



研究报告

百里香酚联合苯唑西林对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)生物被膜的影响

严一舟 袁中伟 何泾正 戴雨芸 范维 尹立子*

四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130

摘要:【背景】耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)能以生物被膜的状态存在,从而产生多重耐药性和持续性感染。【目的】通过研究百里香酚和苯唑西林单用和联用对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成抑制和清除作用,探究联合用药对 MRSA 生物被膜的影响,为临床联合应用抗 MRSA 药物提供理论依据。【方法】采用微量肉汤稀释法测定苯唑西林对 MRSA 标准菌株 USA300 的最低抑菌浓度;采用结晶紫染色法和菌落计数法评估百里香酚和苯唑西林单用和联用对 USA300 生物被膜形成抑制和清除作用。【结果】百里香酚和苯唑西林在亚抑菌浓度下对 USA300 生物被膜的形成具有一定的抑制作用。在较高浓度下,百里香酚对其 24 h 和 72 h 形成的生物被膜有良好的清除作用,而苯唑西林无清除作用。两药联用对生物被膜的抑制和清除作用进一步增强,在较低浓度下有较好的抑制和清除效果。【结论】百里香酚和苯唑西林联合用药与单独用药相比,对 USA300 的生物被膜的抑制和清除作用增强,两药联合有协同抗菌作用。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 联合用药, 生物被膜, 百里香酚, 苯唑西林

Effect of thymol combined with oxacillin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm

YAN Yi-Zhou YUAN Zhong-Wei HE Jing-Zheng DAI Yu-Yun FAN Wei YIN Li-Zi*

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: [Background] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) can exist in the state of biofilms, which results in multiple resistance and persistent infections. [Objective] By investigating the inhibition and clearance of thymol and oxacillin separately and concurrently on the biofilm formation of MRSA, the effects of combined medications on MRSA biofilms were explored to provide the theoretical basis for clinical combined application of anti-MRSA drugs. [Methods] Broth microdilution method was used to measure oxacillin minimal inhibitory concentration against USA300 strain. The effect of thymol and oxacillin separately and concurrently on the inhibition and clearance of biofilm formation in USA300 was

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31702284); Double Subject Construction Plan of Sichuan Agriculture University (03571444); Sichuan Veterinary Medicine and Drug Innovation Group of China Agricultural Research System (SCCXTD-2020-18)

*Corresponding author: E-mail: yinlizi@sicau.edu.cn

Received: 09-01-2020; Accepted: 28-03-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31702284); 四川农业大学双支计划(03571444); 国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(SCCXTD-2020-18)

*通信作者: E-mail: yinlizi@sicau.edu.cn

收稿日期: 2020-01-09; 接受日期: 2020-03-28; 网络首发日期: 2020-05-09

evaluated by crystal violet staining method and colony counting method. **[Results]** Thymol and oxacillin inhibited the formation of USA300 biofilm at subinhibitory concentrations. At high concentrations, thymol had good removal effects on the biofilm formed in 24 and 72 hours, while oxacillin had no removal effect. The inhibition and clearance effect of the combination of the two drugs on biofilms was further enhanced, and it had a better inhibition and clearance effect at low concentrations. **[Conclusion]** Compared with thymol and oxacillin alone, the combination of thymol and oxacillin has an enhanced inhibitory and clearance effect on the biofilm of USA300. The combination of the two drugs has a synergistic antibacterial effect.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Combined medication, Biofilm, Thymol, Oxacillin

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是一种具有多重耐药性、毒性强、易感染且病死率高的病原菌, 可引起软组织感染、肺炎、心内膜炎和败血症等严重感染^[1-3]。MRSA 感染已成为世界范围内最难解决的感染性疾病之一^[4]。MRSA 对现有的氨基糖苷类、 β -内酰胺类和氟喹诺酮类等多种抗生素耐药, 目前寻找和开发新型抗 MRSA 感染的药物已迫在眉睫^[5-7]。细菌生物被膜 (bacterial biofilm, BF) 通常指细菌吸附于生物材料或机体腔道表面, 分泌多糖基质、纤维蛋白、脂蛋白等, 将其自身包绕其中形成多层细胞簇的膜状物^[8-9]。超过 99% 的细菌是以生物被膜的形式存在于环境中^[10]。生物被膜中的细菌分裂迟缓, 对绝大多数抗菌药物都不敏感^[11]。生物被膜可保护细菌逃逸宿主免疫和抗菌药物的杀伤作用, 使细菌对药物产生高度耐药性, 从而导致临床感染的难治性^[12-13]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌能够形成生物被膜来抵抗多种不良环境的影响, 不易被清除, 更容易造成反复性、持续性的感染。很多药物对 MRSA 生物被膜无抑制或清除作用, 所以生物被膜的形成是导致 MRSA 多重耐药性的主要原因之一^[14]。目前一般通过抑制生物被膜的形成和清除已经形成的生物被膜两种途径来消灭生物被膜^[15]。万古霉素属于糖肽类抗菌药物, 是全世界公认治疗 MRSA 引起的重症感染的首选抗菌药物, 对于 MRSA 引起的败血症、心内膜炎、骨髓炎、肺内感染均有良好疗效, 但万古霉素具有肾毒性、耳毒性, 长期使用有过敏反应、过敏性休克、药物热、腹痛

等不良反应^[16-18]。临床上对使用万古霉素要求慎用、少用, 所以开发新型有效的抗菌药物和寻找新型的优良抗菌方法迫在眉睫。

百里香酚 (5-甲基-2-异丙基酚), 又名麝香草酚, 是一种植物来源的单萜类的天然活性小分子物质^[19-20]。相关研究表明百里香酚具有消炎、抗氧化、抗肿瘤等作用, 同时还对多种细菌有抑制作用, 有实验表明百里香酚能有效抑制 MRSA 标准株 USA300 生物被膜的形成, 且呈浓度依赖性^[21-23]。苯唑西林 (分子式: $C_{19}H_{19}N_3O_5S$), 是一种青霉素类抗生素, 通过抑制细菌细胞壁合成而发挥杀菌作用, 对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性。苯唑西林是临床常用抗生素, 毒性极微, 临床应用发生反应者较少。百里香酚是活性小分子物质, 毒性低, 中药成分和药效的特殊性, 使得细菌很少对其产生耐药性, 将活性微弱的中药成分联合抗生素使用, 成为治疗耐药菌感染的新措施^[24]。采用百里香酚与苯唑西林联合使用的方法, 探究联用对 MRSA 的影响, 既可避免万古霉素带来的不良反应, 又能降低这两种药的使用剂量, 增强其抑菌作用, 防止和减少细菌耐药和不良反应的发生。探究百里香酚联合苯唑西林对 MRSA 生物被膜的抑制与清除作用, 为临床抗 MRSA 感染提供可靠的理论依据^[25-27]。

1 材料与方法

1.1 材料

百里香酚 [纯度 >98%, 色谱纯], 成都瑞芬思生物科技公司; DMSO, 上海浩然生物技术有限公

司; 苯唑西林, 北京索莱宝生物科技有限公司; MRSA 标准菌株 USA300(ATCC® BAA-1 717), 美国标准菌种库; LB 培养基、LBA 培养基、脑心浸出液肉汤(BHI), 青岛日水生物科技有限公司。

PBS 缓冲液, 北京索莱宝生物科技有限公司; 乙酸溶液、甲醛溶液、结晶紫溶液, 四川西陇化工有限公司; Triton X-100, 上海碧云天生物技术有限公司。高压蒸汽灭菌锅, 浙江景程生物技术有限公司; 紫外分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司; 酶标仪, Thermo 公司; 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 苯唑西林对 USA300 最低抑菌浓度和生长曲线测定

采用微量肉汤稀释法测定苯唑西林的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值^[28-29]。实验设 3 次重复。

USA300 在 2 mL 的 BHI 液体培养基中 37 °C 静置培养过夜后, 按照 1:100 的体积比用 BHI 培养基稀释, 然后放置于恒温培养摇床(37 °C, 200 r/min)培养。当菌液的 OD_{600} 为 0.3 时, 平均分装于 7 个锥形瓶中, 加入苯唑西林药液, 使培养基中苯唑西林的最终质量浓度分别为 0、4、8、16、32、64 和 128 $\mu\text{g/mL}$ 。再置于摇床中培养, 在培养 0、1、2、4、6、8、16 和 24 h 后测定不同苯唑西林浓度培养基的 OD_{600} 值, 绘制生长曲线, 实验设 3 次重复^[30]。

1.2.2 百里香酚和苯唑西林亚抑菌浓度对 USA300 生物被膜的抑制实验

根据 Zhang 等^[31]的方法, 采用结晶紫染色法评估百里香酚和苯唑西林亚抑菌浓度对生物被膜形成的影响, 测定的百里香酚的质量浓度分别为 8、16、32、64、128 $\mu\text{g/mL}$ (苯唑西林的质量浓度为 2、4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$)。

采用细菌菌落计数法测定加药后生物被膜的细菌数。采用 Luo 等^[32]的方法, 使用 0.1% 的 Triton X-100 和超声波清洗机超声 10 min 分离生物被膜

后, 将各孔的连续稀释液置于 LB 琼脂板上培养 24 h 后进行计数。

1.2.3 百里香酚和苯唑西林对 USA300 生物被膜的清除实验

根据 Luo 等^[32]、张文元等^[33]的方法, 使用结晶紫染色法和菌落计数法测定 32、64、128、256 和 512 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚(8、16、32、64 和 128 $\mu\text{g/mL}$ 的苯唑西林)处理 6、12、24、72 h 对形成的 24 h 年轻的生物被膜和 72 h 成熟的生物被膜的清除作用。实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 百里香酚和苯唑西林联用部分抑菌浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数的测定

根据梁蓓蓓等的实验方法^[34], 计算两药联合的 FIC 指数, 实验设 3 次重复。

计算分级抑菌浓度指数: $\text{FIC} = \text{甲药联用的 MIC} / \text{甲药单用的 MIC} + \text{乙药联用的 MIC} / \text{乙药单用的 MIC}$ 。

结果判断: $\text{FIC} \leq 0.5$ 为协同作用, $0.5 < \text{FIC} \leq 1$ 为相加作用, $1 < \text{FIC} \leq 2$ 为无关作用, $\text{FIC} > 2$ 为拮抗作用。

1.2.5 百里香酚和苯唑西林联合使用对 USA300 生物被膜的抑制实验

根据 Luo 等^[32]的方法, 采用结晶紫染色法和菌落计数法, 测定在苯唑西林和百里香酚的质量浓度分别为 32、16、8、4 $\mu\text{g/mL}$ 和 128、64、32、16 $\mu\text{g/mL}$ 情况下, 联合用药对 USA300 生物被膜形成的抑制作用。实验重复 3 组, 取平均值。

1.2.6 百里香酚和苯唑西林联合使用对 USA300 生物被膜的清除实验

根据张文元等^[33]、戴雨芸等^[35]的方法, 使用结晶紫染色法和菌落计数法测定联合用药对形成的 24 h 年轻的生物被膜和 72 h 成熟的生物被膜的清除作用。药液浓度分别为 16、32、64、128 $\mu\text{g/mL}$ (百里香酚)和 4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$ (苯唑西林)。

1.2.7 统计学分析

采用 Prism7.0 对数据进行分析, 组间两两比较采用 *t* 检验法, 结果表示为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 苯唑西林对 USA300 的最低抑菌浓度和生长曲线

苯唑西林对 USA300 的 MIC 为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由图 1 可知,在苯唑西林的质量浓度较高(64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时,USA300 的生长被有效抑制;而在苯唑西林质量浓度较低(4、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时,USA300 的生长几乎没有被抑制。

2.2 百里香酚和苯唑西林亚抑菌浓度对 USA300 生物被膜的抑制实验

为考察苯唑西林亚抑菌浓度对 USA300 生物被膜形成能力的影响,对苯唑西林作用 18 h 后 USA300 的生物被膜进行了吸光度和菌落计数测定。结果显示,对照组的 OD_{490} 远远大于其他组(图 2)。不同浓度(2、4、8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的苯唑西林均能显著抑制 USA300 生物被膜的形成($P < 0.01$)。结果表明,苯唑西林能有效抑制 USA300 生物被膜的形成,并且呈浓度依赖性。

百里香酚对 USA300 生物被膜形成的影响结果显示,对照组 OD_{490} 远大于其他组(图 3)。不同浓度(8、16、32、64、128 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的百里香酚均能极显著抑制 USA300 生物被膜的形成($P < 0.01$)。实验结果表明,百里香酚能有效抑制 USA300 生物被膜的形成,且呈浓度依赖性。

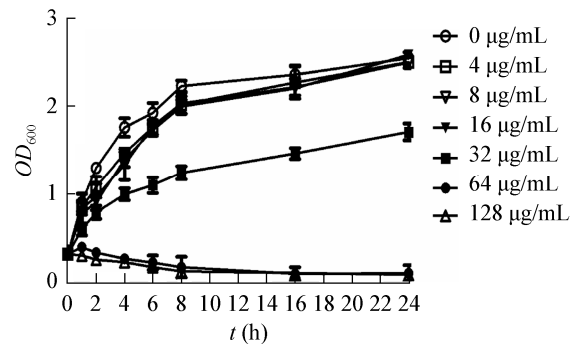


图 1 在 BHI 液体培养基中不同质量浓度的苯唑西林对 USA300 生长的影响

Figure 1 Effects of different mass concentrations of oxacillin on USA300 growth in BHI liquid medium

2.3 百里香酚和苯唑西林对 USA300 生物被膜的清除实验

生物被膜的清除实验结果如图 4 所示,不同浓度(32、64、128、256、512 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的百里香酚对 USA300 菌株 24 h 和 72 h 形成的生物被膜均有一定的清除作用,对 24 h 形成的年轻的生物被膜和对 72 h 形成的成熟生物被膜的清除效果与无百里香酚的对照组相比差异均极其显著($P < 0.01$)。结果表明,百里香酚能有效清除 USA300 形成的生物被膜,但随着加药时间的延长,USA300 有显著增长的趋势,应是药效随着时间的延长而减弱或是 USA300 对百里香酚产生了轻微的耐药性。

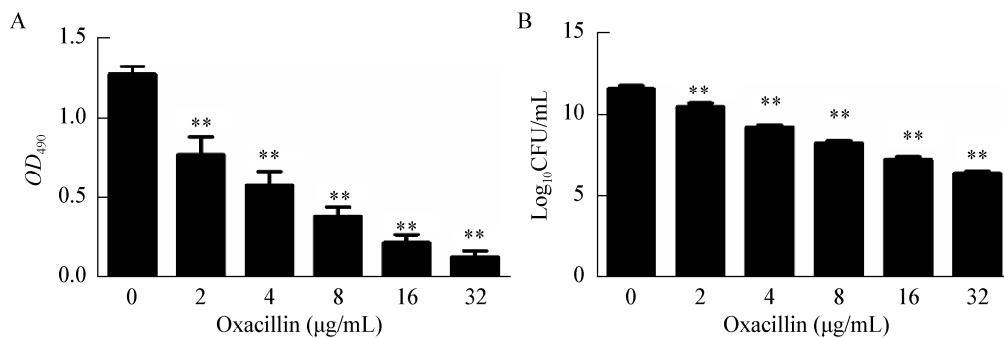


图 2 不同质量浓度的苯唑西林对 USA300 生物被膜的抑制

Figure 2 Inhibition of oxacillin with different mass concentration on USA300 biofilm

注: A: 吸光度测定; B: 菌落计数. **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验。

Note: A: Absorption spectrometry; B: Colony count. **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test.

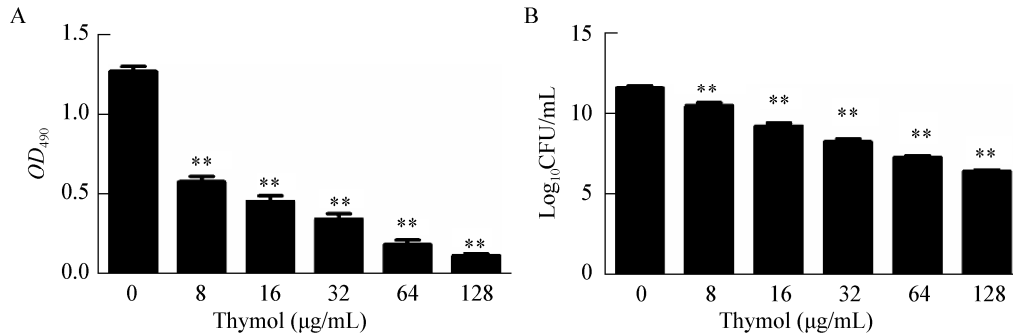


图 3 不同质量浓度的百里香酚对 USA300 生物被膜的抑制

Figure 3 Inhibition of thymol with different mass concentration on USA300 biofilm

注: A: 吸光度测定; B: 菌落计数. **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验.

Note: A: Absorption spectrometry; B: Colony count. **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test.

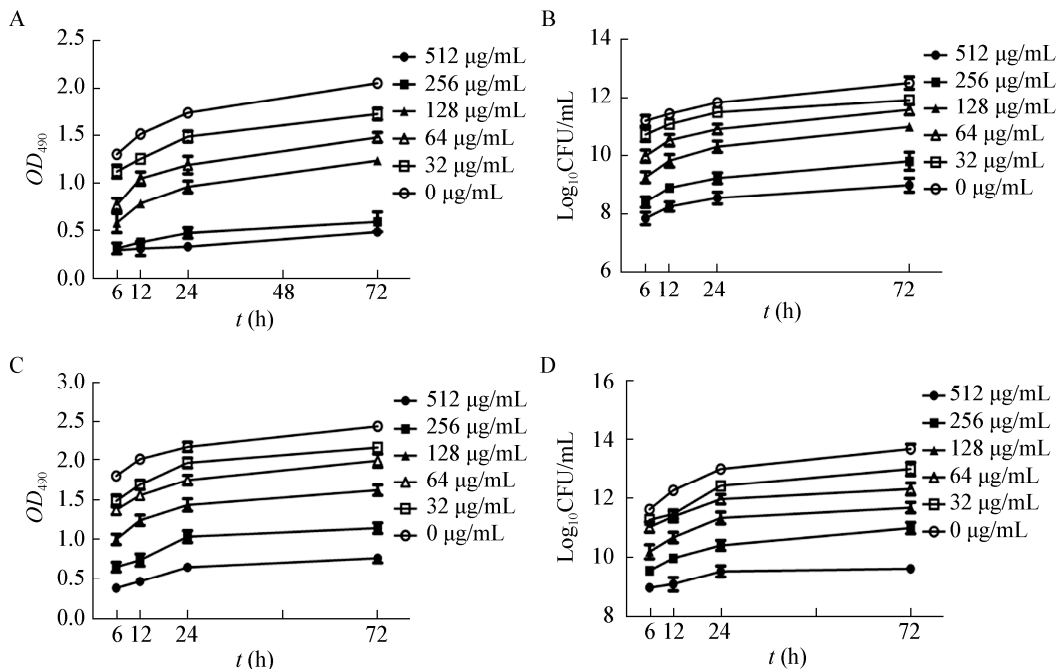


图 4 不同浓度的百里香酚对 USA300 生物被膜的清除作用

Figure 4 Clearance effect of thymol at different concentrations on USA300 biofilm

注: A: 生物被膜形成 24 h 后百里香酚清除不同时间的吸光度测定; B: 生物被膜形成 24 h 后百里香酚清除不同时间的菌落计数; C: 生物被膜形成 72 h 后加入百里香酚作用不同时间的吸光度测定; D: 生物被膜形成 72 h 后加入百里香酚作用不同时间的菌落计数.

Note: A: Absorbance measurement of thymol removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 24 hours; B: Colony count of thymol removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 24 hours; C: Absorbance measurement of thymol removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 72 hours; D: Colony count of thymol removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 72 hours.

苯唑西林对生物被膜的清除实验结果如图 5 所示, 不同浓度(8、16、32、64、128 $\mu\text{g/mL}$)苯唑西林对 24 h 和 72 h 的生物被膜作用不同时间均无显著差异($P > 0.05$), 实验表明, 苯唑西林对 USA300 的生物被膜无明显的清除作用。

2.4 联合用药 FIC 指数的测定

如表 1 所示, 百里香酚联合苯唑西林作用于 MRSA 标准菌株 USA300 的 FIC 指数计算如下: $\text{FIC} = 32/256 + 8/64 = 0.25 < 0.5$, 表明百里香酚与苯唑西林对 USA300 的抗菌作用表现为协同。

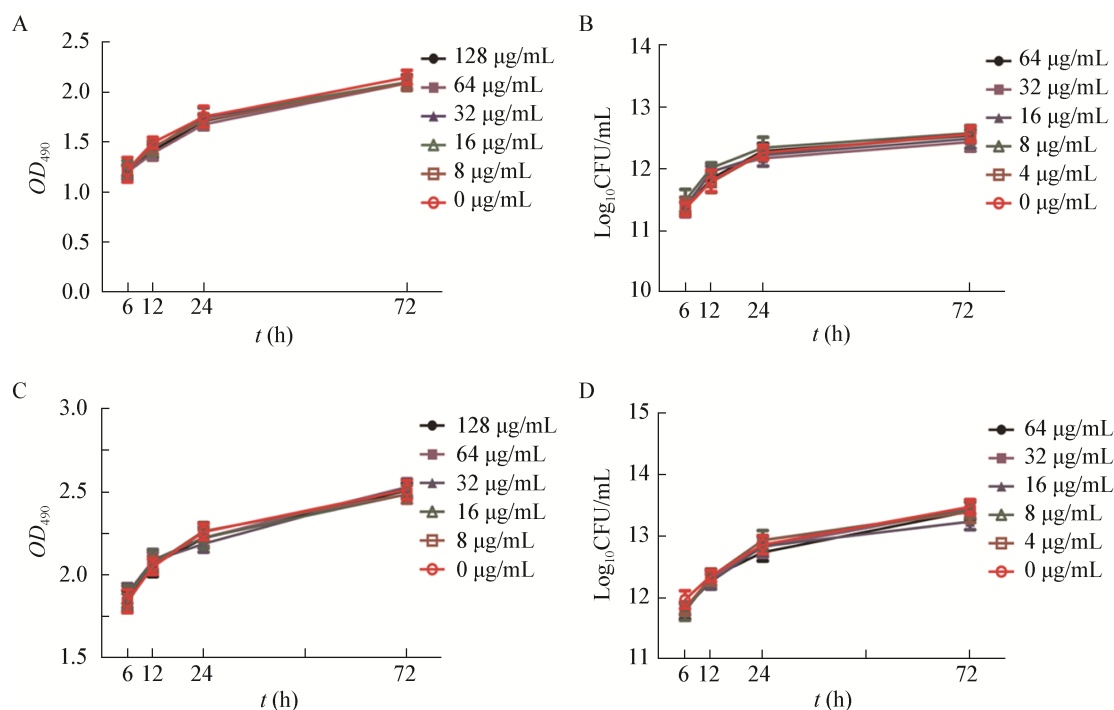


图 5 不同浓度的苯唑西林对 USA300 生物被膜的清除作用

Figure 5 Clearance effect of oxacillin at different concentrations on USA300 biofilm

注: A: 生物被膜形成 24 h 后苯唑西林清除不同时间的吸光度测定; B: 生物被膜形成 24 h 后苯唑西林清除不同时间的菌落计数; C: 生物被膜形成 72 h 后加入苯唑西林作用不同时间的吸光度测定; D: 生物被膜形成 72 h 后加入苯唑西林作用不同时间的菌落计数。

Note: A: Absorbance measurement of oxacillin removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 24 hours; B: Colony count of oxacillin removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 24 hours; C: Absorbance measurement of oxacillin removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 72 hours; D: Colony count of oxacillin removal biofilm at different time after the formation of biofilm for 72 hours.

表 1 联合用药的 FIC 测定结果

Table 1 FIC measurement results of combined medications

Thymol concentration (µg/mL)	Oxacillin concentration (µg/mL)							
	128	64	32	16	8	4	2	1
512	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	+
64	-	-	-	-	-	-	+	+
32	-	-	-	-	-	+	+	+
16	-	-	-	-	-	+	+	+
8	-	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+	+

注: +: 该孔有菌; -: 该孔无菌。

Note: +: The hole has bacteria; -: The hole is sterile.

2.5 联合用药对 USA300 生物被膜的抑制实验

不同浓度的百里香酚与不同浓度的苯唑西林联合使用对 USA300 生物被膜形成的抑制实验结果显示 (表 2、3), 不同浓度(16、32、64、128 µg/mL)的百里香酚和不同浓度(4、8、16、32 µg/mL)的苯唑西林联用均能极显著抑制 USA300 生物被膜的形成 ($P < 0.01$), 两药联用增强了对 USA300 生物被膜形成的抑制效果。

2.6 联合用药对 USA300 生物被膜的清除实验

百里香酚和苯唑西林联合使用对 USA300 形成的生物被膜的清除实验结果(表 4-19)显示, 与对照组相比, 不同浓度(16、32、64、128 µg/mL)的百

里香酚和不同浓度(4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$)的苯唑西林联用对 USA300 形成的 24 h 和 72 h 的生物被膜均具有极显著的清除作用($P<0.01$)。苯唑西林和百里香酚联合使用增强了百里香酚对生物被膜

的清除作用, 使其在亚抑菌浓度保持了较好的生物被膜清除作用。联合用药对 72 h 成熟的生物被膜的清除作用弱于对 24 h 年轻的生物被膜的清除作用。

表 2 不同浓度的百里香酚联合不同浓度的苯唑西林对 USA300 生物被膜形成的影响(OD_{490} 值)

Table 2 Effects of different concentrations of thymol and oxacillin on the formation of USA300 biofilm (OD_{490} value)

Thymol concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Oxacillin concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	32	16	8	4	0
128	0.010 \pm 0.010**	0.133 \pm 0.010**	0.156 \pm 0.015**	0.177 \pm 0.013**	0.203 \pm 0.024**
64	0.147 \pm 0.014**	0.177 \pm 0.012**	0.222 \pm 0.015**	0.349 \pm 0.031**	0.311 \pm 0.032**
32	0.178 \pm 0.011**	0.227 \pm 0.016**	0.317 \pm 0.023**	0.442 \pm 0.022**	0.439 \pm 0.014**
16	0.202 \pm 0.010**	0.296 \pm 0.019**	0.427 \pm 0.024**	0.641 \pm 0.021**	0.671 \pm 0.045**
0	0.226 \pm 0.035**	0.308 \pm 0.034**	0.443 \pm 0.055**	0.746 \pm 0.041**	1.248 \pm 0.051

注: **: 与空白对照组相比较, $P<0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P<0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P<0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P<0.05$, t test.

表 3 不同浓度的百里香酚联合不同浓度的苯唑西林对 USA300 生物被膜形成的影响($\text{Log}_{10}\text{CFU}$)

Table 3 Effects of different concentrations of thymol and oxacillin on the formation of USA300 biofilm ($\text{Log}_{10}\text{CFU}$)

Thymol concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Oxacillin concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	32	16	8	4	0
128	6.173 \pm 0.045**	6.380 \pm 0.057**	6.553 \pm 0.037**	6.627 \pm 0.045**	6.810 \pm 0.039**
64	6.367 \pm 0.037**	6.613 \pm 0.033**	6.827 \pm 0.041**	7.330 \pm 0.088**	7.220 \pm 0.062**
32	6.467 \pm 0.062**	6.803 \pm 0.025**	7.233 \pm 0.039**	8.387 \pm 0.045**	8.481 \pm 0.032**
16	6.670 \pm 0.057**	7.193 \pm 0.029**	8.200 \pm 0.029**	9.120 \pm 0.049**	9.510 \pm 0.054**
0	7.210 \pm 0.062**	7.890 \pm 0.047**	8.810 \pm 0.062**	10.110 \pm 0.069*	11.463 \pm 0.098

注: **: 与空白对照组相比较, $P<0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P<0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P<0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P<0.05$, t test.

表 4 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 6 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD_{490} 值)

Table 4 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 6 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (OD_{490} value)

Thymol concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Oxacillin concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	32	16	8	4	0
128	0.291 \pm 0.042**	0.245 \pm 0.037**	0.286 \pm 0.044**	0.340 \pm 0.03**	0.311 \pm 0.052**
64	0.264 \pm 0.027**	0.472 \pm 0.012**	0.505 \pm 0.027**	0.627 \pm 0.027**	0.654 \pm 0.048**
32	0.369 \pm 0.024**	0.610 \pm 0.021**	0.654 \pm 0.036**	0.824 \pm 0.029**	0.808 \pm 0.049**
16	0.522 \pm 0.032**	0.686 \pm 0.023**	0.801 \pm 0.022**	1.064 \pm 0.042*	1.124 \pm 0.065*
0	1.281 \pm 0.030	1.293 \pm 0.040	1.262 \pm 0.031	1.256 \pm 0.019	1.315 \pm 0.044

注: **: 与空白对照组相比较, $P<0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P<0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P<0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P<0.05$, t test.

表 5 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 6 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)Table 5 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 6 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	6.433±0.137**	6.970±0.094**	7.420±0.054**	8.413±0.039**	8.340±0.054**
64	6.833±0.168**	8.113±0.065**	8.890±0.036**	9.340±0.054**	9.210±0.069**
32	7.870±0.119**	9.013±0.050**	9.663±0.054**	9.653±0.370**	9.810±0.043*
16	8.977±0.093**	9.583±0.095**	10.130±0.041*	10.650±0.048	10.830±0.062
0	11.210±0.062	11.220±0.039	11.080±0.045	11.310±0.061	11.250±0.073

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 6 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 12 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD₄₉₀ 值)Table 6 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 12 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (OD₄₉₀ value)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	0.226±0.058**	0.221±0.019**	0.334±0.020**	0.322±0.028**	0.375±0.040**
64	0.232±0.031**	0.634±0.019**	0.621±0.025**	0.831±0.015**	0.784±0.043**
32	0.399±0.028**	0.724±0.024**	0.812±0.026**	1.073±0.051**	1.050±0.065**
16	0.617±0.020**	0.780±0.024**	0.894±0.017**	1.251±0.029*	1.256±0.042*
0	1.469±0.034	1.473±0.024	1.459±0.036	1.485±0.021	1.482±0.037

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 7 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 12 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)Table 7 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 12 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	6.273±0.087**	6.567±0.076**	6.840±0.067**	7.197±0.054**	7.310±0.029**
64	7.537±0.108**	9.090±0.054**	9.370±0.161**	10.050±0.088**	10.220±0.032**
32	8.017±0.139**	9.757±0.041**	10.240±0.057**	10.550±0.095*	10.820±0.061*
16	9.560±0.104**	10.360±0.041*	10.587±0.05*	11.050±0.033	11.110±0.026
0	11.640±0.058	11.510±0.063	11.770±0.049	11.590±0.062	11.810±0.069

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 8 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 24 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD₄₉₀ 值)Table 8 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 24 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (OD₄₉₀ value)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	0.268±0.030**	0.249±0.025**	0.316±0.027**	0.343±0.018**	0.474±0.05**
64	0.415±0.028**	0.624±0.024**	0.757±0.018**	0.916±0.060**	0.963±0.057**
32	0.532±0.019**	0.819±0.025**	0.939±0.022**	1.123±0.027**	1.193±0.085**
16	0.703±0.047**	0.891±0.021**	1.004±0.040**	1.350±0.022**	1.492±0.054*
0	1.636±0.035	1.727±0.034	1.771±0.023	1.783±0.009	1.683±0.041

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 9 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 24 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)

Table 9 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 24 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	6.837±0.076**	6.863±0.046**	6.343±0.087**	6.850±0.045**	6.780±0.053**
64	8.267±0.119**	9.030±0.048**	10.050±0.071**	10.320±0.069**	10.080±0.043**
32	8.960±0.091**	10.410±0.049**	10.657±0.050**	11.070±0.053*	11.080±0.034*
16	9.953±0.082**	10.710±0.053**	10.910±0.029**	11.393±0.050*	11.440±0.051*
0	12.230±0.061	12.180±0.059	11.850±0.051	11.970±0.047	12.080±0.057

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 10 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 72 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD₄₉₀ 值)

Table 10 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 72 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (OD₄₉₀ value)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	0.203±0.038**	0.289±0.055**	0.386±0.028**	0.502±0.037**	0.590±0.097**
64	0.524±0.025**	0.787±0.032**	0.991±0.046**	1.141±0.025**	1.139±0.043**
32	0.796±0.029**	1.095±0.053**	1.295±0.024**	1.517±0.029**	1.483±0.047**
16	1.027±0.044**	1.285±0.036**	1.423±0.036**	1.636±0.035**	1.729±0.057**
0	2.069±0.009	2.077±0.032	2.064±0.038	2.038±0.030	1.977±0.051

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 11 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 72 h 对形成 24 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)

Table 11 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 72 h on the formation of USA300 biofilm for 24 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	6.483±0.103**	6.673±0.087**	7.210±0.062**	8.403±0.060**	8.310±0.120**
64	8.853±0.180**	9.340±0.058**	10.300±0.034**	10.760±0.049**	10.560±0.111**
32	9.963±0.167**	11.030±0.065**	11.230±0.046**	11.450±0.029*	11.320±0.093**
16	10.830±0.127**	11.420±0.059**	11.610±0.049*	11.760±0.045*	11.770±0.124*
0	12.220±0.165	12.120±0.123	12.340±0.135	12.070±0.116	12.370±0.112

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 12 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 6 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD₄₉₀ 值)

Table 12 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 6 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (OD₄₉₀ value)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	0.758±0.042**	0.703±0.042**	0.696±0.033**	0.773±0.029**	0.653±0.058**
64	0.846±0.050**	0.918±0.069**	0.778±0.036**	0.898±0.015**	1.004±0.062**
32	0.916±0.033**	0.899±0.065**	0.907±0.031**	1.127±0.043**	1.376±0.056**
16	1.006±0.022**	1.058±0.080**	1.056±0.065**	1.423±0.040**	1.489±0.070**
0	1.842±0.060	1.832±0.025	1.899±0.024	1.817±0.038	1.766±0.047

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 13 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 6 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)Table 13 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 6 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	9.137±0.092**	9.083±0.102**	9.340±0.244**	9.790±0.126**	9.770±0.075**
64	9.427±0.090**	9.680±0.114**	10.180±0.05**	10.330±0.117**	10.714±0.118**
32	9.730±0.107**	9.873±0.092**	10.630±0.065**	11.050±0.052	11.064±0.126
16	10.460±0.176**	10.553±0.060**	10.920±0.037*	11.350±0.078	11.513±0.134
0	11.117±145	11.510±0.156	11.834±0.080	11.754±0.120	11.717±0.050

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 14 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 12 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD₄₉₀ 值)Table 14 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 12 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (OD₄₉₀ value)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	0.654±0.026**	0.598±0.049**	0.720±0.043**	0.816±0.056**	0.842±0.072**
64	0.850±0.058**	0.801±0.049**	0.895±0.050**	1.084±0.042**	1.245±0.061**
32	0.917±0.079**	0.980±0.040**	1.030±0.062**	1.335±0.043**	1.561±0.047**
16	1.106±0.050**	1.129±0.049**	1.244±0.058**	1.618±0.033**	1.696±0.056**
0	2.032±0.025	1.932±0.055	2.012±0.065	2.021±0.029	1.981±0.058

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 15 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 12 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)Table 15 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 12 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	9.017±0.119**	9.460±0.065**	9.750±0.086**	9.870±0.110**	9.970±0.158**
64	9.423±0.118**	10.140±0.078**	10.367±0.049**	10.500±0.124**	10.070±0.145**
32	10.103±0.06**	10.437±0.076**	10.550±0.057**	10.993±0.103**	10.927±0.078**
16	10.490±0.043**	10.570±0.102**	10.803±0.128**	11.470±0.091*	11.504±0.113
0	11.603±0.188	11.567±0.168	12.007±0.208	11.505±0.132	11.907±0.108

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 16 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 24 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD₄₉₀ 值)Table 16 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 24 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (OD₄₉₀ value)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	0.781±0.037**	0.748±0.034**	0.856±0.053**	1.021±0.030**	1.039±0.041**
64	0.836±0.034**	0.884±0.048**	0.976±0.038**	1.179±0.040**	1.439±0.073**
32	0.804±0.056**	1.090±0.073**	1.122±0.082**	1.603±0.054**	1.756±0.058**
16	1.118±0.052**	1.206±0.025**	1.406±0.045**	1.853±0.056*	1.976±0.058*
0	2.211±0.047	2.015±0.077	2.121±0.041	2.090±0.037	2.168±0.033

注: **: 与空白对照组相比较, $P < 0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P < 0.05$, t 检验。

Note: **: Compare with blank control group, $P < 0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P < 0.05$, t test.

表 17 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 24 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)Table 17 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 24 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	9.103±0.152**	9.490±0.131**	9.880±0.112**	10.637±0.111**	10.127±0.141**
64	9.377±0.131**	9.637±0.077**	10.580±0.407**	10.993±0.127**	11.435±0.211**
32	9.793±0.177**	10.213±0.159**	10.907±0.087**	11.450±0.073**	12.030±0.162
16	10.523±0.173**	10.967±0.103**	11.360±0.098**	11.763±0.092*	12.637±0.125
0	12.002±0.184	12.256±0.162	12.157±0.154	12.470±0.203	12.457±0.103

注: **: 与空白对照组相比较, $P<0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P<0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P<0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P<0.05$, t test.

表 18 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 72 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(OD₄₉₀ 值)Table 18 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 72 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (OD₄₉₀ value)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	0.705±0.042**	0.807±0.042**	1.066±0.033**	1.195±0.029**	1.146±0.062**
64	0.889±0.050**	1.116±0.069**	1.189±0.036**	1.423±0.015**	1.626±0.063**
32	0.934±0.033**	1.223±0.065**	1.363±0.031**	1.790±0.043**	2.004±0.079**
16	1.056±0.022**	1.394±0.080**	1.579±0.065**	2.068±0.040**	2.171±0.049*
0	2.338±0.032	2.125±0.047	2.309±0.041	2.515±0.062	2.413±0.047

注: **: 与空白对照组相比较, $P<0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P<0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P<0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P<0.05$, t test.

表 19 不同浓度的百里香酚和苯唑西林联合作用 72 h 对形成 72 h 的 USA300 生物被膜的影响(Log₁₀CFU)Table 19 Effects of thymol and oxacillin combined at different concentrations for 72 h on the formation of USA300 biofilm for 72 h (Log₁₀CFU)

Thymol concentration (μg/mL)	Oxacillin concentration (μg/mL)				
	32	16	8	4	0
128	9.110±0.092**	10.383±0.102**	10.750±0.244**	11.153±0.126**	11.357±0.129**
64	9.937±0.090**	10.743±0.114**	11.030±0.050**	11.573±0.117**	12.153±0.160*
32	10.333±0.107**	11.003±0.092**	11.283±0.065**	11.933±0.052**	12.113±0.260*
16	11.103±0.176**	11.347±0.06**	11.683±0.037**	12.367±0.078*	13.053±0.280
0	13.320±0.250	12.62±0.310	13.180±0.170	13.020±0.340	13.12±0.050

注: **: 与空白对照组相比较, $P<0.01$, t 检验; *: 与空白对照组相比较, $P<0.05$, t 检验.

Note: **: Compare with blank control group, $P<0.01$, t test; *: Compare with blank control group, $P<0.05$, t test.

3 讨论与结论

目前 MRSA 感染已遍及全球, 其耐药程度日趋严重, MRSA 常形成生物被膜来对多种抗生素产生不同程度的耐药, 不易被清除, 从而造成持续性感染^[34]。对 MRSA 感染有较好疗效的万古霉素在使用时有大量的不良反应和毒副作用发生,

采用毒性低、效果好的药物联合使用已成为目前治疗 MRSA 感染的首选方案, 抑制 MRSA 感染的重点在于研究药物是否对其生物被膜有抑制和清除作用。已有研究数据表明百里香酚对 USA300 的 MIC 为 256 μg/mL, 有显著的抑菌作用; 在百里香酚质量浓度较高时 USA300 的生长被有效抑制,

而在百里香酚质量浓度较低时 USA300 的生长几乎没有被抑制^[22]。本试验的 MIC 实验表明苯唑西林对 USA300 的 MIC 为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，抑菌效果显著。本试验中生物被膜的抑制和清除实验表明百里香酚对 USA300 的 24 h 和 72 h 的生物被膜均具有抑制和清除作用，而苯唑西林对 USA300 的生物被膜仅有抑制作用，无清除作用；联合用药实验表明，百里香酚和苯唑西林的联合抗菌作用表现为协同，百里香酚和苯唑西林联合用药对 USA300 生物被膜的抑制和清除作用增强，高剂量下清除作用明显，低剂量时 USA300 呈现缓慢增长的趋势。

百里香酚对 USA300 的抑菌作用是通过改变细胞膜通透性、破坏细菌细胞膜和细胞壁完整性、干扰菌体内蛋白质代谢等途径来完成的^[22]，同时可抑制其生物被膜的形成并对其生物被膜产生清除作用。苯唑西林是作用于细菌的细胞壁而对细胞产生抑菌作用，当 MRSA 形成生物被膜后，阻断苯唑西林和细菌细胞壁的接触，使苯唑西林对已形成生物被膜的细菌无清除作用，从而使 MRSA 对苯唑西林产生耐药性。采用百里香酚和苯唑西林联合用药可以获得良好的抑菌效果。虽然苯唑西林对生物被膜无清除作用，但是百里香酚对生物被膜的清除作用可破坏生物被膜的完整性，进而使苯唑西林可透过生物被膜对细菌产生作用，从而使联合用药的清除作用得到增强。百里香酚和苯唑西林联合使用对 24 h 和 72 h 形成的生物被膜均具有良好的清除作用，但是生物被膜形成时间越久，生物被膜的胞外多糖基质含量越多^[14]，从而导致形成时间更长的生物被膜更不易被清除。联合用药在低剂量时清除生物被膜效果较差，但是在高剂量下依然保持良好的清除效果，所以治疗 MRSA 感染用药一定要及时有效，尽早将 MRSA 清除干净。探究百里香酚和苯唑西林联用对 MRSA 生物被膜的影响为临床上治疗 MRSA 感染提供了有力的方案，既避免使用单一抗生素带来的安全问题，又有效抑制 MRSA 感染，使临床上治疗 MRSA 感染更加便捷有效。

综上所述，百里香酚和苯唑西林联合使用对 MRSA 的标准菌株 USA300 有显著的抑菌作用，而且对 USA300 形成的生物被膜有良好的抑制和清除作用，具有极大的应用潜力。对于苯唑西林能增强百里香酚对 MRSA 的抗菌作用及对 MRSA 生物被膜的抑制和清除作用，其作用机制还有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] Yu XH, Falagas ME, Wang D, et al. *In vitro* activity of fosfomycin in combination with linezolid against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2014, 67(5): 369-371
- [2] Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 39(4): 273-282
- [3] Xu H, Long NN, Lin L, et al. *In vitro* antibacterial activity of Amomum tsao-ko essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2017, 12(3): 241-246 (in Chinese)
徐航, 龙娜娜, 林琳, 等. 草果油抗 MRSA 体外活性研究[J]. *成都医学院学报*, 2017, 12(3): 241-246
- [4] Dou XM, Song W, Gao WZ. Study on MRSA infection and drug resistance[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2012, 22(9): 1943-1945 (in Chinese)
窦学梅, 宋巍, 高文旂. MRSA 医院感染及耐药性研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(9): 1943-1945
- [5] Duan SQ, Cui SS, Li Y, et al. Mechanism, prevention, and treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *International Medicine and Health Guidance News*, 2018, 24(10): 1464-1466,1470 (in Chinese)
段思琪, 崔莎莎, 李月, 等. MRSA 的耐药机制及防治研究进展 [J]. *国际医药卫生导报*, 2018, 24(10): 1464-1466,1470
- [6] Sun FH, Long NN, Wang XM, et al. *In vitro* antibacterial activity of geraniol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2018, 43(7): 921-926 (in Chinese)
孙丰慧, 龙娜娜, 王雪梅, 等. 香叶醇体外抗 MRSA 活性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(7): 921-926
- [7] Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(11): 7687-7692

- [8] Chen WX, Zhang LP. New progress in bacterium biofilm[J]. Journal of Microbiology, 2004, 24(1): 46-48 (in Chinese)
陈维贤, 张莉萍. 细菌生物被膜(bacterial biofilm)的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(1): 46-48
- [9] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322
- [10] Yin YY, He KM, Wu MX, et al. New advances in antibiofilm agents[J]. Journal of Pathogen Biology, 2018, 13(10): 1162-1165 (in Chinese)
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
- [11] Wang R. Bacterial biofilm resistance shielding and its prevention[J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2004, 3(1): 61-66 (in Chinese)
王睿. 细菌生物被膜耐药屏蔽及其防治[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2004, 3(1): 61-66
- [12] Wang R, Fang XQ. Characteristics and prevention of bacterial biofilm-associated infections[J]. World Notes on Antibiotics, 1998, 19(1): 50-52,60 (in Chinese)
王睿, 方向群. 细菌生物被膜相关感染的特点与防治[J]. 国外医药抗生素分册, 1998, 19(1): 50-52,60
- [13] Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 677-701
- [14] Zhang YF, Cheng MJ, Ji YL, et al. Effect of lysin LysGH15 on *Staphylococcus aureus* biofilm *in vitro*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(2): 293-300 (in Chinese)
张玉凤, 程梦珺, 冀亚路, 等. 裂解酶 LysGH15 对金黄色葡萄球菌体外生物被膜的影响[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(2): 293-300
- [15] Wang X, Chen F, Wang L, et al. Inhibitory effects of *Sanguisorba officinalis* L. on MRSA biofilms formation[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2016, 36(9): 27-29 (in Chinese)
王馨, 陈菲, 王龙, 等. 地榆对 MRSA 生物被膜形成的抑制作用[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(9): 27-29
- [16] Huang L. *In vitro* antimicrobial effect of vancomycin combined with azithromycin on methicillin-resistant *Staphylococci aureus* with biofilm[J]. China Journal of Modern Medicine, 2016, 26(15): 119-122 (in Chinese)
黄丽. 万古霉素联合阿奇霉素对形成生物被膜耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体外抗菌效果分析[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(15): 119-122
- [17] Guan DX, Feng XP, Feng ZZ. Literature analysis of vancomycin adverse reactions[J]. China Pharmaceuticals, 2007, 16(1): 42-43 (in Chinese)
官东秀, 俸小平, 冯祚臻. 万古霉素不良反应文献分析[J]. 中国药业, 2007, 16(1): 42-43
- [18] Zhao B, Chen Q, Du ZC, et al. Antibacterial activity of vancomycin, teicoplanin, linezolid, and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its advantages and disadvantages[J]. China Practical Medical, 2011, 6(18): 242-243 (in Chinese)
赵博, 陈取, 杜志成, 等. 万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、达托霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抗菌活性及药物利弊的研究[J]. 中国实用医药, 2011, 6(18): 242-243
- [19] Qiu KL, Mao HF, Ou WH, et al. Study on the synthesis of thymol[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2008(2): 28-32 (in Chinese)
仇昆伦, 毛海舫, 欧文华, 等. 百里香酚的研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2008(2): 28-32
- [20] Yin QH, Zhuang YZ, Yan FX. Antitumor efficacy of thymol[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(11): 2073-2075 (in Chinese)
殷清华, 庄英帜, 严奉祥. 百里香酚的抗肿瘤作用[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(11): 2073-2075
- [21] Zhang J, Feng G, Yuan XC, et al. Preliminary study on the antifungal activity of thymol[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(21): 277-280 (in Chinese)
张静, 冯岗, 袁旭超, 等. 百里香酚抑菌活性初探[J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 277-280
- [22] Yuan ZW, Chen ZY, Gan YY, et al. Antibacterial mechanism of thymol to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2018, 39(6): 18-23 (in Chinese)
袁中伟, 陈志英, 甘盈盈, 等. 百里香酚对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(6): 18-23
- [23] Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(4): 519-523
- [24] Han ZQ, Zuo GY, Hao XY. Advances in studies on anti-MRSA effects of Chinese materia medica compounds combined with antibiotics[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(1): 187-195 (in Chinese)
韩宗其, 左国营, 郝小燕. 中药成分联合抗生素抗 MRSA 作用的研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(1): 187-195
- [25] Cui HY, Zhang XJ, Zhou H, et al. Research on antibacterial effect of *Eucalyptus* extracts combined with oxacillin against MRSA[J]. Food & Machinery, 2015, 31(1): 123-126 (in Chinese)
崔海英, 张雪婧, 周慧, 等. 桉树提取物与苯唑西林对 MRSA 的抗菌作用[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 123-126

- [26] Zhao B. Combination therapy and monotherapy of antibacterials: comparison and clinical strategies[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2010, 20(15): 2353-2355 (in Chinese)
赵斌. 抗菌药物联合用药与单药治疗的对比及临床决策[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(15): 2353-2355
- [27] Yuan P, Yuan P. Resveratrol enhances the sensitivity of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin[J]. Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Forces, 2010, 21(9): 762-765 (in Chinese)
袁萍, 袁鹏. 白藜芦醇联合苯唑西林对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌作用[J]. 武警医学, 2010, 21(9): 762-765
- [28] Yuan ZW, Gu KX, Zhang TY, et al. Antibacterial mechanism of usnic acid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2019, 54(4): 22-29 (in Chinese)
袁中伟, 谷可欣, 张天翼, 等. 松萝酸对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用机制研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2019, 54(4): 22-29
- [29] Yuan ZW, Ouyang P, Gu KX, et al. The antibacterial mechanism of oridonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. Pharmaceutical Biology, 2019, 57(1): 710-716
- [30] Yuan ZW, Wu QHM, Deng JQ, et al. The mechanism of erianin relieving peritonitis caused by *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2018, 44(5): 553-558 (in Chinese)
袁中伟, 吴秦慧美, 邓嘉强, 等. 毛兰素缓解金黄色葡萄球菌腹膜炎的作用机制[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2018, 44(5): 553-558
- [31] Zhang B, Teng ZH, Li XH, et al. Chalcone attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by targeting Sortase A and alpha-hemolysin[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1715
- [32] Luo J, Dong BY, Wang K, et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176883
- [33] Zhang WY, Yang YD, Tang L. Effects of 14-membered macrolides on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and synergism between macrolide and ciprofloxacin[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(11): 1288-1289 (in Chinese)
张文元, 杨亚冬, 唐靓. 十四元环大环内酯类对细菌生物被膜形成的影响及对环丙沙星的增效作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(11): 1288-1289
- [34] Liang BB, Li Y, Niu H, et al. *In vitro* activity of linezolid combination with fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2015, 31(18): 1840-1842 (in Chinese)
梁蓓蓓, 李悦, 牛卉, 等. 利奈唑胺与磷霉素对甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌体外联合药敏的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(18): 1840-1842
- [35] Dai YY, Li C, Yuan ZW, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by carvacrol[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 813-820 (in Chinese)
戴雨芸, 李超, 袁中伟, 等. 香芹酚抑制金黄色葡萄球菌生物被膜的形成[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 813-820