

丁香酚对多重耐药大肠杆菌的抑菌活性及其作用机制研究

钱卫东¹, 刘婵婵¹, 王婷¹, 李永东², 沈兰芳¹, 刘淼¹, 卢家兴¹

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021) (2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江宁波 315010)

摘要: 为研究丁香酚对多重耐药大肠杆菌 (Multidrug-resistant *Escherichia coli*, MDR *E.coli*) 的抑菌活性, 利用微量二倍稀释法和琼脂扩散法确定丁香酚对多重耐药大肠杆菌的最低抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, MBC), 并利用紫外分光光度法、考马斯亮蓝法等方法初步分析其作用机制。结果表明, 丁香酚对 MDR *E.coli* 的 MIC 和 MBC 分别为 2.50 mg/mL 和 5.00 mg/mL; 丁香酚可延长 MDR *E.coli* 迟缓期进入对数生长期的进程, 改变菌体结构, 增加菌株可溶性蛋白的含量和胞外核酸的量, 增大菌体培养液中的电导率, 对 MDR *E.coli* 具有较强的抑菌作用, 这些作用可能归因于丁香酚对其细胞结构的破坏。本研究为临床有效缓解或解决多重耐药大肠杆菌的耐药、感染和致死率等问题提供新的思路、新途径, 并为其在医药和食品开发领域的应用奠定理论基础。

关键词: 丁香酚; 多重耐药大肠杆菌; 最低抑菌浓度; 最低杀菌浓度; 抑菌活性

文章编号: 1673-9078(2019)01-31-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.005

Antibacterial Activity and Mechanism of Eugenol against Multidrug-resistant *Escherichia coli*

QIAN Wei-dong¹, LIU Chan-chan¹, WANG Ting¹, LI Yong-dong², SHEN Lan-fang¹, LIU Miao¹, LU Jia-xing¹

(1.School of Life Science and Engineering, Shanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

(2.Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

Abstract: In order to study the antibacterial activity of eugenol on multidrug-resistant *Escherichia coli* (MDR *E.coli*), the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of eugenol against MDR *E.coli* were determined by micro-diluted dilution method and agar diffusion method. UV spectrophotometry and the Coomassie blue method were used to analyze the antibacterial activity. The results showed that the MIC and MBC of eugenol for MDR *E.coli* were 2.50 mg/mL and 5.00 mg/mL, respectively. Eugenol can prolong the progression of MDR *E.coli* into the logarithmic growth phase, change the structure of the bacteria and increase the soluble protein content and the amount of extracellular nucleic acids of the strain. Eugenol also increased the conductivity in the culture medium. These may be attributed to the destruction effect of eugenol on cellular structure of the bacteria. The study provides a new way to overcome drug resistance, infection and mortality of MDR *E.coli*, and lay a theoretical foundation for the application of eugenol in medicine and food development.

Key words: eugenol; MDR *E.coli*; MIC; MBC; antibacterial activity

自 1928 年 Alexander Fleming 发现青霉素后, 许

收稿日期: 2018-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (11575149); 陕西省重点研发计划项目 (2017TSCXL-NY-02-04); 陕西省教育厅科研计划项目 (18JC006; 18JK0097); 西安市未央区科技项目 (201707; 201824); 宁波市自然科学基金项目 (2017A610268)

作者简介: 钱卫东 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能活性因子生物制造

通讯作者: 李永东 (1981-), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 分子微生物学

多抗菌药物不断被发现并广泛应用于细菌感染的临床治疗, 但近年来因抗生素的大量使用, 促使大肠杆菌对常用抗生素的耐药性增强, 导致多重耐药大肠杆菌快速增加, 给人类健康及畜产养殖造成严重威胁^[1]。因此, 寻求新的抗多重耐药大肠杆菌的药物迫在眉睫。

目前, 化学合成药物的开发及临床应用存在一定难度和弊端。一些化学制剂虽有抑制细菌多重耐药性的功效, 但因其毒副作用而使其临床应用受限。在面对细菌耐药性增强的问题上, 中药显示出得天独厚的优势, 具有品种多、来源广、价格便宜、耐药性小、

成分多、作用靶点多等独特优势^[2]。兰仕梅等^[3]利用牛津杯法和微量肉汤稀释法确定连翘、四环素和磺胺间甲氧嘧啶钠对多重耐药大肠杆菌 B₃ 的抑菌活性,结果显示, MIC 分别为连翘 125.0 mg/mL、四环素 12.8 mg/mL、磺胺间甲氧嘧啶钠 50.0 mg/mL, 由于用药浓度偏大,并不适合临床用药。郭永刚等^[4]利用牛津杯法抑菌试验和试管二倍稀释法测定大蒜提取液对大肠杆菌的抑菌效果和 MIC, 结果显示, 大肠杆菌对大蒜提取物高度敏感且 MIC 值为 50 mg/mL, 用药浓度也同样偏高, 不太适合于临床用药。吕世明等^[5]采用紫外分光光度法筛选出芦荟大黄素、槲皮素、香紫苏醇、木犀草素、苦参碱、大蒜素和五味子甲素 7 种中药单体, 发现 7 种中药单体均可不同程度地对 β -内酰胺酶大肠杆菌产生抑制作用, 增加抗生素对大肠杆菌的敏感性, 降低头孢他啶或头孢噻肟对大肠杆菌的最小抑菌浓度。因此, 寻找一种对多重耐药大肠杆菌有抑菌活性的中药单体成为本研究的目标。

据记载, 丁香 (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) 属于桃金娘科植物的干燥花蕾^[6]。它入药历史悠久, 是我国传统进口“南药”之一。丁香不仅为主要药用植物, 也是世界名贵的香料植物, 其挥发油的主要成分^[7]-丁香酚 (4-烯丙基-2-甲氧基苯酚, Eugenol) 具有解热镇痛、抗炎、麻醉、抗细菌、抗真菌、抗氧化、抗癌、驱蚊避虫等功效^[8-10]。据报道, 丁香酚和大蒜素分别联用后对多重耐药鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, AB) 与亚胺培南-西司他丁钠联用后对多重耐药 AB 的抗菌活性大多表现为具有协同和相加作用, 且丁香酚和大蒜素对多重耐药 AB 的 MIC 平均值分别为 162.9 μ g/mL 和 651.6 μ g/mL^[11]。Prasanth R 等^[12]研究了丁香提取物对两种多重耐药导尿管分离株的毒性和生物被膜, 结果表明, 富含丁香酚的 Clove Bioactive Fraction-2 (CBF-2) 对导尿管分离株具有有效的抗毒力和抗生物膜活性。Das B 等^[13]研究了香酚对临床脓样品中分离的耐万古霉素的金黄色葡萄球菌的抗菌活性, 结果表明, 丁香酚通过活性氧生成和膜损伤成功地破坏了耐万古霉素菌株, 可用于治疗耐万古霉素的金黄色葡萄球菌引起的疾病。但目前关于丁香酚对大肠杆菌抑菌作用研究报道较少, 尤其对人源性多重耐药大肠杆菌抑菌作用的研究, 迄今未见报道。

本研究以人源性多重耐药大肠杆菌为研究对象, 分析丁香酚对多重耐药大肠杆菌的抑菌效果, 其中本实验所分析的多重耐药大肠杆菌对头孢类、喹诺酮类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类、糖肽类、唑烷酮类、新型 β -内酰胺类、四环素类、青霉素类及大环内脂类抗生素不敏感。本研究结果以期临床治疗多重耐药细菌

提供新材料并奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

丁香酚 (99.95%, MUST-18011210), 成都曼思特生物科技有限公司&中国科学院成都生物研究所研制并鉴定; ATCC-25922 大肠杆菌 (A *E.coli*) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心; 人源性多重耐药大肠杆菌 (MDR *E.coli*), 来自宁波某医院分离鉴定的菌株, 由陕西科技大学微生物研究室确定其敏感性; CMO337 培养基 (简称 CM): 500 g/13.1 L 蒸馏水, 煮沸, 121 $^{\circ}$ C, 0.1 MPa 灭菌 20 min; LB 培养基: 酵母浸粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、pH 7.0~7.5、121 $^{\circ}$ C, 0.1 MPa 灭菌 20 min; Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等均为分析纯, 西安科洛化学试剂有限公司。

台式扫描电镜, 荷兰飞纳公司; 全波长扫描式多功能读数仪, 赛默飞世尔科技有限公司; DDS-11AT 电导率仪, 上海雷磁仪器厂; 制冰机, XUEKE 公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TG16-WS 台式高速离心机, 湖南湘仪。

1.2 丁香酚的抑菌活性

1.2.1 菌株活化

将大肠杆菌接种在 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下活化培养 24 h; 利用平板划线法蘸取活化菌液于 CM 固体平板, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 12 h, 获得单菌落; 挑取单菌落于 5 mL 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 12 h, 制得大肠杆菌悬液, 用 LB 培养液将菌悬液浓度稀释至 1×10^5 CFU/mL 备用。

1.2.2 最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC) 的测定

采用微量二倍稀释法^[14]和琼脂扩散法^[15]确定丁香酚的 MIC 和 MBC。分别向 96 孔板中加入 100 μ L LB 培养基, 在第 1 孔内加入 100 μ L 浓度为 20 mg/mL 的丁香酚, 随后进行倍比稀释, 使终浓度分别达到 10.00、5.00、2.50、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08 mg/mL, 然后向每孔中加入浓度为 1×10^5 CFU/mL 的 5 μ L 大肠杆菌悬液, 并分别设置阳性和阴性对照, 每组设 3 个平行, 其中, 阳性对照为美罗培能 (浓度为: 20 μ g/mL), 阴性对照为无水乙醇。然后置于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 利用酶标仪测定 OD_{600 nm} 值, 分析丁香酚对多重耐药大肠

杆菌的 MIC 和 MBC。

为避免假阳性结果的出现,采用琼脂扩散法将上述培养混悬液各取 2 μL 置于 CM 固体平板,于 37 ℃ 静置培养 12 h,观察是否有菌落产生。如果没有菌落产生,则说明大肠杆菌已被丁香酚杀灭;若有菌落产生,则说明丁香酚仅仅抑制了大肠杆菌生长。

1.3 丁香酚的对多重耐药大肠杆菌的抑制作用

本研究中实验分组如表 1 所示:

表 1 不同实验分组

Table 1 Different groups

组别	加药组	阴性对照
A E.coli	实验组 1	对照组 1
MDR E.coli	实验组 2	对照组 2

1.3.1 丁香酚对多重耐药大肠杆菌生长曲线的影响

向 1 mL 菌悬液中加入终浓度为 MIC 的丁香酚,并以不含丁香酚的液体培养基为对照,于 37 ℃、200 r/min 条件下连续振荡培养 24 h,期间每隔 2 h 测定吸光度 (OD₆₀₀),绘制 OD_{600 nm}-时间生长曲线。每组 3 次平行,每个时间点取 3 个重复,结果取平均值。

1.3.2 丁香酚对多重耐药大肠杆菌可溶性蛋白含量的影响

向 1 mL 菌悬液中加入终浓度为 MIC 的丁香酚后,于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 15 h。4000 r/min 离心 5 min,分别收集菌体沉淀和上清液。用 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2) 洗涤菌体沉淀 2 次,再加入 5 mL 蒸馏水,超声波细胞粉碎机于冰浴下超声 15 min,4000 r/min 离心 15 min,取上清液用于测定胞内蛋白含量,以牛血清白蛋白为对照品,用考马斯亮蓝

试剂盒测定 2 种上清液中蛋白质含量,每组 3 次平行。

1.3.3 丁香酚对多重耐药大肠杆菌核酸相对量的影响

向 1 mL 菌悬液中加入终浓度为 MIC 的丁香酚后,于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 15 h。4000 r/min 离心 5 min,收集上清液,测定吸光度 (OD_{260 nm})。参考 Chen^[16] 的方法,以 OD_{260 nm} 表示胞外核酸相对量,每组 3 次平行。

1.3.4 丁香酚对多重耐药大肠杆菌培养液电导率的影响

向 1 mL 菌悬液中加入终浓度为 MIC 的丁香酚后,于 37 ℃、200 r/min 条件下连续培养 6 h,期间每隔 1 h 测定培养液电导率,绘制电导率-时间曲线,每组 3 次平行^[17]。

1.3.5 丁香酚对多重耐药大肠杆菌形态的影响

向 1 mL 菌悬液中加入丁香酚,使其终浓度分别达到 MIC 和 1/2 MIC,于 37 ℃、200 r/min 条件下连续培养 15 h 后,4000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀。用 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2) 洗涤菌体沉淀 2 次,将菌体涂在盖玻片上,自然晾干,喷金,进行电镜观察。

1.4 数据统计分析

实验数据利用 GraphPad Prism 6、SPSS19 等软件进行统计分析,并以平均数±标准差(Mean±SD)表示,差异显著性检验用方差分析。

2 结果与讨论

2.1 丁香酚的抑菌活性

表 2 不同组别的 OD_{600 nm} 值

Table 2 OD_{600 nm} of different groups

编号	添加物	药液浓度/ (mg/mL)	A E.coli	MDR E.coli
第 1 孔	丁香酚	10.00	0.05±0.0011	0.05±0.0011
第 2 孔		5.00	0.04±0.0006	0.05±0.0006
第 3 孔		2.50	0.05±0.0006	0.13±0.0009
第 4 孔		1.25	0.14±0.0012	0.24±0.0012
第 5 孔		0.63	0.26±0.0002	0.34±0.0010
第 6 孔		0.31	0.39±0.0011	0.47±0.0005
第 7 孔		0.16	0.53±0.0007	0.59±0.0004
第 8 孔		0.08	0.69±0.0006	0.65±0.0005
第 9 孔	美罗培能	0.01	0.05±0.0003	0.05±0.0006
第 10 孔	无水乙醇	-	0.75±0.0011	0.69±0.0008
第 11 孔	菌液	-	0.72±0.0015	0.67±0.0011
第 12 孔	LB	-	0.06±0.0006	0.06±0.0006

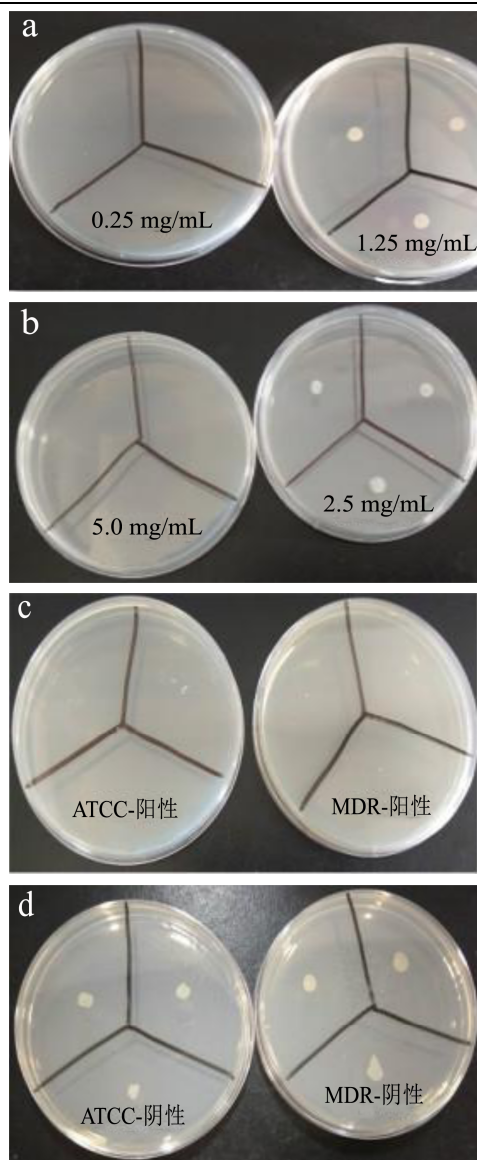


图1 丁香酚对大肠杆菌 MIC 和 MBC 以及对对照组的实验结果图

Fig.1 Results of eugenol against *E. coli* MIC and MBC and control group

注: a: 丁香酚对 A *E. coli* 的 MBC 和 MIC 图; b: 丁香酚对 MDR *E. coli* 的 MBC 和 MIC 图; c: 美罗培能对 A *E. coli* 和 MDR *E. coli* 的抑菌图; d: 无水乙醇对 A *E. coli* 和 MDR *E. coli* 的抑菌图。

由表 2 可知, 经不同丁香酚浓度作用后, 培养基中大肠杆菌的含量随药液浓度的增加而减少。结果表明, 丁香酚能抑制大肠杆菌的生长, 且其抑制作用与药物浓度的增加呈正相关。

当丁香酚的浓度 ≥ 5.00 mg/mL 时, MDR *E. coli* 完全被杀灭, 此时丁香酚的 MBC 为 5.00 mg/mL, 而当丁香酚的浓度 ≤ 2.50 mg/mL 时, MDR *E. coli* 的生长被抑制, 此时丁香酚的 MIC 为 2.50 mg/mL; 丁香酚对 A *E. coli* 的 MIC 为 1.25 mg/mL, MBC 为 2.50 mg/mL。由图 1 进一步可知, 丁香酚对多重耐药大肠杆菌有杀

灭和抑菌作用。

2.2 丁香酚对多重耐药大肠杆菌的抑制作用

2.2.1 丁香酚对多重耐药大肠杆菌生长曲线的影响

由图 2 可知, 丁香酚对 MDR *E. coli* 的生长有较强的抑菌活性, 当培养基中未添加丁香酚时, MDR *E. coli* 的生长具有正常的迟缓期、对数生长期和稳定期; 当加入丁香酚时, MDR *E. coli* 的生长显著减缓, 迟缓期的持续时间延长, 丁香酚明显抑制了大肠杆菌从生长期到对数期的进程。可知, 丁香酚对多重耐药大肠杆菌的生长具有明显的抑制作用。

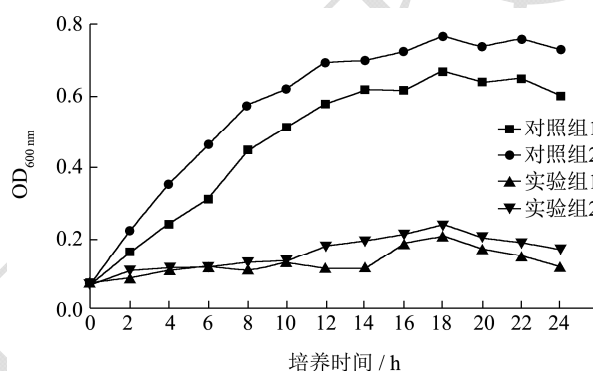


图2 丁香酚对多重耐药大肠杆菌的生长曲线影响

Fig.2 Effect of eugenol on the growth curve of MDR *E. coli*

2.2.2 丁香酚对多重耐药大肠杆菌可溶性蛋白的影响

由图 3 可知, 给药后 A *E. coli* 和 MDR *E. coli* 胞外和胞内可溶性蛋白量均高度显著于对照组 ($p < 0.001$), 且 MDR *E. coli* 和 A *E. coli* 之间的胞外和胞内蛋白量均无显著性差异。

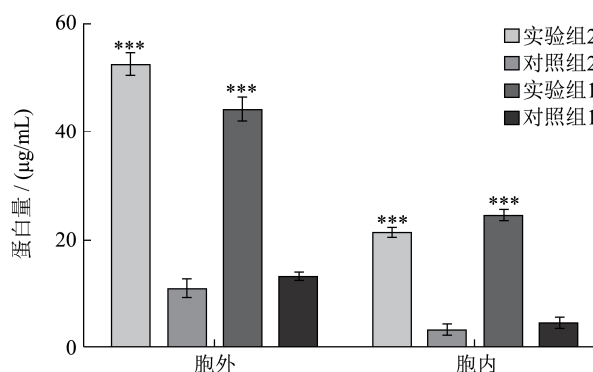


图3 丁香酚对多重耐药大肠杆菌胞外和胞内可溶性蛋白的影响

Fig.3 Effects of eugenol on extracellular and intracellular soluble proteins of MDR *E. coli*

注: 实验组 1 胞外及胞内蛋白量与相应对照组 1 相比, 实验组 2 胞外及胞内蛋白量与相应对照组 2 相比, $*p < 0.05$ 差异显著, $**p < 0.01$ 差异极显著, $***p < 0.001$ 差异高度显著。

对于胞内蛋白量,在MDR *E.coli* 中,实验组2胞内蛋白量是对照组2的6.93倍,而A *E.coli* 中实验组1胞内蛋白量是对照组1的5.44倍,其原因可能是丁香酚提高了大肠杆菌抗逆作用,影响了大肠杆菌相关蛋白质的合成和分泌,使菌体内蛋白表达量上升。

对胞外蛋白量,在A *E.coli* 和MDR *E.coli* 中,给药组胞外蛋白量分别是相应对照组的3.46倍和4.87倍,可能是细胞膜的通透性增加,细胞内大量蛋白质外泄。而给药组中MDR *E.coli* 胞外蛋白量较A *E.coli* 少,可能是多重耐药菌的细胞膜结构更牢固,细胞膜通透性改变幅度小,导致细胞内蛋白质外泄量较A *E.coli* 少。结果表明,丁香酚可影响多重耐药大肠杆菌的可溶性蛋白合成和分泌。

2.2.3 丁香酚对多重耐药大肠杆菌核酸相对量的影响

由图4可知,当丁香酚作用15 h后,MDR *E.coli* 和A *E.coli* 胞外核酸相对量极显著于对照组 ($p<0.001$),且MDR *E.coli* 和A *E.coli* 之间的胞外核酸相对量无显著性差异。细胞膜是大肠杆菌的保护屏障之一,当细胞膜受到伤害时,细胞膜的通透性发生改变,使DNA、RNA等大分子物质穿过细胞膜泄漏到培养液中,导致培养液在260 nm处的吸光度增大。因此,给药后多重耐药大肠杆菌的核酸相对量增加。

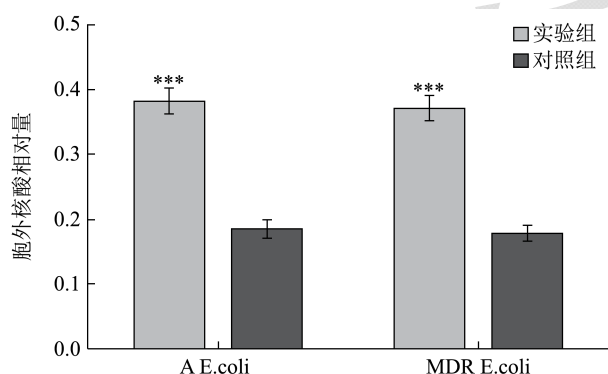


图4 多重耐药大肠杆菌胞外核酸相对量

Fig.4 Relative content of extracellular nucleic acid of MDR *E.coli*

注:实验组1胞外核酸相对量与对照组1相比,实验组2胞外核酸相对量与对照组2相比,* $p<0.05$ 差异显著,** $p<0.01$ 差异极显著,*** $p<0.001$ 差异高度显著。

2.2.4 丁香酚对多重耐药大肠杆菌培养液电导率的影响

大肠杆菌培养液电导率的变化可以反映细胞膜通透性的改变。由图5可知,给药组和对照组的培养液电导率存在极显著差异 ($p<0.001$),表明丁香酚可能影响了MDR *E.coli* 和A *E.coli* 细胞膜的通透性。其中,MDR *E.coli* 电导率相比A *E.coli* 较低,可能是MDR

E.coli 胞外的蛋白质、核酸较多,与带电粒子发生了静电结合,导致带电离子减少^[18]。

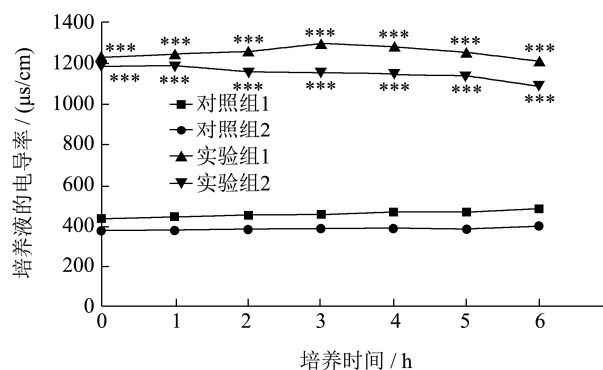


图5 丁香酚对多重耐药大肠杆菌培养液电导率的影响

Fig.5 Effect of eugenol on electrical conductivity of MDR *E.coli*

注:实验组1对应时间的培养液电导率与对照组1相比,实验组2对应时间的培养液电导率与对照组2相比,* $p<0.05$ 差异显著,** $p<0.01$ 差异极显著,*** $p<0.001$ 差异高度显著。

2.2.5 丁香酚对多重耐药大肠杆菌形态的影响

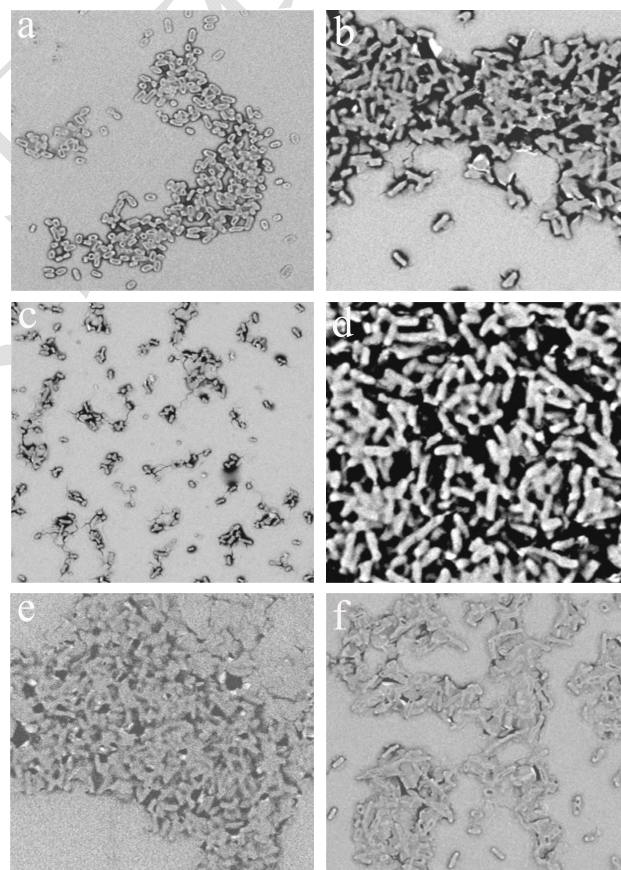


图6 丁香酚对多重耐药大肠杆菌超微结构的影响

Fig.6 Effect of eugenol on the ultrastructure of MDR *E.coli*

注:a、b和c是A *E.coli* 的对照组、1/2 MIC组和MIC组;d、e和f是MDR *E.coli* 的对照组、1/2 MIC组和MIC组(扫描电镜参数:10 kV、 $\times 5000$ 和10.0 μm)。

由图6可知,MDR *E.coli* 和A *E.coli* 大肠杆菌中对照组的菌体完整,形态规则,表面平滑,没有出现

细胞破损和内容物溢出现象;MDR *E.coli* 的形态较 A *E.coli* 粘稠性更大,初步推测与其对多种抗生素不敏感相关。经 1/2 MIC 和 MIC 给药量处理后,MDR *E.coli* 和 A *E.coli* 大肠杆菌的形态均发生了明显改变。经 1/2 MIC 处理后的大肠杆菌菌体之间相互粘连、聚团,但表面平滑基本光滑。经 MIC 给药量处理后的大肠杆菌表面粗糙,出现孔洞、凹陷和粘连物,大小不一,且菌量减少。由此可见,丁香酚对多重耐药大肠杆菌的细胞结构有显著影响,对细胞表面造成严重损伤。

3 结论

丁香酚对多重耐药大肠杆菌具有一定的杀灭和抑制作用,MIC 和 MBC 分别为 2.50 mg/mL 和 5.00 mg/mL。添加丁香酚药液培养,可延长 MDR *E.coli* 从迟缓期进入对数生长期的进程,也可使胞外和胞内可溶性蛋白量、胞外核酸量、菌体培养液电导率以及菌体超微结构均发生改变,可能与丁香酚对其细胞结构的破坏有关。由于丁香酚对 MDR *E.coli* 有较好的抑菌活性,可为临床抑制人源多重耐药大肠杆菌提出新思路,具有重要的实践意义。

参考文献

- [1] 颜光美.药理学[M].北京:高等教育出版社,2011
YAN Guang-mei. Pharmacology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2011
- [2] 墙建.中药干预多重耐药菌(MDRO)机制及抗菌谱研究进展[J].医学理论与实践,2018,31(13):1918-1920
QIANG Jian. The progress of traditional chinese medicine intervention in multidrug-resistant bacteria (MDRO) mechanism and antibacterial spectrum [J]. Medical Theory and Practice, 2018, 31(13): 1918-1920
- [3] 兰仕梅,何彦蓉,周江南,等.连翘联合抗菌药物对多重耐药大肠杆菌 B₃ 的抗菌试验[J].上海畜牧兽医通讯,2018,4:18-21
LAN Shi-mei, HE Yan-rong, ZHOU Jiang-nan, et al. Antibacterial test of multidrug-resistant *Escherichia coli* B₃ by combined anti-bacterial drugs of *Forsythia suspensa* [J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 4: 18-21
- [4] 郭永刚,胡立磊,樊克锋,等.大蒜提取液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果观察[J].中兽医学杂志,2018,3:14-15
GUO Yong-gang, HU Li-lei, FAN Ke-feng, et al. Antibacterial effect of garlic extract on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 3: 14-15
- [5] 吕世明,谭艾娟,曹敏,等.7 种天然化合物对产 ESBLs 大肠杆菌的增敏机制研究[J].畜牧与兽医,2016,48(4):35-38
LU Shi-ming, TAN Ai-juan, CAO Min, et al. Study on the sensitizing mechanism of seven natural compounds to *Escherichia coli* producing ESBLs [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 48(4): 35-38
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:4
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 4
- [7] 赵晨曦,梁逸曾,李晓宁.丁香挥发油化学成分与抗菌活性研究(英文)[J].天然产物研究与开发,2006,18(3):381-385
ZHAO Chen-zhen, LIANG Yi-zeng, LI Xiao-ning. Study on chemical constituents and antibacterial activity of volatile oil from Clove [J]. Natural Product Research and Development, 2006, 18(3): 381-385
- [8] 李巧如,刘宗智,任健康,等.丁香提取物抗菌机理的探讨[J].西北药学杂志,2001,16(6):261-263
LI Qiao-ru, LIU Zong-zhi, REN Jian-kang, et al. Discussion on antibacterial mechanism of clove extract [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2001, 16(6): 261-263
- [9] 孔晓军,刘希望,李剑勇,等.丁香酚的药理学作用研究进展[J].湖北农业科学,2013,52(3):508-511
KONG Xiao-jun, LIU Xi-wang, LI Jian-yong, et al. Advance in pharmacological research of eugenol [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2013, 52(3): 508-511
- [10] 沈勇根,蔡志鹏,江慎华,等.丁香非挥发性成分抗氧化活性[J].农业机械学报,2012,43(10):131-137
SHEN Yong-gen, CAI Zhi-peng, JIANG Shen-hua, et al. Antioxidant activity of non-volatile components of Clove [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2012, 43(10): 131-137
- [11] 刘欣,徐娟,洪纯,等.丁香酚和大蒜素分别与亚胺培南联用对多耐药鲍曼不动杆菌的体外抑菌实验研究[J].抗感染药学,2017,14(1):17-20
LIU Xin, XU Juan, HONG Chun, et al. Experimental Study on Bacteriostasis of Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro combined by eugenol and allicin with tienam [J]. Anti Infect Pharm, 2017, 14(1): 17-20

(下转第 14 页)