

赤芍活性成分联合应用对粪肠球菌的抑制作用及其机制

张加妮, 赛杰, 周玉, 杨森, 孙淑芬
(吉林大学口腔医院牙体牙髓科, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨赤芍活性成分芍药苷 (PF)、原花青素 (PC) 和绿原酸 (CA), 联合应用对粪肠球菌 (*E. faecalis*) 及生物膜的抑制作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 采用微量稀释法检测 CA、PC 和 PF 对 *E. faecalis* 的最小抑菌浓度 (MIC) 及最小杀菌浓度 (MBC), 棋盘稀释法检测赤芍 3 种活性成分联合应用部分抑菌浓度指数 (FICI) 和部分杀菌浓度指数 (FBCI)。实验分为对照组、高浓度单药组 (PF-10 组、PC-6 组和 CA-10 组) 及药物联合应用组 (CA-2+PC-1 组、CA-2+PC-2 组、PF-4+PC-2 组、PF-6+PC-2 组、PF-4+CA-4 组和 PF-6+CA-4 组)。结晶紫染色检测 3 种活性成分联合应用各组 *E. faecalis* 生物膜形成情况, 扫描电镜 (SEM) 观察赤芍 3 种活性成分联合应用各组 *E. faecalis* 生物膜形态表现, 点板试验检测赤芍 3 种活性成分联合应用对各组 *E. faecalis* 浮游菌和生物膜的抑制作用, SEM 观察赤芍 3 种活性成分联合应用各组 *E. faecalis* 胞膜损伤情况, 试剂盒检测赤芍 3 种活性成分联合应用各组 *E. faecalis* 浮游菌和生物膜中腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 水平。**结果:** 赤芍 3 种活性成分中 PC 的 MIC 为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC 为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; CA 的 MIC 为 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC 为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; PF 的 MIC 和 MBC 均 $> 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 选取 PF 浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。PC 与 CA 联合应用具有协同作用, PC 与 PF 联合应用具有相加作用, CA 与 PF 联合应用具有相加作用。结晶紫染色, 与对照组比较, PF-10 组、PC-6 组、CA-10 组和各药物联合应用组 *E. faecalis* 生物膜形成量均明显降低 ($P < 0.01$); 与 PF-10 组比较, PC-6 组、CA-10 组、CA-2+PC-1 组、CA-2+PC-2 组、PF-4+PC-2 组、PF-6+PC-2 组和 PF-6+CA-4 组 *E. faecalis* 生物膜形成量均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。扫描电镜观察, 对照组 *E. faecalis* 生物膜较厚, 细菌之间紧密连接, 形态规则, 且细胞膜完整; PF-10 组、PC-6 组和 CA-10 组 *E. faecalis* 生物膜厚度明显降低, 细菌间的排列变得相对疏松; 各药物联合应用组可见 *E. faecalis* 生物膜均明显减少乃至完全消失, 高倍镜下可见生物膜结构完全消失, 细菌碎片相互黏附聚集, 失去原有的细菌形态。点板试验, 与对照组比较, 作用 5、10 和 30 min 后 PF-10 组、PC-6 组及 CA-10 组 *E. faecalis* 浮游菌菌落明显减少, 提示其对 *E. faecalis* 的杀伤作用逐渐增强; 各药物联合应用组中, PC 与 CA 联合应用在 5 min 内可见 *E. faecalis* 浮游菌菌落明显减少, 对 *E. faecalis* 浮游菌菌落的杀伤作用较强。与 PC 组和 CA 组比较, 作用 5、10 和 30 min 后各药物联合应用组 *E. faecalis* 浮游菌菌落未见明显减少; 与对照组比较, 作用 30 和 60 min 后 PF-10 组、PC-6 组及 CA-10 组 *E. faecalis* 生物膜菌落逐渐减少, 提示高浓度单药组对 *E. faecalis* 生物膜中细菌表现出逐渐增强的杀伤作用。其中 PC-6 组生物膜杀伤效果最为明显, 在处理 30 min 后未见菌落形成; 在各药物联合应用组中, 作用 30 min 后 CA-2+PC-2 组 *E. faecalis* 生物膜仅见少许菌落, 提示其可有效杀伤生物膜中的细菌; 与 PC-6 组和 CA-10 组比较, 各药物联合应用组在低浓度即可达到高浓度单药组的杀伤效果。扫描电镜观察, 对照组 *E. faecalis* 呈椭圆形, 且细胞膜完整; PF 组 *E. faecalis* 形态改变, 细胞膜完整性受损; CA 组大部分 *E. faecalis* 细胞膜相对完整, 但 *E. faecalis* 表面出现皱缩和凹陷现象, 少数 *E. faecalis* 细胞膜完整性遭到破坏; PC 组 *E. faecalis* 细胞膜

[收稿日期] 2024-10-21 [录用日期] 2024-12-15

[基金项目] 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目 (JJKH20190092KJ)

[作者简介] 张加妮 (1993—), 女, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事牙体牙髓疾病方面的研究。

[通信作者] 孙淑芬, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: gwzssf@163.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

的完整性破坏最为严重, 导致内容物外泄, 细胞碎片相互聚集形成絮状结构; 各药物联合应用组 *E. faecalis* 细胞膜破裂、内容物外泄和细菌残片聚集, 尤其是 PC 与 CA 联合应用时, 可观察到 *E. faecalis* 细胞膜的完整性破坏最为明显, 内容物完全外泄; PF 与 CA 联合应用时, 可观察到细菌表面凹坑和皱缩, 偶见细胞膜破裂。试剂盒检测, 与对照组比较, 各组 *E. faecalis* 浮游菌及生物膜中 ATP 水平均明显降低 ($P < 0.01$); 与 PF-10 组比较, CA-10 组、CA-2+PC-2 组、PF-4+CA-4 组和 PF-6+CA-4 组 *E. faecalis* 浮游菌中 ATP 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), CA-10 组和 CA-2+PC-2 组 *E. faecalis* 生物膜中 ATP 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 赤芍活性成分 PF、PC 和 CA 联合应用对 *E. faecalis* 及生物膜形成具有明显抑制作用, 3 种活性成分两两联合应用均有一定的协同或相加作用, 其中 PC 与 CA 联合应用协同作用最为明显, 作用机制可能与破坏 *E. faecalis* 胞膜完整性和抑制细菌中 ATP 水平有关。

[关键词] 赤芍活性成分; 粪肠球菌; 绿原酸; 原花青素; 芍药苷

[中图分类号] R378.12 [文献标志码] A

Inhibitory effect of combined application of active components of *Paeoniae Rubra Radix* on *Enterococcus faecalis* and its mechanism

ZHANG Jiani, SAI Jie, ZHOU Yu, YANG Miao, SUN Shufen

(Department of Endodontics, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the inhibitory effects of combined application of chlorogenic acid (CA), procyanidin (PC), and paeoniflorin (PF), the active components of *Paeoniae Radix Rubra*, on *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and its biofilm, and to clarify the mechanism. **Methods:** The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of CA, PC, and PF against *E. faecalis* were detected by microdilution method; the fractional inhibitory concentration index (FICI) and fractional bactericidal concentration index (FBCI) of the three active components of *Paeoniae Radix Rubra* in combination were detected by checkerboard dilution method. The experiment was divided into control group, high concentration of single-drug groups (PF-10 group, PC-6 group, and CA-10 group), and drug combination groups (CA-2+PC-1 group, CA-2+PC-2 group, PF-4+PC-2 group, PF-6+PC-2 group, PF-4+CA-4 group, and PF-6+CA-4 group). Crystal violet staining was used to detect the biofilm formation of *E. faecalis* in various groups after treated with three active components in combination; scanning electron microscope (SEM) was used to observe the morphology of *E. faecalis* biofilm in various groups after treated with three active components in combination; spot assay was used to detect the inhibitory effects of three active components in combination on *E. faecalis* planktonic bacteria and biofilm in various groups; SEM was used to observe the damage to *E. faecalis* cell membrane in various groups after treated with three active components in combination; kit was used to detect the adenosine triphosphate (ATP) levels in *E. faecalis* planktonic bacteria and biofilm in various groups after treated with three active components in combination. **Results:** Among the three active components of *Paeoniae Radix Rubra*, the MIC of PC was $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the MBC was $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; the MIC of CA was $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the MBC was $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; the MIC and MBC of PF were both $> 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, and the concentration of PF was selected as $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. The combination of PC and CA showed synergistic effects, the combination of PC and PF showed additive effects, and the combination of CA and PF showed additive effects. The crystal violet staining results showed that compared with control group, the biofilm formations of *E. faecalis* in PF-10 group, PC-6 group, CA-10 group, and drug combination groups were significantly decreased

($P<0.05$); compared with PF-10 group, the biofilm formations of *E.faecalis* in PC-6 group, CA-10 group, CA-2+PC-1 group, CA-2+PC-2 group, PF-4+PC-2 group, PF-6+PC-2 group, and PF-6+CA-4 group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The SEM results showed that in control group, the *E.faecalis* biofilm was thick, with tightly connected bacteria, regular morphology, and intact cell membranes; in PF-10 group, PC-6 group, and CA-10 group, the thickness of *E.faecalis* biofilm was significantly reduced, and the arrangement of bacteria became relatively loose; in all drug combination groups, the *E.faecalis* biofilm was significantly reduced or even completely disappeared, and under high magnification, the biofilm structure was completely absent, with bacterial fragments adhering and aggregating, losing their original bacterial morphology. The spot assay results showed that compared with control group, the colonies of *E.faecalis* planktonic bacteria in PF-10 group, PC-6 group, and CA-10 group were significantly reduced after treated for 5, 10, and 30 min, indicating gradually enhanced bactericidal effects; among drug combination groups, the combination of CA and PC significantly reduced the colonies of *E.faecalis* planktonic bacteria within 5 min, showing strong bactericidal effects. Compared with CA group and PC group, the colonies of *E.faecalis* planktonic bacteria in all drug combination groups showed no significant reduction after treated for 5, 10, and 30 min; compared with control group, the colonies of *E.faecalis* biofilm in PF-10 group, PC-6 group, and CA-10 group were gradually decreased after the treated for 30 and 60 min, suggesting that the high concentration of single-drug groups exhibited gradually enhanced bactericidal effects on *E.faecalis* in biofilm. Among them, the biofilm-killing effect of PC-6 group was the most significant, with no colony formation observed after treated for 30 min; in drug combination groups, only a few colonies of *E.faecalis* biofilm were observed in CA-2+PC-2 group after treated for 30 min, indicating effective killing of bacteria in biofilm; compared with PC-6 group and CA-10 group, all drug combination groups achieved the bactericidal effects of high concentration of single-drug groups at low concentrations. The SEM results showed that in control group, *E.faecalis* exhibited an oval shape with intact cell membranes; in PF group, bacterial morphology was altered, and cell membrane integrity was damaged; in CA group, most bacterial cell membranes remained relatively intact, but the bacterial surface showed shrinkage and depression, with a few bacteria exhibiting disrupted cell membrane integrity; in PC group, the integrity of bacterial cell membranes was most severely damaged, leading to leakage of cellular contents and aggregation of cell fragments into flocculent structures; in all drug combination groups, *E.faecalis* exhibited ruptured cell membranes, leakage of contents, and aggregation of bacterial debris, especially in the combination of CA and PC, where the most severe disruption of bacterial cell membrane integrity and complete leakage of contents were observed; in the combination of PF and CA, bacterial surface pits and shrinkage were observed, with occasional cell membrane rupture. The kit results showed that compared with control group, the ATP levels in *E.faecalis* planktonic bacteria and biofilm in various groups were significantly decreased ($P<0.01$); compared with PF-10 group, the ATP levels in *E.faecalis* planktonic bacteria in CA-10 group, CA-2+PC-2 group, PF-4+CA-4 group, and PF-6+CA-4 group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the ATP levels in *E.faecalis* biofilm in CA-10 group and CA-2+PC-2 group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** The combined application of PF, PC, and CA, the active components of *Paeoniae Radix Rubra*, exhibits significant inhibitory effects on *E. faecalis* and its biofilm formation. The pairwise combinations of three active components show synergistic or additive effects, with the combination of CA and PC demonstrating the most significant synergistic effect. The underlying mechanism may be related to the disruption of *E. faecalis* cell membrane integrity and inhibition of bacterial ATP levels.

KEYWORDS Active components of *Paeoniae Radix Rubra*; *Enterococcus faecalis*; Chlorogenic acid; Procyanidin; Paeoniflorin

牙髓炎和根尖周炎是与根管内病原微生物感染密切相关的炎症性疾病。目前临床上主要治疗方法是根管治疗, 而根管治疗的成功率约为80%^[1]。在引发根尖持续感染的细菌中, 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)是主要代表菌, *E. faecalis*是一种革兰阳性兼性厌氧菌, 该菌对根管常用消毒药物具有高耐药性, 并且可耐高温、干燥和饥饿及强碱性环境, 在根管再治疗病例中检出率高达90%^[2-3]。*E. faecalis*以生物膜形式存在, 能够产生多种毒力因子, 如表面黏附素和明胶酶, 相关因子促进细菌的黏附、定植、生物膜形成和组织损伤^[4-5]。多数抗生素难以有效阻止和根除其生物膜形成^[6]。因此, 从根管系统中消除*E. faecalis*并探索新型抗*E. faecalis*药物对于提高根管治疗的成功率至关重要。

次氯酸钠(sodium hypochlorite, NaOCl)是根管治疗中的常用冲洗剂, 但高浓度NaOCl可能损害牙根尖周组织, 导致炎症和疼痛, 并侵蚀牙本质, 降低牙齿机械性能^[7]。氯己定(chlorhexidine, CHX)具有广谱杀菌活性, 但无法溶解牙髓组织, 可能引起牙齿变色和过敏等不良反应^[8]。因此, 研究安全有效的抗菌药物是口腔医学的重要任务。目前, 25%的现代药物来源于植物, 相关药材活性成分被视为合成药物更安全和更健康的替代品。赤芍作为吉林的道地药材, 具备良好的抗菌潜能。研究^[9-11]显示: 赤芍对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和牙龈卟啉单胞菌等均具有抑制作用。赤芍活性成分包括芍药苷(paeoniflorin, PF)、原花青素(proanthocyanidins, PC)和绿原酸(chlorogenic acid, CA)。其中PF对多种病原微生物表现出明显的抑制作用, 尤其针对大肠杆菌和白色念珠菌等具有明显效果^[12]。CA是一种活性多酚, 具有强大的杀菌能力和龋齿细菌及抗牙周炎致病菌的功效^[13]。PC具有广泛的抗菌性能, 不仅对龋齿细菌具有显著的抑制作用, 且对病毒同样有效^[14-15]。YANG等^[16]发现: PC能够杀死生物膜内的*E. faecalis*, 并增强牙本质胶原基质的生物稳定性, 但其具体作用机制尚未完全阐明。并且PF、PC和CA联合应用是否对*E. faecalis*具有协同抑菌效果国内外尚未见报道。因此, 本研究探讨赤芍活性成分PF、PC和CA两两联合应用对*E. faecalis*浮游菌及生物膜的协同抑菌作用, 并阐明其作用机制, 为开发更有效的化学冲洗剂提供科

学依据。

1 材料与方法

1.1 细菌、药物、主要试剂和仪器 *E. faecalis* ATCC29212(中国科学院)。CA、PC和PF(上海麦克林生化科技有限公司)。脑心浸液肉汤(brain-heart infusion broth, BHI)和琼脂粉(青岛海博生物技术有限公司), 含1%蔗糖脑心浸出液培养基(brain-heart infusion broth with 1% sucrose, BHIS), 结晶紫(北京索莱宝科技有限公司), BacTiter-Lumi™发光法微生物细胞活力检测试剂盒(BTL试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司), 其他试剂均购自上海麦克林生化科技有限公司。多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司), 高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂), 水浴箱(上海精宏实验室设备有限公司), 恒温培养箱(美国Thermo公司)。

1.2 细菌复苏及培养 本研究采用*E. faecalis* ATCC 29212标准菌株。菌株由-80℃冰箱取出后, 于超净工作台内加入10 mL灭菌BHI液体培养基中混匀。使用无菌接种环取样, 接种至固体BHI琼脂培养基, 37℃培养24 h形成菌落。随后, 挑取单个菌落接种至新无菌BHI液体培养基, 同样条件培养24 h制备菌液。将菌液培养至对数生长期, 作为菌液配制使用。

1.3 微孔板稀释法检测赤芍3种活性成分对*E. faecalis*的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC) 配制2倍浓度的BHI培养基, 加入菌液使菌液浓度为 2×10^6 CFU·mL⁻¹。分别配制2倍浓度的活性成分备用液, PF浓度为4、8、12、16和20 g·L⁻¹, CA浓度为4、8、12、16和20 g·L⁻¹, PC浓度为2、4、8和12 g·L⁻¹。于96孔细胞培养板中加入菌液和药物各100 μL, 使菌液终浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹, PF终浓度为2、4、6、8和10 g·L⁻¹; CA终浓度为2、4、6、8和10 g·L⁻¹; PC终浓度为1、2、4和6 g·L⁻¹, 阴性对照为磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)和菌液各100 μL。37℃孵育24 h后观察, 96孔细胞培养板中清亮无混浊的最低药物浓度即为单独用药的MIC。从清亮微孔吸取10 μL菌液滴在BHI琼脂上, 37℃培养24 h, 无菌落生长的最低药物浓度即为单独用药的MBC。

1.4 棋盘稀释法检测赤芍3种活性成分联合应用部分抑菌浓度指数(fractional inhibitory concentration index, FICI)和部分杀菌浓度指数(fractional bactericidal concentration index, FBCI)

配制2倍浓度的BHI培养基,加入菌液使浓度为 2×10^6 CFU·mL⁻¹。分别配制4倍浓度的活性成分备用液,PF浓度为8、16、24、32和40 g·L⁻¹,CA浓度为8、16、24、32和40 g·L⁻¹,PC浓度为4、8、16和24 g·L⁻¹。96孔细胞培养板中加入100 μL菌液及3种活性成分中2种各50 μL,使菌液终浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹,PF终浓度为2、4、6、8和10 g·L⁻¹,CA终浓度为2、4、6、8和10 g·L⁻¹,PC终浓度为1、2、4和6 g·L⁻¹,阴性对照为PBS缓冲液和菌液。37℃孵育24 h。选取清亮无混浊孔(即联合用药MIC)计算FICI,清亮无混浊孔中吸取10 μL菌液滴在BHI琼脂上,37℃下培养24 h无菌落生长孔(即联合用药MBC)计算FBCI。其计算公式^[17-18]如下:

FICI=(A种药物联合用药的MIC/A种药物单独用药的MIC)+(B种药物联合用药的MIC/B种药物单独用药的MIC); FBCI=(A种药物联合用药的MBC/A种药物单独用药的MBC)+(B种药物联合用药的MBC/B种药物单独用药的MBC)。

A代表CA、PC和PF中的任一成分,B指代除A外的2种成分中的1种,三者两两联合进行检测。协同作用为 $FICI \leq 0.5$,相加作用为 $0.5 < FICI \leq 1.0$,不相干作用为 $1.0 < FICI \leq 2.0$,拮抗作用为 $FICI \geq 2$ ^[19]。

后续分组采用了单药时的MBC值作为阳性对照,分别为PF-10、PC-6和CA-10,联合应用采用FICI低值孔或FBCI低值孔作为实验组,分别为CA-2+PC-1、CA-2+PC-2、PF-4+PC-2、PF-6+PC-2、PF-4+CA-4和PF-6+CA-4。

1.5 实验分组 药物联合效应检测分组为基于“1.4”结果的联合用药MIC和联合用药MBC值,药物联合应用组为CA-2+PC-1组(2 g·L⁻¹ CA+1 g·L⁻¹ PC)、CA-2+PC-2组(2 g·L⁻¹ CA+2 g·L⁻¹ PC)、PF-4+PC-2组(4 g·L⁻¹ PF+2 g·L⁻¹ PC)、PF-6+PC-2组(6 g·L⁻¹ PF+2 g·L⁻¹ PC)、PF-4+CA-4组(4 g·L⁻¹ PF+4 g·L⁻¹ CA)和PF-6+CA-4组(6 g·L⁻¹ PF+4 g·L⁻¹ CA)组。选取高浓度单药组,即基于“1.3”结果的PF-10组(10 g·L⁻¹ PF)、PC-6组(6 g·L⁻¹

PC)和CA-10组(10 g·L⁻¹ CA)作为阳性对照组,阴性对照组(对照组)为PBS缓冲液和菌液。

1.6 结晶紫染色检测赤芍3种活性成分联合应用各组E. faecalis生物膜形成情况 配制2倍浓度BHIS培养基,加入菌液使菌液浓度为 2×10^6 CFU·mL⁻¹。依照“1.5”分组对应的浓度,配制2倍的药液。于24孔细胞培养板中加入500 μL BHIS菌液和500 μL对应药液,即可获取菌液浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹,含目标浓度药物的BHIS。各组37℃下培养24 h,甲醇固定15 min,0.1%结晶紫(V/W)染色5 min,PBS缓冲液漂洗,无水乙醇溶解结晶紫,采用酶标仪于波长595 nm处测定吸光度(A)值,代表生物膜形成量。

1.7 扫描电镜观察赤芍3种活性成分联合应用各组E. faecalis生物膜形态表现 配制2倍浓度BHIS培养基,加入菌液使菌液浓度为 2×10^6 CFU·mL⁻¹。依照“1.5”分组对应的浓度,配制2倍的药液。无菌玻片置于24孔细胞培养板中,加入500 μL BHIS菌液及500 μL对应药液,即可获取菌液浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹,含目标浓度药物的BHIS。于37℃环境下培养24 h后吸出每孔中的液体,2.5%戊二醛固定24 h,梯度(25%、50%、75%、95%和无水乙醇)脱水、干燥和喷金,扫描电镜下观察各组E. faecalis生物膜形态表现。

1.8 点板试验检测赤芍3种活性成分联合应用对E. faecalis浮游菌和生物膜中菌落生长情况 实验分组同“1.5”。E. faecalis浮游菌中菌落生长情况检测:配制2倍浓度BHI培养基,加入菌液使菌液浓度为 2×10^6 CFU·mL⁻¹。依照“1.5”分组对应的浓度,配制2倍的药液。96孔细胞培养板加入50 μL菌液和50 μL药物,于37℃条件下处理1、5和10 min后,取10 μL菌液于BHI琼脂上点板,37℃培养24 h后观察菌落生长情况。生物膜中菌落生长情况检测:96孔细胞培养板加入菌液浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹ BHIS菌液,37℃培养24 h以形成1日龄E. faecalis生物膜。吸除原培养液,在生物膜中加入50 μL 2倍浓度BHI培养基和50 μL 2倍浓度的“1.5”中对应浓度药物处理15和30 min后,加入PBS缓冲液,充分刮取和离散生物膜,梯度稀释 1×10^4 倍后,取10 μL稀释菌液于BHI琼脂上点板,37℃下培养24 h后观察菌落生长情况,生长菌落即为未被杀伤的存活细菌,菌落越稀疏代表药物杀伤效果越强。

1.9 扫描电镜观察赤芍3种活性成分联合应用各组 *E. faecalis* 细菌胞膜损伤情况 实验分组同“1.5”。配制2倍浓度BHI培养基, 加入菌液使菌液浓度为 2×10^6 CFU·mL⁻¹。依照“1.5”分组对应的浓度, 配制2倍浓度的药液。10 mL离心管中加入5 mL菌液和5 mL药液, 37 °C下培养15和30 min。吸取10 μL至玻片上晾干, 2.5%戊二醛固定24 h, 梯度(25%、50%、75%、95%和无水乙醇)脱水、干燥和喷金。扫描电镜下观察各组 *E. faecalis* 形态表现。

1.10 试剂盒检测赤芍3种活性成分联合应用各组 *E. faecalis* 浮游菌和生物膜中腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)水平 参照BTL试剂盒说明书操作, 实验分组同“1.5”。配制2倍浓度BHI培养基, 加入菌液使菌液浓度为 2×10^6 CFU·mL⁻¹。依照“1.5”分组对应的浓度, 配制2倍浓度的药液。使50 μL菌液与50 μL药液共培养于96孔细胞培养板中, 37 °C下培养1 h。每孔加入100 μL BTL, 避光孵育20 min, 采用多功能酶标仪以化学发光法检测浮游菌中ATP水平。

96孔细胞培养板中加入菌液浓度为 1×10^6 CFU·mL⁻¹ BHIS菌液, 37 °C下培养24 h以形成1日龄 *E. faecalis* 生物膜。吸除原培养液, 在生物膜中加入50 μL培养基与50 μL不同浓度药液共培养, 于37 °C下培养1 h。每孔加入100 μL BTL, 室温下避光孵育20 min, 采用多功能酶标仪以化学发光法检测生物膜中ATP水平。ATP水平以荧光强度表示, 荧光强度越低, 代表ATP水平越低, 即药物抑制作用越强。

1.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 10.0统计软件进行统计学分析。各组 *E. faecalis* 生物膜形成量和浮游菌及生物膜中ATP水平均呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用Tukey's多重检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每部分实验至少进行3次重复。

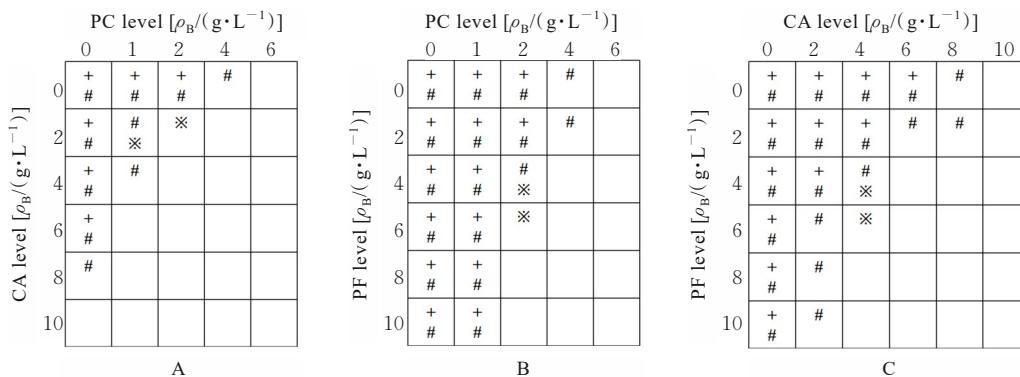
2 结果

2.1 赤芍3种活性成分的MIC和MBC 赤芍3种活性成分中PC的MIC为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; CA的MIC为 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; PF的MIC和MBC均 $> 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于PF单价较高且使用浓度较大, 造成费效比偏高, 因此后续实验选取PF浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 赤芍3种活性成分联合应用的FICI和FBCI

PC与CA联合应用时, PC的MIC值为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CA的MIC和MBC均为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, FICI=0.500, 提示PC与CA联合应用具有协同作用。PC与PF联合应用时, PC的MIC和MBC均为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, PF的MIC为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, FICI < 0.900 , 提示PC与PF联合应用具有相加作用。CA与PF联合应用时, CA的MIC和MBC均为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, PF的MIC为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, FICI < 0.900 , 提示CA与PF联合应用具有相加作用。见图1和表1。

2.3 各组 *E. faecalis* 生物膜形成情况 与对照组比较, PF-10组、PC-6组、CA-10组和各药物联合应用组 *E. faecalis* 生物膜形成量均明显降低 ($P <$



“+” represented visible bacterial precipitate in MIC test; “#” represented visible colonies in MBC test; blank indicated no visible bacterial precipitate or colonies; “※” indicated the well with the lowest FICI/FBCI value. A: Pattern of checkerboard assay of CA and PC; B: Pattern of checkerboard assay of PC and PF; C: Pattern of checkerboard assay of CA and PF.

图1 协同抗菌棋盘试验示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of synergistic antibacterial checkerboard test

表1 赤芍3种活性成分联合应用的FICI和FBCI

Tab. 1 FICI and FBCI of combined application of three kinds of active ingredients of *Paeoniae Rubra Radix*

Index	CA+PC	PF+PC	CA+PF
FICI	0.500	<0.900	<0.900
FBCI	0.533	<0.933	<1.000

0.01)。与PF-10组比较,PC-6组、CA-10组、CA-2+PC-1组、CA-2+PC-2组、PF-4+PC-2组、PF-6+PC-2组和PF-6+CA-4组*E. faecalis*生物膜形成量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),PF-4+CA-4组*E. faecalis*生物膜形成量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.4 各组*E. faecalis*生物膜形态表现 对照组*E. faecalis*生物膜较厚,细菌之间紧密连接,形态规则,且细胞膜完整;PF-10组、PC-6组和CA-10组*E. faecalis*生物膜厚度明显降低,细菌间的排列相对疏松;各药物联合应用组可见*E. faecalis*生物膜均明显减少乃至完全消失,高倍镜下可见*E. faecalis*生物膜结构完全消失,细菌碎片相互黏附聚集,失去原有的细菌形态。各药物联合应用组与PF-10组、PC-6组和CA-10组达到同样抑制生物膜的效果,结果与生物膜形成抑制的测定结果一致。见图2。

2.5 各组*E. faecalis*浮游菌和生物膜杀伤情况 与对照组比较,作用5、10和30 min后PF-10组、PC-6组及CA-10组*E. faecalis*浮游菌菌落明显减

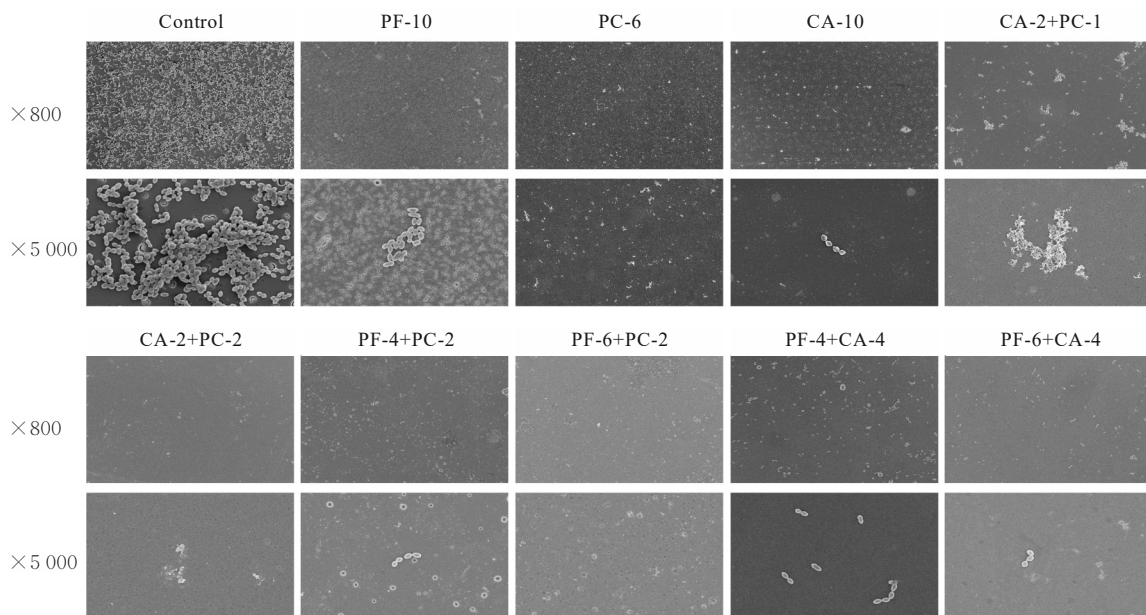
表2 各组*E. faecalis*生物膜形成量Tab. 2 Biofilm formations of *E. faecalis* in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	A(595)
Control	1.750±0.349
PF-10	0.491±0.067*
PC-6	0.059±0.012* ^{△△}
CA-10	0.065±0.021* ^{△△}
CA-2+PC-1	0.136±0.031* [△]
CA-2+PC-2	0.063±0.011* ^{△△}
PF-4+PC-2	0.060±0.004* ^{△△}
PF-6+PC-2	0.060±0.013* ^{△△}
PF-4+CA-4	0.306±0.132*
PF-6+CA-4	0.061±0.011* ^{△△}

* $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs PF-10 group.

少,提示其对*E. faecalis*的杀伤作用逐渐增强。各药物联合应用组中,CA与PC联合应用在5 min内可见*E. faecalis*浮游菌菌落明显减少,提示其对*E. faecalis*浮游菌菌落的杀伤作用较强。与CA和PC组比较,作用5、10和30 min后各药物联合应用组*E. faecalis*浮游菌菌落未见明显减少,提示其对*E. faecalis*的杀伤效果并不明显。见图3。

与对照组比较,作用30和60 min后PF-10组、PC-6组及CA-10组*E. faecalis*生物膜菌落逐渐减少,提示高浓度单药组对*E. faecalis*生物膜中细菌

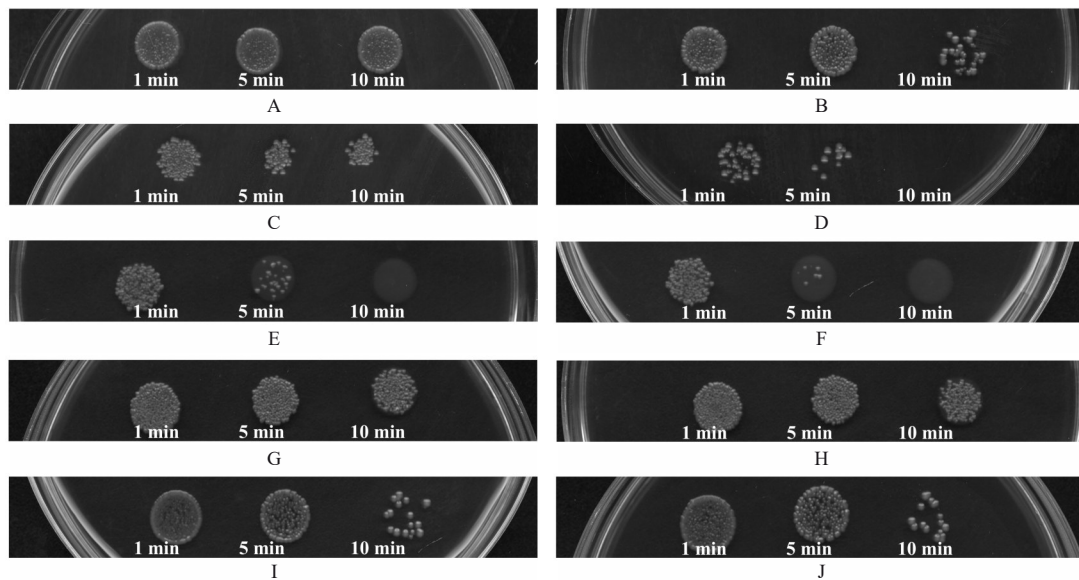
图2 各组*E. faecalis*生物膜形态表现Fig. 2 Morphology of *E. faecalis* biofilm in various groups

表现出逐渐增强的杀伤作用。其中PC-6组 *E. faecalis* 生物膜杀伤效果最为明显, 在处理30 min后未见菌落形成。在药物联合应用组中, 作用30 min后CA-2+PC-2组 *E. faecalis* 生物膜仅见少许菌落, 提示其可有效杀伤生物膜中的细菌。与PC-6组和CA-10组比较, 各药物联合应用组在低浓度即可达到高浓度单药组的杀伤效果。见图4。

2.6 各组 *E. faecalis* 生物膜损伤情况 对照组 *E. faecalis* 呈椭圆形, 且细胞膜完整。PF组 *E. faecalis* 形态改变, 细胞膜完整性受损; CA组大部分 *E. faecalis* 细胞膜相对完整, 但 *E. faecalis* 表面出现皱缩和凹陷现象, 少数 *E. faecalis* 细胞膜完整性遭到破坏;

PC组 *E. faecalis* 细胞膜的完整性破坏最为严重, 导致内容物外泄, 细胞碎片相互聚集形成絮状结构; 各药物联合应用组 *E. faecalis* 细胞膜破裂、内容物外泄和细菌残片聚集的现象, 尤其是PC与CA联合应用时, 可观察到 *E. faecalis* 细胞膜的完整性破坏最为明显, 内容物完全外泄; PF与CA联合应用时, 可观察到 *E. faecalis* 表面凹坑和皱缩, 偶见细胞膜破裂。见图5。

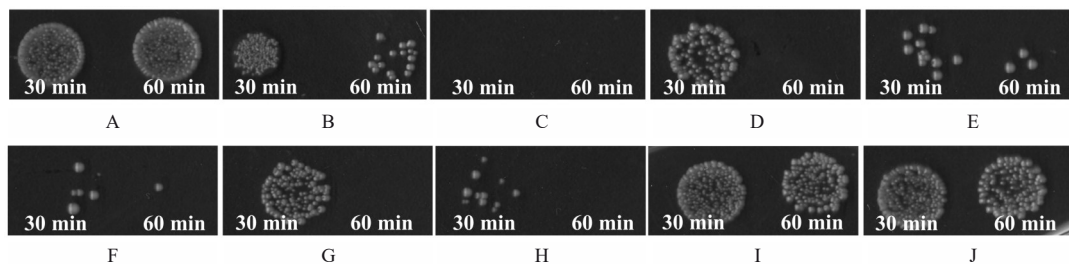
2.7 各组 *E. faecalis* 浮游菌和生物膜中ATP水平 与对照组比较, 各组 *E. faecalis* 浮游菌及生物膜中ATP水平均明显降低 ($P < 0.01$)。与PF-10组比较, CA-10组、CA-2+PC-2组、PF-4+CA-4组



A: Control group; B: PF-10 group; C: PC-6 group; D: CA-10 group; E: CA-2+PC-1 group; F: CA-2+PC-2 group; G: PF-4+PC-2 group; H: PF-6+PC-2 group; I: PF-4+CA-4 group; J: PF-6+CA-4 group.

图3 赤芍活性成分单独和联合应用1、5及10 min后各组浮游菌菌落生长情况

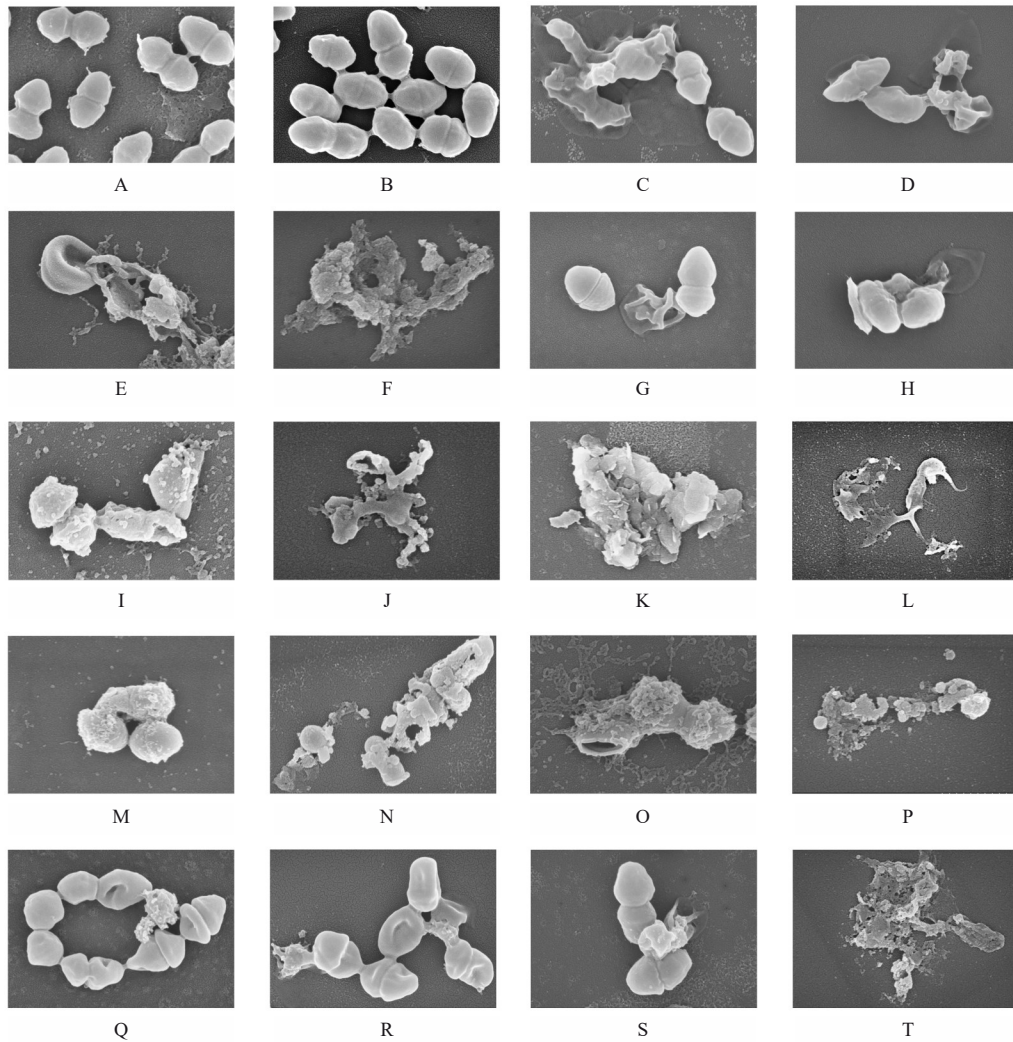
Fig.3 Growth of airborne microbial colonies in various groups after single and combination treatment of active ingredients of *Paeoniae Rubra Radix* for 1, 5, and 10 min



A: Control group; B: PF-10 group; C: PC-6 group; D: CA-10 group; E: CA-2+PC-1 group; F: CA-2+PC-2 group; G: PF-4+PC-2 group; H: PF-6+PC-2 group; I: PF-4+CA-4 group; J: PF-6+CA-4 group.

图4 赤芍活性成分单独和联合应用30和60 min后各组生物膜中菌落生长情况

Fig.4 Growth of microbial colonies in biofilms after single and combination treatment of active ingredients of *Paeoniae Rubra Radix* for 30 and 60 min



A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S: Combination of active ingredients of paeonia rubra radix for 15 min; B, D, F, H, J, L, N, P, R, T: Combination treatment of active ingredients of paeonia rubra radix for 30 min; A, B: Control group; C, D: PF-10 group; E, F: PC-6 group; G, H: CA-10 group; I, J: CA-2+PC-1 group; K, L: CA-2+PC-2 group; M, N: PF-4+PC-2 group; O, P: PF-6+PC-2 group; Q, R: PF-4+CA-4 group; S, T: PF-6+CA-4 group.

图5 赤芍活性成分单独和联合应用后各组 *E. faecalis* 生物膜损伤情况 ($\times 20\ 000$)

Fig.5 Damaging of *E. faecalis* membrane in various groups after single and combination treatment of active ingredients of *Paeonia Rubra Radix* ($\times 20\ 000$)

和PF-6+CA-4组 *E. faecalis* 浮游菌中ATP水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), CA-10组和CA-2+PC-2组 *E. faecalis* 生物膜中ATP水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表3。

3 讨论

E. faecalis 是导致根管治疗失败的主要微生物之一。植物提取物对 *E. faecalis* 具有显著的抗菌效果。COSTA等^[20] 研究表明: 胡椒巴西木和乌木的提取物能够有效抑制根管内 *E. faecalis* 活性。IBRAHIM等^[21] 研究也验证了黑桑叶提取物和油

橄榄叶提取物对 *E. faecalis* 具有良好的抗菌性能, 进一步证实了植物提取物中的活性成分在抗微生物治疗中的巨大潜力。中药复方中多种活性成分可协同作用, 增强药物疗效并减少不良反应。研究^[22-23] 显示: PC与银杏黄酮等成分结合, 能够发挥协同抗氧化作用; 其与羧甲基壳聚糖结合, 表现出协同抗菌活性。CA和咖啡酸与磷霉素联合应用, 对耐药性细菌有协同抑制作用^[24]。相关研究进一步证实中药复方中活性成分协同作用的重要性。本研究结果显示: 阳性对照组具有较好的抗 *E. faecalis* 浮游菌的能力, 而PF在浓度超过 $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时才表现出

表3 各组 *E. faecalis* 浮游菌和生物膜中 ATP 水平Tab. 3 Levels of ATP in airborne bacteria and biofilm of *E. faecalis* in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	Level of ATP (RLU)	
	Planktonic bacteria	Biofilm
Control	3 754.3±402.8	12 161.7±2 249.0
PF-10	1 122.3±332.7*	3 928.3±699.5*
PC-6	989.7±57.4*	5 857.0±1 746.6*
CA-10	245.3±108.3 ^{△△}	2 250.0±553.0 ^{△△}
CA-2+PC-1	647.0±19.1*	4 096.0±496.9*
CA-2+PC-2	284.0±6.1 ^{△△}	2 942.3±216.6 [△]
PF-4+PC-2	1 475.7±44.0*	7 724.3±1 468.4*
PF-6+PC-2	1 455.7±25.1*	4 584.0±1 615.0*
PF-4+CA-4	548.3±212.0 [△]	5 457.3±1 366.5*
PF-6+CA-4	626.0±39.1 [△]	4 450.0±2 083.1*

* $P<0.01$ vs control group; $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs PF-10 group.

对 *E. faecalis* 的轻微抑制作用。而 PC 与 CA 在联合应用时, 其 MIC 均明显降低, 提示 PC 和 CA 在联合作用时对 *E. faecalis* 及其生物膜具有明显的协同作用。TRENTIN 等^[25] 研究发现: PC 通过改变细菌表面的疏水性, 在其表层构建了一层亲水性涂层, 有效阻止了细菌间的黏附, 进而减弱生物膜的形成能力。本研究结果显示: PC 与 CA 在联合应用时在较低浓度下能够明显抑制 *E. faecalis* 生物膜形成, 与 TRENTIN 等^[25] 研究结果一致。

ULREY 等^[26] 研究显示: PC 作用于铜绿假单胞菌后, 可下调 ATP 合酶及参与 DNA 和 RNA 合成的蛋白质表达, 进而引发细胞代谢功能紊乱。研究^[27] 表明: CA 处理金黄色葡萄球菌能减少其结合凝固酶与游离凝固酶的产生, 减少纤维蛋白原向纤维蛋白的转变, 最终影响该菌黏附能力和致病力。本研究结果显示: PF、PC 和 CA 作用后, *E. faecalis* 细胞内 ATP 水平明显降低, 提示药物可能通过抑制细菌中 ATP 水平, 从而发挥抑菌作用。

PC 通过多种途径发挥其抗菌作用, 包括与微生物的基本生命结构——原生质体相结合, 与金属离子形成络合物, 抑制关键酶的活性, 改变细胞膜的通透性, 减少微生物获取必需营养物质的能力, 调整周围环境的酸碱度及干扰微生物的黏附和侵染过程, 从而表现出较强的抗菌效果^[28]。研究^[25] 显示: PC 对蛋白质的络合作用导致不溶性聚集体的形成, 此聚集体可以通过扫描电镜图像可视化。本研究结果显示: PC 应用于 *E. faecalis* 后, 细菌细胞

膜的完整性遭到破坏, 细菌形态发生改变, 甚至裂解成碎片, 周围出现不溶性的絮状物。同时, 在扫描电镜下可观察到 CA 和 PF 可使部分 *E. faecalis* 细胞膜表面出现凹坑、皱缩、空洞和轻微的破坏作用。提示 CA 和 PF 对 *E. faecalis* 菌体细胞膜具有一定的破坏作用, 与 SU 等^[29] 研究结果一致。但 CA 对 *E. faecalis* 生物膜的破坏作用较 PC 更小。且 PC 与 CA 在联合应用时对细胞的破坏效果更为明显, 可能是由于低浓度 PC 先行破坏细菌的黏附和聚集, 进而发挥强大的破膜作用, 可以帮助 CA 快速进入细菌细胞膜内部, 产生快速有效的杀菌效应, 极大地提升了对 *E. faecalis* 的抑制作用。通过细胞膜破坏和抑制细菌中 ATP 水平进一步增强抗菌效果。

综上所述, 赤芍 3 种活性成分 PF、PC 和 CA 联合应用, 通过破坏细胞膜和抑制细菌中 ATP 水平 2 种机制, 对 *E. faecalis* 及其生物膜菌具有较好的抑制作用, 为根管治疗领域提供了新的治疗策略。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张加妮参与实验设计和实施、数据采集、统计学分析及论文撰写, 赛杰参与数据采集, 周玉参与数据分析, 杨森参与论文撰写, 孙淑芬参与实验设计和论文指导。

[参考文献]

- [1] SWIMBERGHE R D, COENYE T, DE MOOR R G, et al. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review[J]. Int Endod J, 2019, 52(5): 604-628.
- [2] ZHANG C J, DU J R, PENG Z X. Correlation between enterococcus faecalis and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review[J]. J Endod, 2015, 41(8): 1207-1213.
- [3] PEDRINHA V F, CUELLAR M R C, DE BARROS M C, et al. The vehicles of calcium hydroxide pastes interfere with antimicrobial effect, biofilm polysaccharidic matrix, and pastes' physicochemical properties [J]. Biomedicine, 2022, 10(12): 3123.
- [4] SONG J Z, HONG L H, ZOU X Y, et al. A self-supplying H₂O₂ modified nanozyme-loaded hydrogel for root canal biofilm eradication[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10107.
- [5] HU T, LEI L, ZHOU X D. Research progress in pathogenesis and control of *Enterococcus faecalis* with

- persistent infection in root canals [J]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2022, 57(1): 10-15.
- [6] THIEME L, KLINGER-STROBEL M, HARTUNG A, et al. *In vitro* synergism and anti-biofilm activity of ampicillin, gentamicin, ceftaroline and ceftriaxone against *Enterococcus faecalis* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(6): 1553-1561.
- [7] MIRHADI H, ABBASZADEGAN A, RANJBAR M A, et al. Antibacterial and toxic effect of hydrogen peroxide combined with different concentrations of chlorhexidine in comparison with sodium hypochlorite [J]. *J Dent (Shiraz)*, 2015, 16(4): 349-355.
- [8] XIAO H, ZHANG H T, JIA Q R, et al. Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: experience from an allergy center in China [J]. *Anesthesiology*, 2023, 138(4): 364-371.
- [9] 张鹏鹏, 李增顺, 宋 繁, 等. 赤芍对金黄色葡萄球菌增殖和细菌毒力因子表达的影响 [J]. *中国农学通报*, 2016, 32(5): 28-32.
- [10] 李亚婷, 刘林波, 黄燕杰, 等. 中药有效成分对白色念珠菌生物膜作用的研究现状 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(17): 2439-2441.
- [11] 龚 怡, 吴泽钰, 王 琛, 等. 赤芍的抑菌作用及其防治慢性牙周炎的机制研究 [J]. *口腔医学*, 2021, 41(5): 391-397.
- [12] 王殿明, 王健平, 杨景云, 等. 芍药苷对白色念珠菌生物膜的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(25): 4038-4042.
- [13] 吴加豪, 乔建瓴. 口腔常见微生物与哮喘患者肺功能及口腔免疫特征相关性研究 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2024, 45(1): 75-80.
- [14] 毕 玲. 葡萄籽原花青素提取物预防龋病的实验研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [15] 刘晓璇, 方 圆, 傅志华, 等. 植物多酚提取物对致龋菌作用的研究进展 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2019, 34(2): 147-149.
- [16] YANG S Y, LIU Y, MAO J, et al. The antibiofilm and collagen-stabilizing effects of proanthocyanidin as an auxiliary endodontic irrigant [J]. *Int Endod J*, 2020, 53(6): 824-833.
- [17] TAMURA T, ASAHARA M, YAMAMOTO M, et al. *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes [J]. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(1): 1-8.
- [18] LU Y, TIAN H L, CHEN R Q, et al. Synergistic antimicrobial effect of antimicrobial peptides CATH-1, CATH-3, and PMAP-36 with erythromycin against bacterial pathogens [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 953720.
- [19] LI Y L, LI S, CHEN M, et al. Synergistic effect of pyrvinium pamoate and posaconazole against *Cryptococcus neoformans* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1074903.
- [20] COSTA E M, EVANGELISTA A P, MEDEIROS A C, et al. *In vitro* evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action [J]. *Braz Oral Res*, 2012, 26(3): 215-221.
- [21] IBRAHIM R O, SALAMA R A, AMIN A M. Can ethanolic leaf extract of olive or black mulberry substitute sodium hypochlorite as a root canal irrigant? an *in vitro* study [J]. *J Contemp Dent Pract*, 2021, 22(10): 1123-1129.
- [22] ZHANG L H, ZHU C Y, LIU X Q, et al. Study on synergistic antioxidant effect of typical functional components of hydroethanolic leaf extract from ginkgo biloba *in vitro* [J]. *Molecules*, 2022, 27(2): 439.
- [23] WANG J Y, BIE M, ZHOU W J, et al. Interaction between carboxymethyl pachyman and lotus seedpod oligomeric procyanidins with superior synergistic antibacterial activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 212: 11-20.
- [24] ZHANG F Y, ZHAI T H, HAIDER S, et al. Synergistic effect of chlorogenic acid and caffeic acid with fosfomycin on growth inhibition of a resistant *Listeria monocytogenes* strain [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(13): 7537-7544.
- [25] TRENTIN D S, SILVA D B, FRASSON A P, et al. Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8287.
- [26] ULREY R K, BARKSDALE S M, ZHOU W D, et al. Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 499.
- [27] 曾 铭, 鲁 兰, 樊 荣, 等. 绿原酸体内代谢产物抗金黄色葡萄球菌生物被膜作用及机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(3): 34-41.
- [28] 石 碧, 杜 晓. 植物原花色素研究利用进展与发展趋势 [J]. *四川大学学报(工程科学版)*, 2006, 38(5): 16-24.
- [29] SU M M, LIU F, LUO Z, et al. The antibacterial activity and mechanism of chlorogenic acid against foodborne pathogen *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2019, 16(12): 823-830.