly inhibit the formation of *E. coli* biofilm, and there was a statistically difference in intracellular ATP of *E. coli* before and after 8 mg/mL treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** This study preliminarily reveals that broadleaf holly leaf has a main antibacterial action by damaging the cell morphology of *E. coli* and inhibiting the formation of biofilm, which builds a foundation for further development of its antibacterial agents.

Key words: broadleaf holly leaf; *Escherichia coli*; antibacterial action

大肠杆菌是临床上常见的多重耐药细菌,耐药率呈逐年上升的趋势^[1]。临床上治疗大肠杆菌的药物主要是第三代头孢菌素,2021 年中国耐药细菌监测显示^[2],大肠杆菌的分离率最高,占临床总分离细菌的 18.96%,大肠埃希菌对头孢曲松、头孢噻肟、哌拉西林、甲氧苄啶-磺胺甲唑、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率均超过 50%,为此需要研究新的药物来抗耐药大肠杆菌。

中药由于具有品种多,价格便宜,耐药性小等特点,在细菌耐药性的问题上显示出了得天独厚的优势,在临床上有良好的应用前景。目前已有学者提出,从天然药物中寻找高效、低毒性的抗菌成分,研发新型抗菌药物,有望成为解决细菌多重耐药性的新方法^[3]。苦丁茶为冬青科冬青属植物,是一种中国南部地区广泛应用的药、茶两用植物,主产于广西、海南、广东等地。现代药理研究显示,苦丁茶具有降脂减肥、降血糖、抗动脉粥样硬化、抗氧化、抗病毒、抗菌等多种疗效,其治疗疾病的作用机理越来越受到人们的重视^[4-5]。苦丁茶含有丰富的多糖、多酚、黄酮等成分,因此广泛的抗炎作用而被人熟知^[6]。但苦丁茶对大肠杆菌的抗菌机制尚少见到报道。本试验通过研究苦丁茶水提液对大肠杆菌的抗菌作用,并从生物膜、细胞形态和胞内 ATP 的释放等探讨苦丁茶对大肠杆菌的抗菌作用机制,旨在挖掘苦丁茶对抗大肠杆菌潜在的临床价值,并为研发治疗大肠杆菌中西医合剂提供重要的实验依据,同时也增加苦丁茶的经济价值。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验菌株 大肠杆菌 ATCC25922 购于广东省微生物菌种保藏中心,实验所用大肠杆菌从临床分离,并经过法国梅里埃全自动微生物鉴定及药敏分析系统(VITEK 2 Compact)和肠杆菌科细菌生化鉴定编码管鉴定。

1.1.2 中药 苦丁茶,购于广西百色市大参林药店,经药学院黄元河副教授确认为冬青科冬青属苦丁茶。

1.1.3 主要试剂 酵母提取物、琼脂、氯化钠(天津市鑫铂特化工有限公司);胰蛋白酶(北京奥博星生物技术有限责任公司);95%无水乙醇(天津市福晨化学试剂有限公司);磷酸缓冲盐粉剂(PBS)(北京雷根生物

技术有限公司);草酸铵结晶紫染色液(北京索莱宝科技有限公司);2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(上海源叶生物科技有限公司);SOO27ATP 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(APPH)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器 AC2-6S8-CN 生物安全柜(太仓艺斯高医疗器械科技有限公司);DHG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海慧泰仪器制造有限公司);D3024R 高速冷冻型微量离心机(南北仪器有限公司);SBC-12 小型离子溅射仪(北京中科科仪股份有限公司);KYKY-EM8100 扫描电子显微镜(北京中科科仪股份有限公司);Synergy H1 多功能酶标仪(上海新领生物科技发展有限公司);MQD-621R 立式双层大容量恒温振荡器(上海旻泉仪器有限公司);电子天平(奥豪斯仪器有限公司);CU-420 恒温水浴箱(浙江明德仪器有限公司);IFA-110-8 恒温培养箱(北京慧龙环科环境仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 苦丁茶提取液和菌液的制备

1.3.1.1 苦丁茶粗提物的制备 采用煮沸法^[7-8]提取药液,称取苦丁茶 500 g 加入 5 000 mL 蒸馏水,煮沸后,用文火煎煮,第 1 次为 1 h,第 2 次为 40 min。将两次药液合并后,浓缩到 50 mL,文火将其浓缩至 25 mL,冷冻干燥后备用。

1.3.1.2 菌液的制备 将大肠杆菌接种于 LB 培养基,37 °C 培养 18~24 h,选择菌落接种于 MH 营养肉汤培养基中,37 °C 培养 24 h 后,将菌液稀释至浊度为 1.5×10^8 cfu/mL 备用。

1.3.2 抑菌圈测定最小抑菌浓度 采用二倍稀释法将苦丁茶以无菌水稀释,分别稀释为 256 mg/mL、128 mg/mL、64 mg/mL、32 mg/mL、16 mg/mL、8 mg/mL 6 个浓度备用。采用牛津杯法^[9],向空白无菌培养皿中倒入 2% 的普通琼脂,冷却后,将牛津杯放置在普通琼脂上,轻轻按压至不留间隙,将 100 μ L 的菌液与 0.7% LB 琼脂混匀,然后倒入普通琼脂,当 0.7% LB 琼脂凝固后,缓缓转动牛津杯将其拿出,分别加入配制好的药液 100 μ L,置 37 °C 培养箱中培养 24 h 后,观察牛津杯周围是否有抑菌圈,以牛津杯周围无菌落生长

的最小药物浓度作为其最小抑菌浓度(MIC)。实验用尺测量抑菌圈直径,重复 3 次,取平均值。

1.3.3 苦丁茶对大肠杆菌生长曲线的影响 取上述配置好的菌液 100 μL 接种于含有 100 μL 肉汤培养基的无菌 96 孔板各孔中,将 32 mg/mL、16 mg/mL、8 mg/mL、4 mg/mL 各浓度的苦丁茶稀释液 100 μL 加入各孔中,空白对照组加入 100 μL 的 LB 肉汤。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h 后,OD570 nm 处每隔 2 h 测量吸光度值,以培养时间为横坐标,测出的 OD 值为纵坐标,并绘制 24 h 生长曲线^[10]。

1.3.4 苦丁茶对大肠杆菌生物膜的影响 参考温燕龙等^[11]的方法,在含有 200 μL 肉汤培养基的无菌 96 孔板各孔中加入 200 μL 配置好的菌液,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 48 h。培养结束后,弃去培养液,用 PBS 溶液轻柔漂洗 3 次,将 64 mg/mL、32 mg/mL、16 mg/mL、8 mg/mL、4 mg/mL 各浓度的苦丁茶稀释液 200 μL 加入各孔中,阴性对照组加入 200 μL LB 培养液,阳性对照组只加入 200 μL 菌悬液,每个浓度设置 3 个复孔,在培养箱里 24 h,培养结束后,弃去药液,用 PBS 轻柔漂洗 2 次,自然晾干,加入 2% 结晶紫溶液 100 μL ,染色 30 min,弃去染液,用 PBS 轻柔漂洗 3 次。加入 95% 乙醇 100 μL 于 96 孔板中,于 OD570 nm 处测量数值。

1.3.5 苦丁茶对大肠杆菌菌体形态的影响 取菌悬液分别与 16 mg/mL、8 mg/mL、4 mg/mL 各浓度的苦丁茶稀释液混合,所有样品均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h。取出以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,加入戊二醛溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。使用呈梯度的乙醇溶液(30%、50%、70%、80%、90%、100%)进行脱水,放入烘干箱烘干,真空条件下镀金处理,用扫描电子显微镜(scanning electron microscope,SEM)观察并拍摄大肠杆菌菌体和不同浓度苦丁茶稀释液处理后的大肠杆菌菌体形态变化^[12]。

1.3.6 苦丁茶对大肠杆菌胞内 ATP 水平的影响 按 ATP 检测试剂:ATP 检测试剂稀释液=1:4 比例配制 ATP 检测工作液,菌株划线纯化后,挑取单个菌落至 5 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌 16~18 h。第 2 天,以 1:10 比例转到 50 mL 新鲜培养基中,继续摇菌 4 h,5 000 g 离心,10 min,用 PBS(pH=7.4)洗涤和重悬细胞 3 次,调配制 OD=0.5,吸取调制好的菌液 500 μL 于 EP 管中,加入不同浓度的苦丁茶药液 500 μL 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 1 h。菌悬液在高速冷冻离心机(12 000 r/min)离心 5 min。去掉上清液,加入 400 μL 裂解液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,充分裂解细菌。裂解后 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清,用于细胞内 ATP 水平测定。每孔加入 100 μL ATP

检测工作液到 16196-3SSB(透明盖)黑色 96 孔板中,室温孵育 5 min,充分消耗本底 ATP,加入 20 μL 不同浓度的苦丁茶药液和标准品迅速用移液枪混匀,间隔 5 s 后用酶标仪测定 ATP 含量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 和 WPS 软件进行数据统计分析,两组间数据对比采用独立样本 t 检验(两尾法),以 $P < 0.05$ 为显著性的检验标准,即认为两组间有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 苦丁茶对大肠杆菌的最小抑菌浓度 由表 1 可知:苦丁茶对大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)为 16 mg/mL。

表 1 不同浓度苦丁茶提取液对大肠杆菌抑菌作用

菌株	抑菌浓度/(mg·mL ⁻¹)						
	256	128	64	32	16	8	4
ATCC25922	+++	++	++	++	++	+	-
E189	+++	++	++	++	+	-	-
E190	+++	++	++	++	+	-	-
E191	+++	++	++	++	+	-	-

注:判断标准为抑菌圈直径 $D > 20$ mm 为高度敏感,用“+++”表示; $15 < D \leq 20$ mm 为中度敏感,用“++”表示; $8 \leq D \leq 15$ mm 为低度敏感,用“+”表示; $D < 8$ mm 为不敏感,用“-”表示。

2.2 苦丁茶对大肠杆菌生长的影响 由图 1 可知:与对照组相比,4 mg/mL、8 mg/mL 浓度的苦丁茶对大肠杆菌曲线的抑制作用不明显,16 mg/mL 和 32 mg/mL 浓度的苦丁茶对大肠杆菌的生长都具有明显的抑制作用。大肠杆菌的对数生长期起始时间随着苦丁茶浓度增大而有所推迟,呈现浓度依赖性。

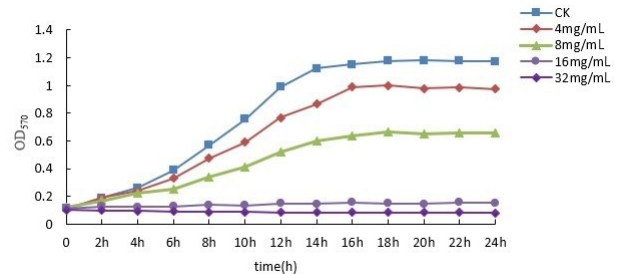
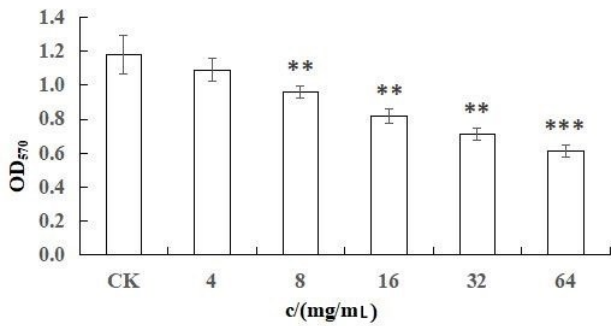


图 1 不同浓度苦丁茶药液对大肠杆菌生长影响

2.3 苦丁茶对大肠杆菌生物膜的影响 由图 2 可知:与对照组相比,苦丁茶能抑制大肠杆菌生物膜的形成,其对生物膜的抑制作用呈现浓度依赖性。4 mg/mL 苦丁茶药液处理后开始降低大肠杆菌生物膜的形成,8 mg/mL、16 mg/mL、32 mg/mL 苦丁茶药液处理后,明显降低大肠杆菌的生物膜生成($P < 0.01$),经 64

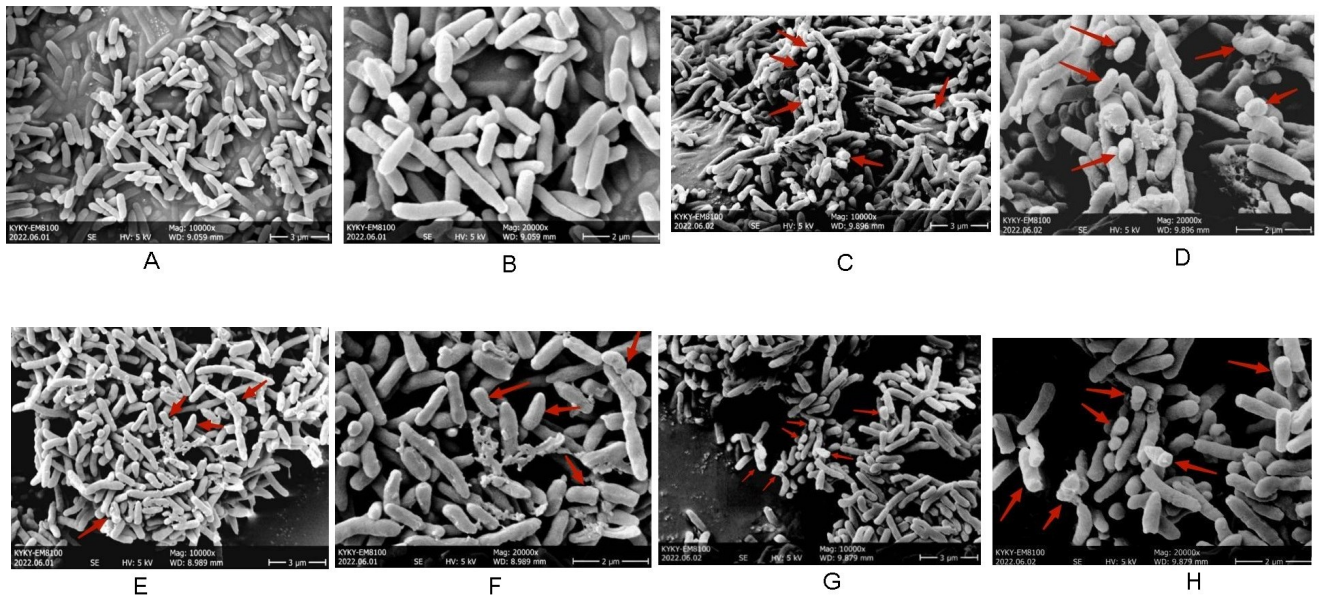
mg/mL 苦丁茶药液处理后降低大肠杆菌生物膜的形成 ($P < 0.001$)。



注:CK 为对照组。** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 2 不同浓度苦丁茶药液对大肠杆菌生物膜影响

2.4 苦丁茶对大肠杆菌菌体形态的影响 大肠杆菌的 SEM 图较直观地反映了苦丁茶对菌体形态的影响。对照组中大肠杆菌菌体结构完整,外观饱满,菌体近乎椭圆形,表面光滑,折光性好(见图 3A、图 3B)。当加入 4 mg/mL 浓度的苦丁茶处理后(见图 3C、图 3D),大量菌体表面粗糙,折光性降低,个别菌体体积缩小。当加入 8 mg/mL 浓度的苦丁茶处理后(见图 3E、图 3F),菌体数量减少,部分菌体塌陷,胞膜表面不平整。当更高浓度 16 mg/mL 的苦丁茶作用处理后(见图 3G、图 3H),菌体数量显著减少,体积明显减小,表面褶皱、变得极度粗糙,部分菌体形态不规则,有严重的凹陷和扭曲,形态严重受损,如图 3 红色箭头所示。



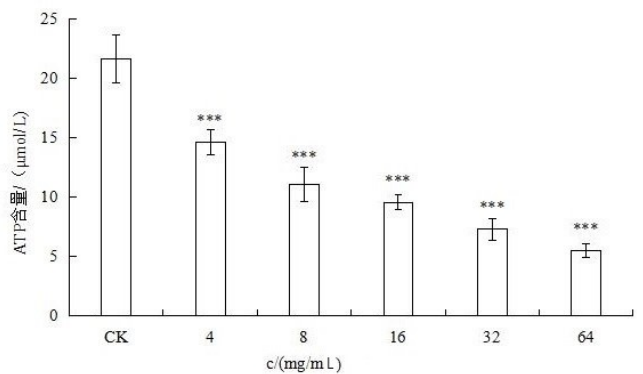
注:A. 大肠杆菌对照($\times 10\,000$);B. 大肠杆菌对照($\times 20\,000$);C. 苦丁茶 0.25 MIC 处理($\times 10\,000$);D. 苦丁茶 0.25 MIC 处理($\times 20\,000$);E. 苦丁茶 0.5 MIC 处理($\times 10\,000$);F. 苦丁茶 0.5 MIC 处理($\times 20\,000$);G. 苦丁茶 1 MIC 处理($\times 10\,000$);H. 苦丁茶 1 MIC 处理($\times 20\,000$)。

图 3 SEM 检测不同浓度苦丁茶水提液对大肠杆菌菌体形态的影响结果

2.5 苦丁茶抑制大肠杆菌胞内 ATP 产生 ATP 是一种为大肠杆菌的代谢和活力提供能量和动力的能量因子,由图 4 可知;与对照组相比,加入 4 mg/mL、8 mg/mL、16 mg/mL、32 mg/mL、64 mg/mL 的苦丁茶均使大肠杆菌胞内 ATP 含量降低,用药前后差异有统计学意义 ($P < 0.001$),表明苦丁茶的加入抑制大肠杆菌胞内 ATP 产生。

3 讨论

苦丁茶作为我国本土珍贵的中药资源,备受专家学者的关注,但是国内外关于苦丁茶的研究主要集中在其化学组成成分和生物学活性方面,因此,研究苦丁茶对大肠杆菌的抑菌作用及机制,能为其作为先导药物应用于大肠杆菌引起的各种疾病提供理论依据。



注:CK 为对照组。*** $P < 0.001$ 。

图 4 不同浓度苦丁茶提取液对大肠杆菌胞内 ATP 水平的影响

对数生长期是微生物生长的重要环节,在对数生长期期间,微生物表现出快速的生长和增殖速度^[13]。苦丁茶作用后对大肠杆菌的生长曲线测定结果表明苦丁茶对大肠杆菌生长具有明显的抑制效果。大多数致病细菌和环境细菌都生活在生物膜群落中^[14],细菌的生物膜^[15]通过特异性毒性因子附着、胞外多糖保护其免受特定的环境条件影响提高细菌抵抗外部不良环境的能力,提高其对抗生素的抵抗力,从而增加了抗药性,导致细菌逃逸宿主细胞的免疫防御,最终造成机体的持续性感染。大肠杆菌也有形成生物膜的能力,因此研究中药抗大肠杆菌生物膜意义非凡。对中药抗大肠杆菌生物膜机制的研究发现,许多中药具有抑制大肠杆菌生物膜形成和破坏生物膜的作用^[16],如蜂胶中药提取物可以通过抑制细菌的 DNA 合成和膜蛋白的合成,从而破坏生物膜^[17]。本研究发现不同浓度苦丁茶均能抑制大肠杆菌生物膜的形成,该结果与贺常亮^[18]在筛选可以治疗鸡大肠杆菌的中药方剂时,发现多种组分主要是影响大肠杆菌的细胞膜通透性、破坏细胞结构的实验结论相符。大肠杆菌生物膜的形成是一个复杂的过程,需要如群体感应基因(quorum sensing, QS)、*luxS*、*pgaABCD*、*qseBC* 等基因的参与^[19]。相关研究表明, QS 达到一定浓度之后,可以参与细菌生物膜的形成和毒力因子的表达^[20]。QS 和抗生素不同,不会对细菌产生选择压力,进而减少抗性突变体的出现和传播^[21]。苦丁茶可能经过抑制 DNA 合成、膜蛋白的合成和群体 QS 破坏大肠杆菌的生物膜。

扫描电子显微镜能够使细菌放大 20~130 000 倍,并有很高的分辨率^[22]。通过 SEM 结果显示苦丁茶作用后大肠杆菌数量减少,表面出现褶皱、粗糙、凹陷和扭曲,形态受损,而且随着药物浓度增加形态受损更严重,其机制可能是苦丁茶损伤大肠杆菌的细胞膜,使大肠杆菌膜通透性增高,导致细胞内容物的大量外泄,使得大肠杆菌膜凹陷,形成褶皱。

ATP 是主要的供能物质,细胞代谢过程中会消耗大量的能量,ATP 作为许多重要反应的能量来源,在所有活细胞中起着至关重要的作用^[23]。经过不同浓度的苦丁茶处理后均能降低大肠杆菌胞内 ATP 的含量,可能是由于细胞膜通透性的改变、膜损伤或细胞水解速率加快、呼吸受到抑制,为保证细胞的质子动势平衡 ATP 的渗漏或快速耗竭^[24-25]。有关报道^[26],肉桂和香薰精油可通过诱导细胞渗漏降低对大肠杆菌和单核增生李斯特细胞内 ATP 含量并发挥抗菌作用。

综上所述,苦丁茶主要通过抑制大肠杆菌生物膜的形成和抑制胞内 ATP 生成,进而抑制大肠杆菌的生长和繁殖。

参考文献:

- [1] UC-CACHÓN A H, GRACIDA-OSORNO C, LUNA-CHI I G, et al. High prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolated bacilli in intensive care units at a tertiary-care hospital in Yucatán Mexico[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55(9): 588-601.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2021 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022, 22(5): 521-530.
- [3] 张民. 细菌耐药背景下的中药抗菌作用探析[J]. *西部中医药*, 2013, 26(6): 122-124.
- [4] 车彦云, 张加余, 张雅琼, 等. 苦丁茶冬青化学成分和药理作用研究进展[J]. *中南药学*, 2017, 15(1): 75-80.
- [5] JIANG Z H, QU H, LIN G Y, et al. Lipid-lowering efficacy of the capsaicin in patients with metabolic systematis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 812294.
- [6] 韦晓洁, 银慧慧, 孟菲, 等. 苦丁茶有效成分及药理活性的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(24): 62-65.
- [7] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 911.
- [8] 黄衍强, 黄宏思, 张莲, 等. 6 种中草药抗耐药性大肠杆菌的抑菌效果[J]. *右江民族医学院学报*, 2009, 31(3): 368-369.
- [9] 李蕾, 谭文颖, 杨博, 等. 柚子叶等 5 种中药对鸡粪中大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. *广东化工*, 2017, 44(3): 28-29, 22.
- [10] 侯思梦, 左景茹, 吴强, 等. 钩藤对肉鸡源多重耐药大肠埃希氏菌临床分离株生物被膜的抑制作用[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(9): 26-30.
- [11] 温燕龙, 李文云, 张楠, 等. 紫云英苷对大肠杆菌的抑制作用及其机制研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2022, 37(3): 471-477.
- [12] 张赞彬, 刘笑宇, 姜萍萍, 等. 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(5): 31-35, 11.
- [13] 马毛毛. 单癸酸甘油酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性及作用机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- [14] BAEZA N, MERCADE E. Relationship between membrane vesicles, extracellular ATP and biofilm formation in antarctic gram-negative bacteria [J]. *Microb Ecol*, 2021, 81(3): 645-656.
- [15] 吴丽娜, 董鹏程, 张一敏, 等. 大肠杆菌生物膜形成特性及控制措施的研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(15): 307-313.
- [16] 公璐瑶. 中药耐药大肠杆菌生物膜的形成与中药耐药性的关系[D]. 长春: 长春中医药大学, 2017.
- [17] DE MARCO S, PICCIONI M, PAGIOTTI R, et al. Antibiofilm and antioxidant activity of *Propolis* and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 5163575.
- [18] 贺常亮. 治疗鸡大肠杆菌病的中药方剂筛选及其作用机

- 理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [19] TAMFU A N, CEYLAN O, CÂRÂC G, et al. Antibiofilm and anti-quorum sensing potential of cycloartane-type triterpene acids from Cameroonian grassland *Propolis*: phenolic profile and antioxidant activity of crude extract[J]. *Molecules*, 2022, 27(15): 4872.
- [20] PAPENFORT K, BASSLER B L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(9): 576-588.
- [21] SULLY E K, MALACHOWA N, ELMORE B O, et al. Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(6): e1004174.
- [22] NGUYEN J N T, HARBISON A M. Scanning electron microscopy sample preparation and imaging[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1606: 71-84.
- [23] 李丽, 王馨, 张悦婧, 等. 非生物胁迫对烟草悬浮细胞胞内和胞外 ATP 水平的影响[J]. *植物研究*, 2023, 43(2): 179-185.
- [24] CHEN Y N, LI H L, HUANG J J, et al. Antimicrobial activities and mechanism of sturgeon spermary protein extracts against *Escherichia coli* [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1021338.
- [25] AKHOVA A V, TKACHENKO A G. ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in *Escherichia coli* cells under antibiotic treatment [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 353(1): 69-76.
- [26] OUSSALAH M, CAILLET S, LACROIX M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* [J]. *J Food Prot*, 2006, 69: 1046-1055.

收稿日期: 2023-06-20; 修回日期: 2023-07-29

(上接第 730 页)

- [24] OLIVA M, SPREAFICO A, TABERNA M, et al. Immune biomarkers of response to immune-checkpoint inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(1): 57-67.
- [25] MEI Z, HUANG J W, QIAO B, et al. Immune checkpoint pathways in immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 16.
- [26] KITAMURA N, SENTO S, YOSHIZAWA Y, et al. Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 240.
- [27] CHEN G J, SUN J W, XIE M R, et al. PLAU promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 651882.
- [28] NEUCHRIST C, EROVIC B M, HANDISURYA A, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck [J]. *Head Neck*, 2003, 25(6): 464-474.
- [29] SASAHIRA T, KIRITA T, KURIHARA M, et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(12): 2285-2294.

收稿日期: 2023-06-02; 修回日期: 2023-07-18