

# 香芹酚联合头孢曲松对耐药性沙门氏菌的体外抗菌作用

唐廷, 尹立子, 赵素梅, 杜娟, 贺常亮\*

四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

唐廷, 尹立子, 赵素梅, 杜娟, 贺常亮. 香芹酚联合头孢曲松对耐药性沙门氏菌的体外抗菌作用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 573-583.

TANG Ting, YIN Lizi, ZHAO Sumei, DU Juan, HE Changliang. *In vitro* antimicrobial effects of carvacrol combined with ceftriaxone on drug-resistant *Salmonella*[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 573-583.

**摘要:**【背景】由于抗生素的滥用, 使得细菌耐药性问题严峻, 寻找解决耐药性细菌感染的治疗策略迫在眉睫。临床上, 中药与抗菌药物联用在抗耐药性细菌感染方面效果显著。【目的】研究香芹酚联合头孢曲松对耐药性沙门氏菌(SJ2)的协同效应及机制。【方法】通过二倍肉汤稀释法测定香芹酚和头孢曲松对 SJ2 的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC); 通过棋盘法和生长曲线测定探究香芹酚和头孢曲松联合抗 SJ2 活性; 通过膜电位检测、胞外碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)含量测定、菌体内抗生素蓄积分析、细菌生存活力测定及扫描电镜研究香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 细胞壁、细胞膜的影响。【结果】香芹酚和头孢曲松对 SJ2 的 MIC 分别为 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 2 048  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 具有协同作用, 其分级抑制浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)为 0.375; 香芹酚可协同头孢曲松使 SJ2 细胞膜出现去极化, 显著增加 AKP 泄漏至胞外的量( $P<0.05$ ), 显著增加菌体胞内抗生素蓄积( $P<0.01$ ), 显著增加细胞膜完整性破坏的细菌数量, 严重造成菌体结构的损伤。【结论】香芹酚联合头孢曲松具有协同抗 SJ2 的作用, 其协同机制可通过损伤细菌细胞壁及细胞膜来实现。

**关键词:** 香芹酚; 头孢曲松; 协同作用; 耐药性沙门氏菌

资助项目: 国家自然科学基金(31872510); 四川省科技计划-2021YFH0156 (21121290620)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872510) and the Sichuan Provincial Science and Technology Program-2021YFH0156 (21121290620).

\*Corresponding author. E-mail: lorri190@126.com

Received: 2022-05-18; Accepted: 2022-06-09; Published online: 2022-07-14

## ***In vitro* antimicrobial effects of carvacrol combined with ceftriaxone on drug-resistant *Salmonella***

TANG Ting, YIN Lizi, ZHAO Sumei, DU Juan, HE Changliang\*

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

**Abstract:** **[Background]** Due to the abuse of antibiotics, bacterial drug resistance has become a severe problem. Therefore, it is urgent to find useful strategies to solve the current situation of drug-resistant bacterial infections. In clinical, the combination of Chinese medicine and antibiotics is significantly effective in preventing drug-resistant bacterial infections. **[Objective]** To study the synergistic effect of carvacrol combined with ceftriaxone on drug-resistant *Salmonella* (SJ2) and the mechanism. **[Methods]** The minimum antibacterial concentration (minimal inhibitory concentration, MIC) of carvacrol and ceftriaxone on SJ2 was determined by broth microdilution method. The activity of carvacrol combined with ceftriaxone against SJ2 was determined by checkerboard method and growth curve. The effects of carvacrol combined with ceftriaxone on SJ2 cell wall and membrane were studied by membrane potential detection, extracellular alkaline phosphatase (alkaline phosphatase, AKP) content determination, antibiotic accumulation analysis in bacteria, bacterial viability determination, and scanning electron microscopy. **[Results]** The MIC of carvacrol and ceftriaxone against SJ2 was 256  $\mu\text{g/mL}$  and 2 048  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The carvacrol and ceftriaxone had the synergistic effect on SJ2, and their fractional inhibitory concentration index (fractional inhibitory concentration index, FICI) was 0.375. Carvacrol combined with ceftriaxone depolarized the SJ2 cell membranes, and significantly increased the amount of extracellular AKP ( $P < 0.05$ ), the intracellular antibiotic accumulation ( $P < 0.01$ ), and the number of bacteria that disrupted cell membrane integrity and caused serious damage of structure. **[Conclusion]** Carvacrol combined with ceftriaxone has the synergistic effect against SJ2, and the synergistic mechanism can be realized by damaging the bacterial cell wall and cell membrane.

**Keywords:** carvacrol; ceftriaxone; synergistic effect; drug-resistant *Salmonella*

沙门氏菌(*Salmonella*)作为一种无芽胞和荚膜、有鞭毛、能运动、需氧或兼性厌氧的革兰氏阴性菌<sup>[1]</sup>,可在人和多种动物中引起肠道疾病,也可能导致菌血症和系统性感染免疫抑制<sup>[2-3]</sup>。沙门氏菌还是一种食源性病原菌。由沙门氏菌污染的食物导致的感染在世界各地暴发。据报道,沙门氏菌已导致全球约 9 300 万例胃肠炎和 15.5 万人死亡,严重威胁着社会公共健康和安全<sup>[4-5]</sup>。抗生素作为 20 世纪最伟大的医学发

现之一,在治疗沙门氏菌感染疾病中发挥着至关重要的作用。然而沙门氏菌随着长期抗生素的滥用而进化,使其逐渐对抗生素出现耐药性,已有报道沙门氏菌对头孢菌素类、氨基糖苷类、四环素类、大环内酯和酮内酯等多种抗生素均有一定耐药性<sup>[6-7]</sup>。其中,沙门氏菌产生耐药的主要机制之一是通过改变细胞膜的通透性,而细胞膜是抗生素进入细菌体内发挥其作用的唯一途径。沙门氏菌可以选择性地改变膜外孔蛋

白的大小和数量, 以增加细胞膜的厚度, 降低细胞膜的通过性, 防止抗生素进入细胞, 从而使细菌对药物产生耐药性<sup>[8-9]</sup>。

香芹酚为一种酚类单萜化合物, 是许多芳香植物和香料生产精油的组成成分<sup>[10]</sup>。已有研究报道香芹酚具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、镇痛、抗肝毒性、杀虫和抗菌等药理活性<sup>[11]</sup>。在抗菌活性方面, 香芹酚单独使用不仅可导致细菌细胞膜的不稳定、膜电位的降低、pH 梯度的耗散及细菌胞质膜脂质组分的扰动从而达到抗菌效果<sup>[12]</sup>, 并且还可与抗生素联合达到协同抗菌效果<sup>[13-14]</sup>。然而, 虽已研究发现香芹酚可与抗生素联合灭杀耐药性细菌, 但大多数研究仅是初步证明香芹酚与抗生素具有协同抗耐药菌活性, 并未解释其协同抗耐药菌机制。此外, 目前尚无香芹酚联合头孢曲松抗耐药性沙门氏菌方面的研究, 包括其协同机制也未被报道过。因此, 研究以期为中药协同抗菌药物抗耐药菌机制研究提供参考, 并且为解决耐药性沙门氏菌感染的治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

耐药性沙门氏菌(SJ2)为鸭源, 由四川大学动物医学院动物药理学实验室分离鉴定, 并通过纸片扩散法发现其对氨苄西林、头孢唑林、头孢曲松、头孢噻肟、环丙沙星及氧氟沙星均产生耐药。

香芹酚(纯度>98%), 成都瑞芬思生物科技有限公司; DMSO, 北京索莱宝生物科技有限公司; 注射用头孢曲松, 齐鲁制药有限公司(国药准字 H37020572); 碱性磷酸酶试剂盒, 南京建成生物科技有限公司; LIVE/DEAD 细菌生存力试剂盒, 赛默飞世尔科技公司; 罗丹明 123 染液, 创赢博元科技有限公司; 甲醇、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

及乙腈, 成都浩博优科技有限公司。MH 肉汤培养基, 青岛高科园海博生物技术有限公司。Phenomenex Gemini C18 柱, 上海斯坦福生物科技发展有限公司; 数字病理扫描仪, Olympus 公司; 酶标仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株的活化和菌液的制备

将保存的 SJ2 菌接种于 MH 肉汤培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h 后, 再次转入 MH 肉汤培养基以同样的培养方式进一步使细菌复壮; 用接种环将上述菌液划线在 MH 琼脂培养基上, 于恒温培养箱中 37 °C 培养 24 h 后挑取单菌落于 MH 肉汤培养基中, 以 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h 后, 再用灭菌的 MH 肉汤培养基稀释菌体沉淀至 10<sup>6</sup> CFU/mL, 作为实验用菌。

#### 1.2.2 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的测定

采用微量肉汤稀释法分别测量香芹酚和头孢曲松对 SJ2 菌的最低抑菌浓度。首先将香芹酚和头孢曲松药液加入 96 孔板, 使得第一孔中的浓度分别为 1 024 μg/mL 和 8 192 μg/mL, 随后利用二倍稀释法稀释 8 个浓度, 最后加入稀释好的菌液并保持菌液的最终浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL。同时设置仅加 MH 肉汤培养基的空白对照组、加 MH 肉汤培养基和菌液的阳性对照组、加 MH 肉汤培养基和药液的阴性对照组。放置 96 孔板于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 观察结果, 以最低无菌生长的药物浓度孔作为 MIC 值<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.3 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌的分级抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)测定

根据香芹酚和头孢曲松 MIC 的结果, 选定 2 种药物的 2MIC 为联合抗菌的最高浓度, 2 种

药物利用二倍稀释法稀释 6 个浓度梯度药液备用。香芹酚沿水平方向每孔分别添加稀释好的不同浓度药液、头孢曲松沿垂直方向每孔分别添加稀释好的不同浓度药液, 2 种药物不同浓度分别混合后再加入配制好的菌液; 另外, 设置仅加菌液的阳性对照组, 仅加药液的阴性对照组, 以及仅加培养基的空白对照组。放置 96 孔板于 37 °C 培养箱中静置培养 18 h 观察结果<sup>[16]</sup>。记录最佳组合效应时的 MIC 值, 分别计算香芹酚联合头孢曲松作用于 SJ2 菌的 FICI。结果判读:  $FICI = \frac{\text{甲药联合的 MIC}}{\text{甲药单用的 MIC} + \text{乙药联合的 MIC} + \text{乙药单用的 MIC}}$ ,  $FICI \leq 0.5$  表示协同作用;  $0.5 < FICI < 1.0$  表示部分协同作用;  $FICI = 1.0$  表示相加作用;  $1.0 < FICI < 4.0$  表示无关作用;  $FICI \geq 4.0$  表示拮抗作用<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.4 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌生长曲线的影响

香芹酚使用 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度与头孢曲松 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1 024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度分别进行联合, 随后加入稀释好的菌液并保证最终浓度为  $10^6$  CFU/mL, 同时设置仅加 MH 肉汤培养基的空白组, 以及添加 MH 肉汤培养基和菌液的阳性组。最后放置 96 孔板于 37 °C 培养箱中静置培养, 并记录其在 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、16、20、24 h 细菌的生长情况<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.5 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌培养液中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)的测定

用 MH 肉汤培养基培养 SJ2 菌 12 h 后加入 128、64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  不同浓度的香芹酚和 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  头孢曲松药物及两者药物的联合浓度, 充分混匀后放置锥形瓶于 150 r/min 的摇床中振荡培养, 并于 0、1、2、4、6、8、10 h 取菌液 6 000 r/min 离心 5 min, 利用上清液进行碱性磷酸酶的测定, 测定方法参考碱性磷酸酶试剂盒

说明书<sup>[19]</sup>。

#### 1.2.6 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌细胞膜膜电位的影响

采用罗丹明 123 荧光染色法测定膜电位<sup>[20]</sup>。用 MH 肉汤培养基培养 SJ2 至  $OD_{600}$  为 0.3, 加入 128、64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  不同亚抑菌浓度的香芹酚或 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  亚抑菌头孢曲松药物及二者的联合浓度, 对照组不加药物。振荡培养 6 h 后 6 000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 菌体用无菌 PBS 溶液洗涤后重悬于无菌 PBS 溶液中备用。罗丹明 123 使用无菌 PBS 溶液充分溶解后加入至菌液储备液中, 并保证其终浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。于 37 °C 温箱中避光孵育 30 min, 孵育完毕后离心弃上清多余浮料, 菌体再次用无菌 PBS 溶液充分洗净、重悬。最后转移至 96 孔板中, 用酶标仪测定其平均荧光强度。设置激发波长为 480 nm, 发射波长为 530 nm, 该数据用平均荧光强度表示。

#### 1.2.7 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌胞内抗生素蓄积分析

利用高效液相色谱法检测分析 SJ2 菌胞内的抗生素蓄积。取 1 mL 提前培养过夜的 SJ2 菌液稀释到 100 mL 新鲜的 MH 肉汤培养基中, 在 37 °C 条件下生长至  $OD_{600}$  为 0.6; 收集细菌菌体细胞, 用无菌且新鲜的 PBS 定容, 并分装至 1.5 mL 离心管中; 分别加入 32、64、128、256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  不同质量浓度的香芹酚和 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  头孢曲松联合, 将样品在 37 °C、180 r/min 条件下振荡孵育 2 h; 孵育之后, 通过  $13\ 000\times g$  离心 5 min 后得细菌沉淀, 最后在液氮及 65 °C 水浴之间进行 3 个冻融循环得以裂解细菌; 将裂解物以  $13\ 000\times g$  条件离心 5 min 后收集上清液 1; 沉淀重新悬浮于 200  $\mu\text{L}$  甲醇中, 同样离心条件收集上清液 2, 将上清液 1 与上清液 2 混合后再次通过  $13\ 000\times g$  离心 10 min 去除残留

物并收集上清液。液相色谱分离: Phenomenex Gemini C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.6–7.8) 缓冲液: 乙腈 (88:12, 体积比)。流速为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL; 检测波长为 254 nm<sup>[21]</sup>。外标峰面积法, 通过标准曲线计算含量。

### 1.2.8 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌细胞膜完整性的影响

使用 LIVE/DEAD 细菌生存力试剂盒评估香芹酚与头孢曲松联合对 SJ2 菌细胞膜完整性的影响。使用 MH 肉汤培养基培养 SJ2 菌 12 h 后, 6 000r/min 离心 5 min 弃上清液, 菌体用无菌 PBS 溶液洗涤 3 次, 并重悬于 PBS 溶液中, 加入 64 μg/mL 亚抑菌浓度的香芹酚与 512 μg/mL 亚抑菌浓度的头孢曲松联合作用于等量菌液。37 °C 温育 1 h 后, 收集细菌, 洗涤并重悬于 PBS 溶液中。加入 1.5 μL 1.67 mol 的 SYTO9 和 1.5 μL 10 mmol/L 的 PI 充分混合液, 在室温条件下避光孵育 15 min。于荧光显微镜下观察捕获染色细菌图像<sup>[22]</sup>。

### 1.2.9 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌形态结构的影响

用 MH 肉汤培养基培养 SJ2 菌至 OD<sub>600</sub> 为 0.3, 加入亚抑菌浓度的香芹酚和亚抑菌头孢曲松药物的联合浓度, 在 37 °C 条件下培养 12 h 后, 取菌体离心并用无菌 PBS 溶液洗涤后, 加入 2.5% 戊二醛溶液固定菌体, 4 °C 放置 48 h, 然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 遍, 经过 30%、50%、70%、90% 浓度的乙醇进行梯度脱水, 最后用无水乙醇洗脱 3 次, 每次约 5 min。随后室温晾干, 干燥后的样品喷金后在扫描电子显微镜下观察细菌形态<sup>[23]</sup>。

### 1.2.10 数据处理

实验结果数据用 Prism 8.0 进行差异性分析 (*t* 检验), 结果表示为平均值±标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 最小抑菌浓度(MIC)和分级抑制浓度指数(FICI)

通过二倍肉汤稀释法得到香芹酚对 SJ2 菌的 MIC 为 256 μg/mL, 表示香芹酚对 SJ2 菌具有一定的抗菌活性; 头孢曲松对 SJ2 菌的 MIC 为 2 048 μg/mL, 表示 SJ2 菌对头孢曲松高度耐药; 通过棋盘法得到香芹酚联合头孢曲松的 FICI=0.375<0.5, 根据联合抑菌指数判定标准可知香芹酚联合头孢曲松抗 SJ2 菌具有协同作用。

### 2.2 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌生长曲线的抑制作用

如图 1 所示, 单独使用亚抑菌浓度的香芹酚和头孢曲松药物可影响 SJ2 菌的生长, 但抑制作用不显著, 然而使用亚抑菌浓度香芹酚和头孢曲松联合用药可显著抑制 SJ2 菌的生长, 并且随着头孢曲松浓度的增加抑制作用更显著。结果表明香芹酚联合头孢曲松可协同抑制 SJ2 菌的生长。

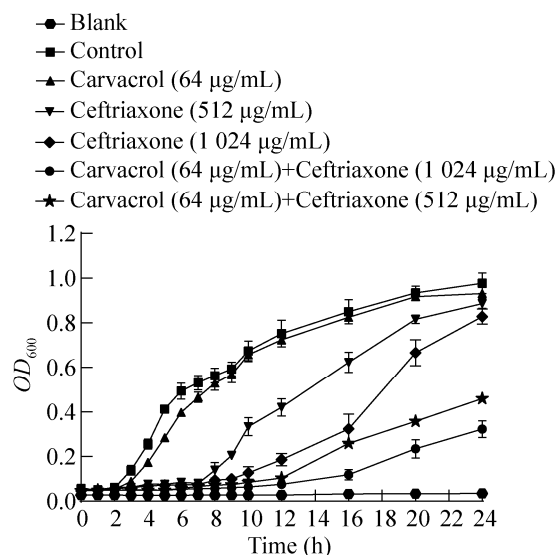


图 1 药物对耐药性沙门氏菌 SJ2 生长的影响  
Figure 1 Effect of drugs on growth curve of drug-resistant *Salmonella* SJ2.

### 2.3 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌碱性磷酸酶泄漏的影响

通过 AKP 试剂盒检测药物作用后 SJ2 菌体内 AKP 泄漏含量, 结果如图 2 所示, 在香芹酚或头孢曲松单用及联合用药时均可导致沙门氏菌体内 AKP 的泄漏, 而且在药物作用 1h 内泄漏显著( $P<0.05$ ), 但联合用药作用更明显。在 1 h 时, 亚抑菌浓度头孢曲松与亚抑菌浓度香芹酚联合作用比单独使用后 AKP 外渗量分别增加( $230\pm 10$ )  $\mu\text{g/mL}$  和( $120\pm 3$ )  $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明香芹酚可协同头孢曲松达到损伤沙门氏菌细胞壁的作用。

### 2.4 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌膜电位的影响结果

亚抑菌浓度头孢曲松单独使用与香芹酚联合使用对 SJ2 菌细胞膜膜电位的影响结果如图 3 所示, 未加入药物的对照组平均荧光强度为 380.9 AU, 而亚抑菌浓度 64  $\mu\text{g/mL}$  香芹酚及 512  $\mu\text{g/mL}$  头孢曲松单独作用 6 h 后, 细胞膜的荧光强度分别为 210.1 AU 和 349.7 AU, 与对照组相比分别降低了( $180.8\pm 2.93$ ) AU ( $P<0.01$ )和( $31.2\pm 5.4$ ) AU ( $P<0.05$ ); 二者药物联用使细菌

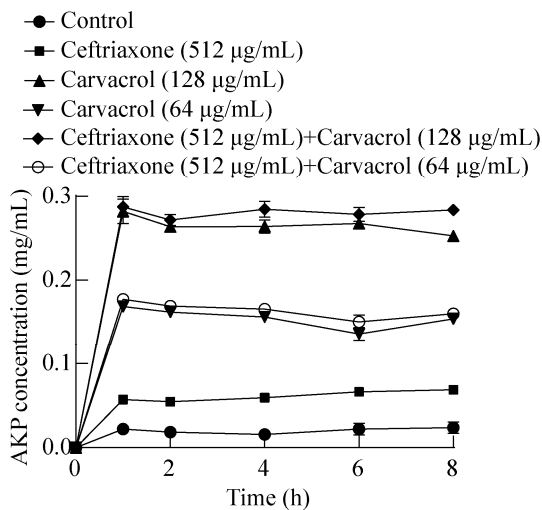


图 2 药物对耐药性沙门氏菌 SJ2 AKP 泄漏的影响  
Figure 2 Effect of drugs on AKP leakage of drug-resistant *Salmonella* SJ2.

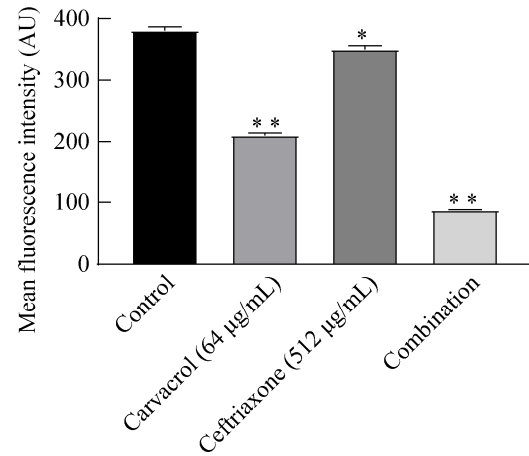


图 3 药物对耐药性沙门氏菌 SJ2 膜电位的影响  
Figure 3 Effect of drugs on membrane potential of drug-resistant *Salmonella* SJ2. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

膜电位降低更显著, 膜电位降至 87.6 AU, 与对照组相比降低了( $293.3\pm 4.2$ ) AU, 具有极显著差异( $P<0.01$ )。结果表明香芹酚可协同头孢曲松达到损伤 SJ2 菌细胞膜膜电位, 从而进一步损伤细胞膜功能。

### 2.5 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌体内抗生素蓄积的影响结果

通过高效液相色谱(HPLC)对细菌体内抗生素蓄积进行定量分析, 结果如图 4 所示, 亚抑菌浓度头孢曲松联合不同质量浓度的香芹酚与其单独使用相比分别增加了( $14.57\pm 0.37$ )、

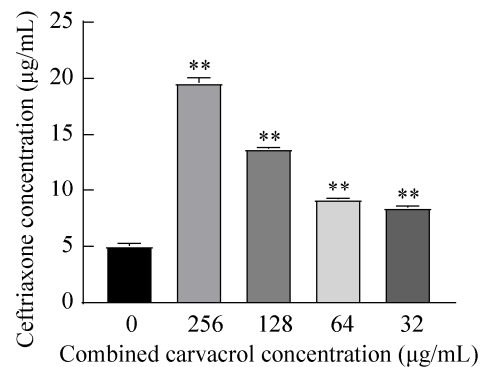


图 4 药物对耐药性沙门氏菌 SJ2 中抗生素蓄积的影响  
Figure 4 Effect of drugs on antibiotic accumulation in drug-resistant *Salmonella* SJ2. \*\*:  $P<0.01$ .

( $8.73 \pm 0.09$ )、( $4.13 \pm 0.06$ )和( $3.42 \pm 0.09$ )  $\mu\text{g/mL}$ , 均显著增加了细菌体内抗生素的蓄积( $P < 0.01$ ); 而且随着联合香芹酚质量浓度的增加, 细菌体内蓄积的头孢曲松质量越多, 即呈现一定的浓度依赖性。该结果表明香芹酚可协同头孢曲松损伤沙门氏菌细胞膜, 进而促进菌体内抗生素的蓄积, 进一步达到协同抗菌效果, 并且香芹酚协同药物浓度与协同效果呈正相关。

## 2.6 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌细菌膜完整性的影响结果

使用 LIVE/DEAD 细菌生存力试剂盒来观察细胞膜完整性。该试剂盒中 SYTO9 与 PI 是检测细胞膜完整性的两种染料: SYTO9 能够进入细胞膜完整的细菌内将细菌染成绿色, 而 PI 不能通过完整的细胞膜, 只有细胞膜损坏时才能够进入细菌内与细胞核内 DNA 结合呈现红色荧光<sup>[24]</sup>, 因此可通过红色或绿色荧光数量判断细菌细胞膜完整性是否破坏。由图 5 可知,

单独使用亚抑菌质量浓度头孢曲松( $512 \mu\text{g/mL}$ ) 时与对照组相比无明显差异, 即被染成红色的死细菌不显著, 说明细菌细胞膜仍完整, 而随着香芹酚联合处理后, 死细菌数量显著, 这证实了两药联用可以显著损坏细菌膜的完整性。

## 2.7 香芹酚联合头孢曲松对 SJ2 菌形态结构的影响结果

通过扫描电镜观察得到药物作用后 SJ2 菌形态结构如图 6 所示, 对照组的细菌饱满光滑, 边缘明显且大小均一, 形态呈现常规杆状, 在亚抑菌浓度香芹酚或头孢曲松单独作用细菌 12 h 后, 可轻微造成少量菌体出现细胞皱缩及菌体形态改变; 但当 2 种药物联用时, 整体细菌严重损伤, 出现细胞壁塌陷、菌体干瘪、细胞碎裂和聚集且已丧失菌体原有杆状形态。结果表明香芹酚可协同头孢曲松达到损伤 SJ2 菌形态的作用, 并且使细菌细胞膜及细胞壁均遭受损伤。

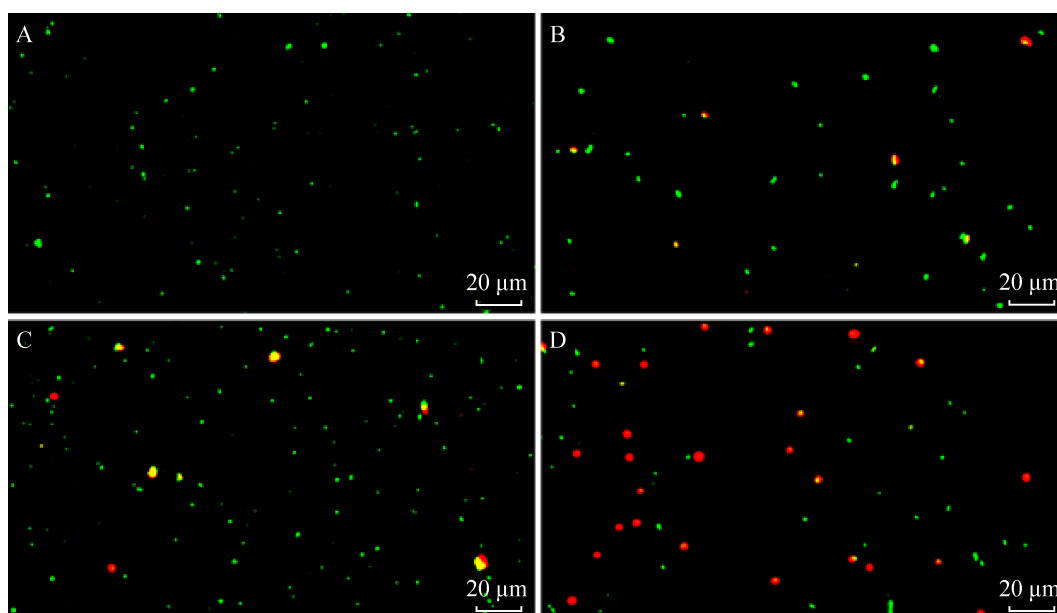


图 5 药物对耐药性沙门氏菌 SJ2 细胞膜完整性的影响 A: 对照组. B: 香芹酚( $64 \mu\text{g/mL}$ )处理组. C: 头孢曲松( $512 \mu\text{g/mL}$ )处理组. D: 两药联合处理组

Figure 5 Effects of drugs on the cell membrane integrity of drug-resistant *Salmonella* SJ2. A: Control group. B: Carvacrol ( $64 \mu\text{g/mL}$ ). C: Ceftriaxone ( $512 \mu\text{g/mL}$ ). D: Combination group.

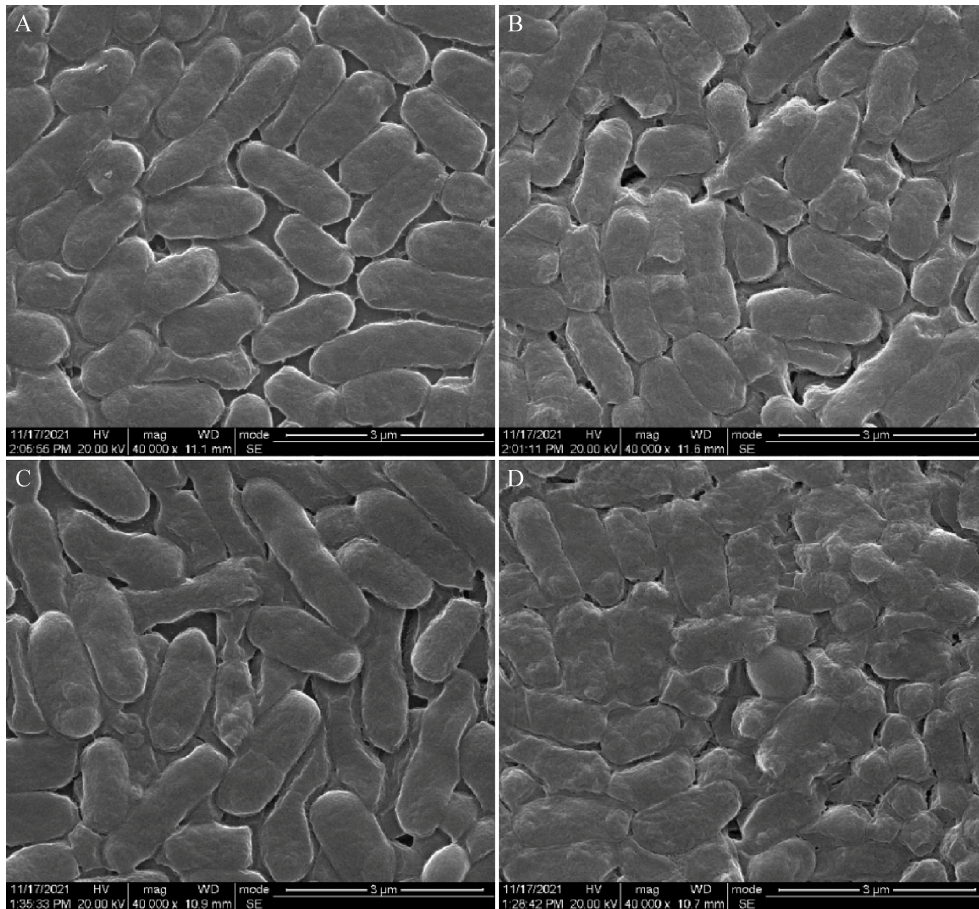


图 6 药物对耐药性沙门氏菌 SJ2 形态结构的影响 A: 对照组. B: 香芹酚(64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理组. C: 头孢曲松(512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理组. D: 两药联合处理组

Figure 6 Effects of drugs on the morphology and structure of drug-resistant *Salmonella* SJ2. A: Control group. B: Carvacrol (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). C: Ceftriaxone (512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). D: Combination group.

### 3 讨论与结论

抗生素是用于治疗细菌感染的常用药物,但随着抗生素的滥用,耐药菌株也越来越多地出现。同时,抗生素的残留和副作用令人堪忧。近年来,随着人们对健康环保意识的增强,中药研究成为国内外学者研究的热点,但是由于中药的抑菌活性比较小、应用成本高、疗效比较慢的缺点,使得其在临床应用中受到了一定的制约。因此,中药与抗菌药物联用防治细菌性疾病开始成为研究的新方向。

本实验首先从 FICI 及生长曲线研究得到

香芹酚与头孢曲松具有协同抗耐药性沙门氏菌 SJ2 的作用。头孢曲松作为第三代头孢类抗生素,对肠杆菌科细菌均具有强大的抗菌活性,其杀菌机制主要通过抑制细菌细胞壁的合成,但由于其滥用及细菌的进化变异,已逐渐使沙门氏菌对其产生耐药。截至目前,已有研究发现香芹酚具有损伤细菌细胞壁、细胞膜的作用,而 SJ2 菌的主要耐药机制体现在改变细胞膜通透性上。因此,本试验进一步着力探究香芹酚和头孢曲松的协同抗菌效果是否主要通过破坏细胞膜、细胞壁来实现。

细胞壁通过提供机械强度来抵抗渗透压



力,对细菌生存至关重要<sup>[25]</sup>。细胞膜作为细菌的组成结构,是菌体与外界进行物质能量交换的重要媒介,可调控物质在细胞内外的进出并维持细胞内的稳定代谢,以此保证细菌正常的生理活动<sup>[26]</sup>。AKP 存在于细胞壁与细胞膜之间,正常情况下在胞外无法检测到,但当细胞壁遭到破坏时,菌体通透性增加后便泄漏至细胞外<sup>[27]</sup>。实验结果显示,药物作用 1 h 内 AKP 显著泄漏到细胞外,且两药联用检测到 AKP 含量明显多于单用组和空白组。说明两药联用能协同破坏细菌细胞壁,使菌体细胞壁通透性增加。

罗丹明 123 是一种亲脂性阳离子染料,凭借跨膜电位进入到细胞基质中,通过荧光强度变化反映膜电位的变化<sup>[28]</sup>。在正常的细菌体内,通常膜内的电压比膜外低,当细胞膜膜电位降低时,说明细胞膜出现去极化现象,反之,升高则说明细胞膜发生超极化现象<sup>[29]</sup>。膜电位结果显示,两药联用相比单个用药,更加显著地降低细胞膜膜电位,使细胞膜出现去极化现象,由此说明药物可通过此机制来影响细菌生长代谢,最终导致细菌死亡。

对于革兰氏阴性病原体,细胞内抗生素的充分积累是抗菌活性的先决条件<sup>[30]</sup>。利用高效液相色谱检测细菌体内抗生素的蓄积结果显示,两药联合使用可显著增加菌体内抗生素的蓄积,且其胞内抗生素蓄积量与协同的香芹酚浓度呈现正相关,说明两药联合使用可显著损伤细胞膜,由此使得能进入细菌体内的抗生素蓄积量增多。使用 LIVE/DEAD 细菌生存力试剂盒发现两药联合使用时,能被染成红色的细菌量更多,以此说明细胞膜损伤更严重,这与抗生素蓄积试验结果相符。进一步通过扫描电镜的结果得知,两药联用相比单个用药更显著地损伤菌体的细胞壁、细胞膜,并使菌体出现

断裂、破碎。这与黄梅等研究双氢青蒿素联合头孢呋辛抗大肠杆菌的结果一致<sup>[31]</sup>。

综上所述,香芹酚联合头孢曲松具有协同抗 SJ2 菌的作用,其协同机制可通过损伤细胞壁、细胞膜从而发挥抑制和杀伤 SJ2 菌的作用。该研究结果可为进一步利用中药香芹酚和解决目前细菌耐药现状提供思路。

## REFERENCES

- [1] 王胜启, 李爱华, 秦东春. 沙门菌感染机制及其检测技术的研究进展[J]. 口岸卫生控制, 2014, 19(5): 47-54  
WANG SQ, LI AH, QIN DC. Progress in the *Salmonella* infection mechanism and its detection technology[J]. Port Health Control, 2014, 19(5): 47-54 (in Chinese).
- [2] LAROCK DL, CHAUDHARY A, MILLER SI. *Salmonellae* interactions with host processes[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(4): 191-205.
- [3] PEGUES DA. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*[J]. Principles and practice of infectious diseases, 2005: 2636-2654.
- [4] CANIÇA M, MANAGEIRO V, ABRIOUEL H, MORAN-GILAD J, FRANZ CMAP. Antibiotic resistance in foodborne bacteria[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 84: 41-44.
- [5] CASTRO-VARGAS RE, HERRERA-SÁNCHEZ MP, RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ R, RONDÓN-BARRAGÁN IS. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: a global overview[J]. Veterinary World, 2020, 13(10): 2070-2084.
- [6] KARKEY A, THWAITES GE, BAKER S. The evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella typhi*[J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2018, 34(1): 25-30.
- [7] LING ML, GOH KT, WANG GCY, NEO KS, CHUA T. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium, DT104L linked to dried anchovy in Singapore[J]. Epidemiology and Infection, 2002, 128(1): 1-5.
- [8] HU WS, CHEN HW, ZHANG RY, HUANG CY, SHEN CF. The expression levels of outer membrane proteins STM1530 and OmpD, which are influenced by the CpxAR and BaeSR two-component systems, play important roles in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(8): 3829-3837.
- [9] GE HW, WANG YZ, ZHAO XH. Research on the drug

- resistance mechanism of foodborne pathogens[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 162: 105306.
- [10] LAMBERT RJ, SKANDAMIS PN, COOTE PJ, NYCHAS GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(3): 453-462.
- [11] de SOUZA G, dos SANTOS RADAI JA, MATTOS VAZ MS, ESTHER da SILVA K, FRAGA TL, BARBOSA LS, SIMIONATTO S. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity assays of carvacrol: a candidate for development of innovative treatments against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2021, 16(2): e0246003.
- [12] AIT-OUAZZOU A, ESPINA L, GELAW TK, de LAMOCASSELLVÍ S, PAGÁN R, GARCÍA-GONZALO D. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(1): 173-185.
- [13] POL IE, SMID EJ. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 29(3): 166-170
- [14] CHOI JG, KANG OH, LEE YS, OH YC, CHAE HS, JANG HJ, SHIN DW, KWON DY. Antibacterial activity of methyl gallate isolated from *Galla Rhois* or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2009, 14(5): 1773-1780.
- [15] 鲁茹, 陆桂玉, 林浙哲, 郑洪杰, 程东庆. 增强耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抗生素敏感性的中药筛选[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2018, 20(12): 2217-2223.
- LU R, LU GY, LIN ZZ, ZHENG HJ, CHENG DQ. Screening of traditional Chinese medicine that enhance the sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to antibiotic[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2018, 20(12): 2217-2223 (in Chinese).
- [16] 邹丹, 谢鲲鹏, 王海婷, 陈禹先, 谢明杰. 鹰嘴豆芽素 A 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌外排系统的抑制作用[J]. *微生物学报*, 2014, 54(10): 1204-1211.
- ZOU D, XIE KP, WANG HT, CHEN YX, XIE MJ. Inhibitory effects of biochanin A on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(10): 1204-1211 (in Chinese).
- [17] BHATTAMISRA SK, KUEAN CH, CHIEH LB, YAN VLY, LEE CK, HOOI LP, SHYAN LP, LIEW YK, CANDASAMY M, SAHU PS. Antibacterial activity of geraniol in combination with standard antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*[J]. *Natural Product Communications*, 2018, 13(7): 1934578X1801300.
- [18] 黄梅, 沈建英, 杜成成, 尹婷, 戈方济, 谭余庆, 罗俊. 青蒿素及其衍生物的抗菌活性初步研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(9): 1946-1952.
- HUANG M, SHEN JY, DU CC, YIN T, GE FJ, TAN YQ, LUO J. Preliminary study on antibacterial activity of artemisinin and its derivatives[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(9): 1946-1952 (in Chinese).
- [19] HE N, WANG PQ, WANG PY, MA CY, KANG WY. Antibacterial mechanism of chelerythrine isolated from root of *Toddalia asiatica* (Linn) Lam[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 18(1): 261.
- [20] 刘雪, 王静楠, 陈文学, 陈荣豪, 张观飞. 柠檬烯对铜绿假单胞菌的抑菌活性及其机理[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(7): 1-5.
- LIU X, WANG JN, CHEN WX, CHEN RH, ZHANG GF. Antibacterial activity and mechanism of limonene against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(7): 1-5 (in Chinese).
- [21] 丁奇, 王建凤, 冯月超, 吴赞, 马立利, 刘佳, 王颖, 贾丽, 高丽娟, 邵鹏. 高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肠道内容物中 32 种抗生素残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1141-1149.
- DING Q, WANG JF, FENG YC, WU Z, MA LL, LIU J, WANG Y, JIA L, GAO LJ, SHAO P. Determination of 32 kinds of antibiotic residues in fish intestinal content by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(4): 1141-1149 (in Chinese).
- [22] SONG MR, LIU Y, HUANG XY, DING SY, WANG Y, SHEN JZ, ZHU K. A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(8): 1040-1050.
- [23] 陈颖慧. 紫甘蓝提取物对食源性致病菌的抑菌作用[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(17): 31-34.
- CHEN YH. Bacteriostatic effect of purple cabbage extract to foodborne pathogenic bacteria[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(17): 31-34 (in Chinese).
- [24] 尚德静, 赵蕾, 王野, 姜凤全. 含色氨酸系列抗菌肽对多药耐药粪肠球菌的抗菌作用[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 44(3): 353-364.

- SHANG DJ, ZHAO L, WANG Y, JIANG FQ. Bactericidal mechanism of tryptophan-containing antimicrobial peptides against multiple-drug resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Journal of Liaoning Normal University: Natural Science Edition, 2021, 44(3): 353-364 (in Chinese).
- [25] SIBINELLI-SOUSA S, HESPANHOL JT, BAYER-SANTOS E. Targeting the Achilles' heel of bacteria: different mechanisms to break down the peptidoglycan cell wall during bacterial warfare[J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203(7): e00478-e00420.
- [26] CASAPAO AM, LODISE TP, DAVIS SL, CLAEYS KC, KULLAR R, LEVINE DP, RYBAK MJ. Association between vancomycin day 1 exposure profile and outcomes among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infective endocarditis[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(6): 2978-2985.
- [27] 王永刚, 杨光瑞, 陈凯, 王鸣刚, 冷非凡, 杨明俊, 田艳花. 内生真菌链格孢菌醋酸乙酯提取物对金黄色葡萄球菌抑菌机制的研究[J]. 中草药, 2018, 49(3): 619-625.
- WANG YG, YANG GR, CHEN K, WANG MG, LENG FF, YANG MJ, TIAN YH. Antibacterial mechanisms of ethyl acetate extract from endophytic fungi *Alternaria alternata* against *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(3): 619-625 (in Chinese).
- [28] 张赟彬, 刘笑宇, 姜萍萍, 李维迪, 王一非. 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.
- ZHANG YB, LIU XY, JIANG PP, LI WD, WANG YF. Mechanism and antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(5): 31-35, 11 (in Chinese).
- [29] 乔支红, 程永强, 鲁战会, 管立军, 李里特. 乳酸对三种食源性致病菌的抑菌及杀菌作用[J]. 食品科技, 2008, 33(10): 187-191.
- QIAO ZH, CHENG YQ, LU ZH, GUAN LJ, LI LT. Antibacterial and bactericide activity of lactic acid against three strains of food-borne pathogenic bacteria[J]. Food Science and Technology, 2008, 33(10): 187-191 (in Chinese).
- [30] RICHTER MF, DROWN BS, RILEY AP, GARCIA A, SHIRAI T, SVEC RL, HERGENROTHER PJ. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic[J]. Nature, 2017, 545(7654): 299-304.
- [31] 黄梅, 罗俊, 沈建英. 双氢青蒿素与头孢呋辛对大肠杆菌的协同抗菌作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2975-2981.
- HUANG M, LUO J, SHEN JY. Synergistic antibacterial effect and mechanisms of dihydroartemisinin and cefuroxime in combination[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(12): 2975-2981 (in Chinese).