

松油烯-4-醇与 α -红没药醇对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌协同抑菌作用研究

孟昭成¹ 王丽欣¹ 吕雅琳¹ 江水¹ 李振兴² 陈官芝¹

(1 青岛大学附属医院皮肤科, 山东 青岛 266003; 2 中国海洋大学食品安全实验室)

[摘要] 目的 探讨松油烯-4-醇(T4O)和 α -红没药醇(Bis)对于金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和痤疮丙酸杆菌(*C.acnes*)的协同抑菌作用。方法 采用微量棋盘稀释法测定 T4O、Bis 联用时上述两种实验菌的最小抑菌浓度(MIC),并计算部分抑菌浓度指数(FICI)。对两种实验菌各设置 MIC 组(加入 MIC 的 T4O、Bis)、 $2\times$ MIC 组(加入 2 倍 MIC 的 T4O、Bis)及阴性对照组(不加 T4O、Bis),绘制 T4O、Bis 联用时两种实验菌各组的时间-杀菌曲线,测定联用时两种实验菌各组的菌株表面 Zeta 电位(ZP)、细胞内核酸及蛋白质泄漏情况、细菌生物膜破坏情况以及 *S.aureus* 的呼吸链脱氢酶活性,透射电镜观察联用对两种实验菌各组菌株形态的影响。结果 T4O 和 Bis 联用时 *S.aureus* 及 *C.acnes* 的 FICI <0.5 ,其中 T4O 对 *S.aureus* 的 MIC 为 0.62 g/L,对 *C.acnes* 的 MIC 为 0.31 g/L;时间-杀菌曲线显示,联用可明显抑制两种细菌生长。与阴性对照组相比,联用时两种细菌的 ZP 均降低,细菌细胞内核酸、蛋白质泄漏增加,菌体丧失正常形态,细菌生物膜被破坏,且 *S.aureus* 呼吸链脱氢酶活力降低。结论 T4O 和 Bis 对 *S.aureus* 及 *C.acnes* 具有协同抑菌作用,两者联合可能成为抑菌产品的有效成分。

[关键词] 松油烯-4-醇; α -红没药醇;金黄色葡萄球菌;痤疮丙酸杆菌;寻常痤疮;抗菌药;药物协同作用

[中图分类号] R986;R446.5

[文献标志码] A

SYNERGISTIC BACTERIOSTATIC EFFECT OF TERPINEN-4-OL AND α -BISABOLOL ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND CUTIBACTERIUM ACNES MENG Zhaocheng, WANG Lixin, LYU Yalin, JIANG Shui, LI Zhenxing, CHEN Guanzhi (Department of Dermatology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the synergistic bacteriostatic effect of terpinen-4-ol (T4O) and α -bisabolol (Bis) on *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and *Cutibacterium acnes* (*C.acnes*). **Methods** The microdilution checkerboard technique was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of T4O combined with Bis on the two experimental bacteria, and fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated. An MIC group (T4O and Bis at a concentration of MIC), a $2\times$ MIC group (T4O and Bis at a concentration of $2\times$ MIC), and a negative control group (no T4O or Bis added) were set up for each experimental bacterium; the time-bactericidal curve was plotted for each experimental bacterium after the addition of both T4O and Bis; each group of the two experimental bacteria was measured in terms of Zeta potential (ZP) on the surface of the strain, leakage of intracellular nucleic acid and protein, damage of bacterial biofilm, and respiratory chain dehydrogenase activity in *S.aureus* after the addition of both T4O and Bis; a transmission electron microscope was used to observe the influence of T4O combined with Bis on the morphology of the two experimental bacteria. **Results** The combination of T4O and Bis for *S.aureus* and *C.acnes* had an FICI of <0.5 , and T4O had an MIC of 0.31 g/L for *C.acnes* and 0.62 g/L for *S.aureus*. The time-bactericidal curve showed that the combination of T4O and Bis significantly inhibited the growth of both bacteria. Compared with the negative control group, the combination group had a significant reduction in ZP, a significant increase in the leakage of intracellular nucleic acid and protein, loss of the normal morphology of bacterial body, damage of bacterial biofilm, and a reduction in respiratory chain dehydrogenase activity in *S.aureus*. **Conclusion** T4O and Bis have a synergistic bacteriostatic effect on *S.aureus* and *C.acnes*, and the combination of T4O and Bis may become an effective component of antibacterial products.

[KEY WORDS] Terpinen-4-ol; α -bisabolol; *Staphylococcus aureus*; *Propionibacterium acnes*; Acne vulgaris; Anti-bacterial agents; Drug synergism

金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)是人类皮肤细菌感染的主要致病菌^[1-3],痤疮丙酸杆菌(*C.acnes*)与痤疮发病机制的多个环节密切相关^[4]。目前治疗细菌感染的常规方法是使用抗生素,但随着细菌对抗生素耐药性的增加^[5],抗生素的替代治疗逐渐引起临

床上的重视。植物精油提取自芳香植物中,具有抗菌、抗炎、抗病毒等药理活性,其抗菌特性不易导致细菌耐药,在特定领域具有替代抗生素的潜力^[6]。松油烯-4-醇(T4O)为茶树油的主要化合物,在茶树油中的含量占比超过 35%,具有很强的抗菌和抗炎活性,是茶树油治疗寻常痤疮的重要作用成分^[7-9]。 α -红没药醇(Bis)最初提取于洋甘菊中,因其具有舒缓皮肤作用,被应用到许多化妆品配方中^[10]。此

[收稿日期] 2023-04-19; [修订日期] 2023-06-13

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(32072338)

[通讯作者] 陈官芝, Email:chenguanzhiqd@126.com

外, Bis 还具有抗炎及促进伤口愈合的作用^[11], 以及与抗生素诺氟沙星联合治疗 *S. aureus* 感染时具有协同作用^[12]。目前 T4O 和 Bis 均被应用在皮肤外用制剂中, 但有关 T4O、Bis 联用的抑菌作用则未见报道。本研究通过测定 T4O、Bis 联用对 *S. aureus* 及 *C. acnes* 的抑菌作用, 为开发新型抑菌产品成分配方提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

T4O 购自上海皓鸿生物医药科技有限公司, Bis 购自上海麦克林生化科技有限公司, 吐温 80、2, 3, 5-三苯基四氮唑购自北京索莱宝有限公司, 盐酸米诺环素购于浙江海正辉瑞制药有限公司, 金黄色葡萄球菌(ATCC 43300)、痤疮丙酸杆菌(ATCC 11827)购自北纳创联生物技术有限公司, MH 肉汤培养基(MHB)、营养琼脂培养基、液体硫乙醇酸盐培养基(FT)、哥伦比亚血平板购自青岛海博生物有限公司。

Sigma3K15 离心机购自曦玛离心机(上海)有限公司, Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位仪购自英国 Malvern 公司, NanoDrop™ One 微量 UV-Vis 分光光度计、全自动酶标仪购自美国赛默飞公司。

1.2 *S. aureus* 和 *C. acnes* 的培养

将 *S. aureus* 菌液在营养琼脂培养基上画线接种, 于 37 °C 恒温箱中过夜培养, 挑取单菌落至装有 MHB 的试管中, 37 °C 下于 200 r/min 的摇床中培养至对数生长期以后备用。将 *C. acnes* 菌液在哥伦比亚血平板上画线接种, 37 °C 下于厌氧箱中培养 48 h, 挑取单菌落至装有 FT 的试管中, 37 °C 下于厌氧箱中静置培养至对数生长期后备用。

1.3 T4O 与 Bis 对两种实验菌株的最小抑菌浓度(MIC)的测定和部分抑菌浓度指数(FICI)的计算

将对数生长期的两种细菌用 MHB(*S. aureus*) 和 FT(*C. acnes*) 分别稀释为浓度每升约 1×10^9 个菌落形成单位(CFU)的菌悬液。参考 BELLIO 等^[13]的方法, 在无菌 96 微孔板中用 MHB 将 Bis 从 1~11 列进行二倍梯度稀释, 每孔溶液体积为 100 μ L, 使质量浓度分别达到 25.00、12.50、6.25、3.12、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10、0.05 和 0.02 g/L; 用 MHB 将 T4O 从 A~G 行进行二倍梯度稀释, 使终质量浓度达到 10.00、5.00、2.50、1.25、0.62、0.31 和 0.16 g/L; 在上述各孔中添加 100 μ L *S. aureus* 悬液, 于 37 °C 恒温静置培养 24 h。另外取一块无菌 96 微孔板重

复上述操作, 在各孔中添加 100 μ L *C. acnes* 悬液, 37 °C 下于恒温静置厌氧培养 48 h。在上述浓度梯度中, 肉眼可观察到的无实验菌株生长的最低药物浓度即为 MIC。将 0.2 mg/g 盐酸米诺环素作为质控药物, 重复上述操作, 实验菌株的 MIC 在 0.05~0.20 mg/L 之间, 则认为上述实验测定结果可信。采用 FICI 判断 T4O 与 Bis 联用的效果, 其计算方法为 $FICI = MIC_{T4O(联用)} / MIC_{T4O(单用)} + MIC_{Bis(联用)} / MIC_{Bis(单用)}$ 。FICI ≤ 0.5 为协同作用, 0.5~1 为相加作用, 1~4 为无相互作用, ≥ 4 为拮抗作用^[14]。

1.4 绘制 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株时间-杀菌曲线

将对数生长阶段的 *S. aureus* 用 MHB 稀释至 1×10^9 CFU/L, 取 15 mL 菌液 4 °C 6 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液以后加入 12 mL MHB 并吹打均匀, 分别平均分装至 3 个无菌试管中, 标记为 MIC₁、2 \times MIC₁ 及阴性对照₁ 组。另取对数生长阶段的 *C. acnes* 以 FT 稀释至 1×10^9 CFU/L 后重复上述操作。于 *S. aureus* 的 MIC₁ 组试管中加入 3.13 mg T4O 及 1 mg Bis, 2 \times MIC₁ 组试管中加入 6.25 mg T4O 及 1 mg Bis; 于 *C. acnes* 的 MIC₁ 组试管中加入 1.56 mg T4O 及 1 mg Bis, 2 \times MIC₁ 组试管中加入 3.13 mg T4O 及 1 mg Bis; 两种菌株的阴性对照₁ 组中均加入 7.2 μ L 生理盐水。最后所有组中各加入 50 μ L 吐温 80, 再用每种菌株对应的培养基补充至总体积均为 5 mL, 充分振荡混匀。*S. aureus* 的各组在 37 °C 下于 200 r/min 摇床中培养, *C. acnes* 各组 37 °C 下于厌氧箱中静置培养, 每 2 h 以平板涂布计数法测量一次 CFU, 观察 24 h 并绘制时间-杀菌曲线。实验重复 3 次, 数据取均值。

1.5 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株表面 Zeta 电位(ZP)的影响

将对数生长期的两种菌悬液用 MHB(*S. aureus*) 和 FT(*C. acnes*) 稀释至 1×10^9 CFU/L, 使用 1.4 中方法进行分组, 每种菌株均分为 MIC₂、2 \times MIC₂ 及阴性对照₂ 组, 4 h 后每组分别取 1 mL 菌液, 于 4 °C 下 6 500 r/min 离心 15 min 后。收集菌体用无菌 PBS 重悬、洗涤 2 次, 用 Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位仪检测两种实验菌株表面 ZP。

1.6 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株细胞内核酸和蛋白质泄漏的影响

将 1.5 中各组培养 4 h 后的两种菌株分别取 1 mL, 于 4 °C 下 6 500 r/min 离心 5 min, 取上清液, 使用微量 UV-Vis 分光光度计测定各组上清液在波

长 260、280 nm 处的吸光度(A)值,分别代表菌株细胞内核酸及蛋白质的含量。

1.7 T4O 与 Bis 联用对 *S.aureus* 呼吸链脱氢酶活性的影响

参考 NING 等^[15]的方法检测呼吸链脱氢酶活性。按 1.4 中方法制备 *S.aureus* 的 MIC₃、2×MIC₃ 及阴性对照₃组的菌液,每组取 2 mL 菌液后均依次加入 0.05 mol/L pH 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液以及 0.1 mol/L 葡萄糖溶液和 1 g/L 2,3,5-三苯基四氮唑溶液各 4 mL, 37 °C 下于 200 r/min 摇床振荡 4 h 后,各组中均加入 200 μL 浓硫酸终止反应;最后均加入 5 mL 正丁醇混匀,静置 5 min 后 6 500 r/min 离心 5 min,取上清液。使用酶标仪测定各组上清液在波长 490 nm 处吸光度值;吸光度值越高,代表 *S.aureus* 呼吸链脱氢酶的活性越高。

1.8 透射电镜观察 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株形态的影响

将 1.5 中各组培养 4 h 后的两种菌株分别取 1 mL,于 4 °C 下以 6 500 r/min 离心 5 min,用无菌 PBS 洗涤菌体 2 次,后加入 1 mL 25 g/L 的戊二醛固定,置于 4 °C 冰箱 6 h 后,使用负染法染色,用透射电镜观察菌株形态并拍照。

1.9 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株细菌生物膜的破坏作用

将对数生长阶段的两种菌悬液分别加到两块无菌 96 微孔板的 1~3 列中,每孔 200 μL, *S.aureus* 在 37 °C 下于培养箱中静置培养 72 h 后, *C.acnes* 在 37 °C 下于厌氧培养箱中静置培养 96 h 后,仔细去除菌液后冲洗培养孔 3 次,去除多余的水分。将 T4O 与 Bis 用质量浓度 5 g/L 的吐温 80-生理盐水缓冲液按 1.4 中方法配置,每种菌株均分为 MIC₄、2×MIC₄ 及阴性对照₄组,将各组分别加至上述 1~3 列微孔中,每孔 200 μL, 37 °C 下于恒温培养箱中静置 24 h。去除微孔中液体,生理盐水冲洗 3 次后室温干燥,向每孔中加入 200 μL 质量浓度 0.1 g/L 的结晶紫溶液,于室温下染色 30 min 后小心去除染色液并用蒸馏水清洗 3 次,37 °C 下放置 30 min 后加入 200 μL 无水乙醇,用酶标仪测定两板 1~3 列在波长 595 nm 处的吸光度值;吸光度值越高,代表微孔中残留生物膜越多。

1.10 统计学处理

使用软件 GraphPad Prism 8.0.2 对数据进行统计学分析。符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素或双因素方差分析,组间

两两比较采用 Tukey 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 T4O 与 Bis 单独及联用时对两种实验菌株的抗菌作用

T4O 单独用药时对两种实验菌株的 MIC 均为 2.5 g/L,联用时对 *S.aureus* 的 MIC 降至 0.62 g/L,对 *C.acnes* 的 MIC 降至 0.31 g/L; Bis 单独用药时对两种实验菌株的 MIC 均 > 12.5 g/L,联用时对两种实验菌株的 MIC 降至 0.39~1.56 g/L。T4O、Bis 联用时对 *S.aureus* 和 *C.acnes* 的 FICI 值均 < 0.5 ,表明 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株表现为协同抑制作用。

2.2 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株的抑制作用

双因素方差分析结果显示,组别(药物浓度)、时间、组别与时间交互作用对于 *S.aureus* 和 *C.acnes* 的抑制有明显影响($F_{\text{组别}} = 208.06、215.92, F_{\text{时间}} = 56.31、66.23, F_{\text{组别} \times \text{时间}} = 63.52、76.15, P < 0.01$)。Tukey 法结果显示, *S.aureus* 自 2 h 时及其后各时间点的菌落浓度三组间比较均具有显著差异($F = 25.56 \sim 598.17, P < 0.05$), *C.acnes* 自 2 h 时及其后各时间点的菌落浓度三组间比较也具有显著差异($F = 39.84 \sim 617.08, P < 0.05$)。见图 1。

2.3 T4O 与 Bis 联用时对两种实验菌株表面 ZP 的影响

S.aureus 的 MIC₂、2×MIC₂ 组和阴性对照₂ 菌株表面 ZP 分别为 (-1.060 ± 0.032) 、 (-1.167 ± 0.072) 、 (-0.804 ± 0.132) mV,三组间比较差异有显著性($F = 26.57, P < 0.01$); *C.acnes* 的 MIC₂、2×MIC₂ 组以及阴性对照₂ 菌株表面的 ZP 分别为 (-1.223 ± 0.093) 、 (-1.360 ± 0.185) 、 (-0.760 ± 0.076) mV,三组间比较差异有显著性($F = 18.29, P < 0.05$)。

2.4 T4O 与 Bis 联用对实验菌株细胞内核酸及蛋白类泄漏的影响

S.aureus 的 MIC₂、2×MIC₂ 组和阴性对照₂ 组 A_{260} 值分别为 0.990 ± 0.147 、 1.157 ± 0.092 、 0.687 ± 0.087 , A_{280} 值分别为 1.270 ± 0.076 、 1.340 ± 0.070 、 0.963 ± 0.040 ,三组间 A_{260} 、 A_{280} 值比较差异均有显著性($F = 13.50、29.53, P < 0.05$); *C.acnes* 的 MIC₂ 组以及 2×MIC₂ 组与阴性对照₂ 组 A_{260} 值分别为 1.155 ± 0.145 、 1.268 ± 0.170 、 0.775 ± 0.068 , A_{280} 值分别为 0.930 ± 0.082 、 1.253 ± 0.076 、 0.627 ± 0.153 ,

三组间 A_{260} 、 A_{280} 值差异均具有显著性 ($F = 14.67$ 、 24.71 , $P < 0.05$)。

2.5 T4O 与 Bis 联用对 *S.aureus* 呼吸链脱氢酶活性的影响

S.aureus 的 MIC_3 、 $2 \times MIC_3$ 组和阴性对照₃组 A_{490} 值分别为 0.167 ± 0.040 、 0.109 ± 0.025 、 0.761 ± 0.087 ，三组之间 A_{490} 值比较差异具有显著性 ($F = 120.80$, $P < 0.01$)。

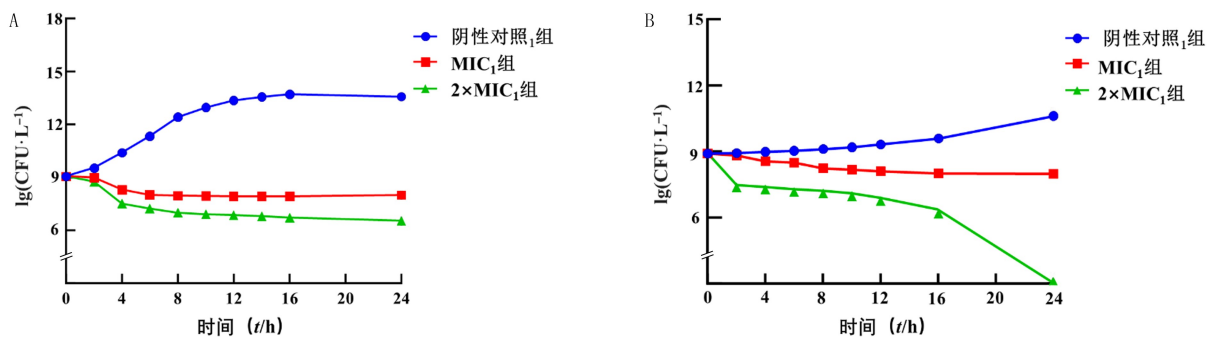
2.6 透射电镜观察 T4O 与 Bis 联用对两种实验菌株形态的影响

S.aureus 的阴性对照₂组菌株可见细胞完整，胞质均匀； MIC_2 组处理 4 h 后，可见细菌细胞中央凹陷，颜色变淡，说明细胞膜遭到破坏，胞内物质外

流。*C.acnes* 的阴性对照₂组菌株可见细胞完整，胞膜清晰； MIC_2 组处理 4 h 后，可见细菌细胞边界模糊，菌体粗细不均匀。见图 2。

2.7 T4O 与 Bis 联用对于实验菌株生物膜的破坏作用

S.aureus 的 MIC_4 、 $2 \times MIC_4$ 组与阴性对照₄组生物膜染色液 A_{595} 值分别为 0.272 ± 0.032 、 0.229 ± 0.023 、 0.426 ± 0.037 ，三组间 A_{595} 值进行比较差异有显著意义 ($F = 44.41$, $P < 0.01$)；*C.acnes* 的 MIC_4 、 $2 \times MIC_4$ 组与阴性对照₄组生物膜染色液 A_{595} 值分别为 0.333 ± 0.081 、 0.310 ± 0.073 、 0.466 ± 0.069 ，三组之间 A_{595} 值进行比较差异具有显著性 ($F = 5.12$, $P < 0.05$)。



A: *S.aureus* 时间-杀菌曲线, B: *C.acnes* 时间-杀菌曲线

图 1 T4O 与 Bis 联用对两种菌株的抑制作用

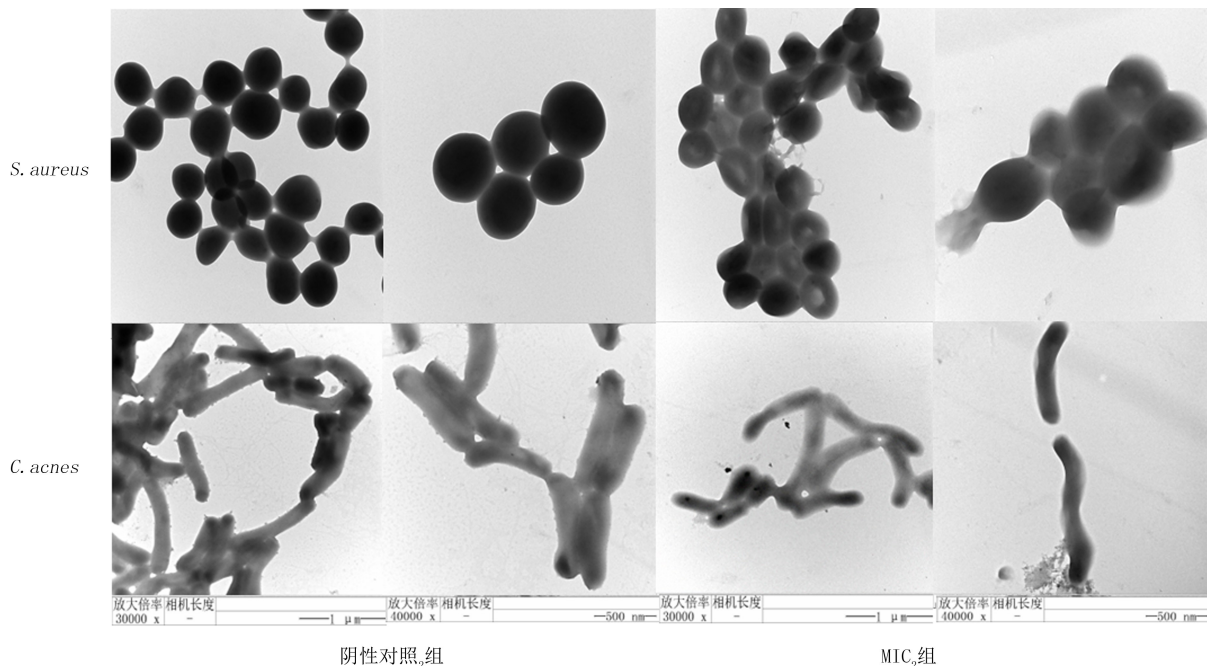


图 2 经 T4O 和 Bis 联合处理的 *S.aureus* 及 *C.acnes* 透射电镜图像

3 讨论

已有报道指出, T4O 对 *S.aureus* 和 *C.acnes* 具

有明确的抑制作用^[16-18], 文献关于 T4O 抗 *S.aureus* 作用的 MIC 为 1.25~2.50 g/L^[19], 与本研究结果相符。本研究 T4O 与 Bis 联用时, T4O 对 *S.au-*

reus 以及 *C.acnes* 的 MIC 分别为 0.62、0.31 g/L。Bis 为 0.39、0.78、1.56 g/L 三个浓度时对两种菌株均产生抑制作用,其余浓度对两种菌株均无抑制作用,因此 Bis 的 MIC 为 0.39~1.56 g/L,即药物浓度过高或者过低均会降低两药的协同抑菌效果,并且 Bis 的抗炎作用也有类似的最佳浓度范围^[20]。综合两种实验菌株的时间-杀菌曲线可发现,T4O 与 Bis 联用时对两种菌株抑制效果与药物浓度呈现剂量依赖关系,二者在 MIC 时对两种实验菌均有抑菌及部分杀菌作用,2 倍 MIC 时对 *C.acnes* 有完全杀菌作用,但不能完全杀灭 *S.aureus*。虽然两药联用时 2 倍 MIC 的抑菌效果更佳,但是 MIC 也可提供长达 24 h 的持续抑菌作用,故本研究透射电镜只观察两药浓度为 MIC 时对两种细菌抑制作用的影响。

细菌表面电位是维持最佳细胞功能的关键物理特征,ZP 测量技术可被视为计算细菌表面电位的间接工具。本研究发现,T4O 与 Bis 联用通过降低两种实验菌的 ZP 发挥抑制作用,CUTRO 等^[21]同样发现精油能够降低细菌的 ZP 值。呼吸链是细菌能量代谢的重要环节,2,3,5-三苯基四氮唑可以与细菌中呼吸链脱氢酶发生还原反应,转变为最大吸收峰在波长 490 nm 处的红色物质,故认为 A_{490} 值与呼吸链脱氢酶活性呈正相关^[22]。且由于 *C.acnes* 为厌氧菌,体内缺乏呼吸链脱氢酶,故本研究仅针对 *S.aureus* 进行了呼吸链脱氢酶活性的检测。本研究结果显示 MIC₃ 组 A_{490} 值较阴性对照₃ 组显著降低,说明两药联用且浓度为 MIC 时即可抑制 *S.aureus* 呼吸链脱氢酶活性。

周静等^[18]使用形态学观察法直观地发现 T4O 可使 *S.aureus* 及 *C.acnes* 干瘪皱缩、出现畸形,从而达到抑制作用。本研究通过透射电镜观察,发现 T4O、Bis 联用后两种菌体结构相对完整,但其内容物减少,结合 MIC₂ 组 A_{260} 、 A_{280} 值较阴性对照₂ 组显著升高,说明 MIC₂ 组两种菌株细胞内核酸、蛋白泄漏增加,推测这种改变可能是由于细菌膜变得渗透性更高导致。使用结晶紫对微量滴定板孔内形成的生物膜染色是分析生物膜形成、抑制或根除的最常用定量方法,本研究中 MIC₄ 组 A_{595} 值较阴性对照₄ 组显著降低,表明对应的微孔内生物膜含量明显减少,可以推断两药联用且浓度为 MIC 时即可明显破坏两种细菌的生物膜。

目前研究发现,*S.aureus* 及 *C.acnes* 抗药性的机制主要为发生基因突变和形成生物膜等^[23]。本研究验证的 T4O 联合 Bis 的协同抗菌作用机制与

其他植物精油单体成分的抑菌机制类似,均可破坏细菌细胞膜结构和生物膜,从而减少细菌耐药性的产生。本实验所用菌株 *S.aureus* 标准菌株 ATCC 43300 是耐甲氧西林的 *S.aureus*,而 *C.acnes* 标准菌株 ATCC 11827 并非耐药株,并且缺少在临床患者皮损中分离耐药菌株的进一步验证,但从联用抑菌机制上推测,对临床分离的耐药株也应有类似的抑制作用。FORRER 等^[24]报道口臭相关的细菌摩尔梭杆菌对茶树油和 Bis 联用敏感,认为该化合物组合可以开发口腔保健产品。综上所述,本研究发现 T4O 与 Bis 联用的抑菌潜力,两者或有望成为针对皮肤 *S.aureus* 及 *C.acnes* 感染治疗产品的配方组合成分。

作者声明:孟昭成、李振兴、吕雅琳参与了研究设计;孟昭成、陈官芝、王丽欣、江水参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] CARMONA-CRUZ S, OROZCO-COVARRUBIAS L, SÁEZ-DE-OCARIZ M. The human skin microbiome in selected cutaneous diseases[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 834135.
- [2] CHEN Y E, FISCHBACH M A, BELKAID Y. Skin microbiota-host interactions[J]. *Nature*, 2018, 553(7689):427-436.
- [3] BECKER R E, BUBECK WARDENBURG J. Staphylococcus aureus and the skin: A longstanding and complex interaction[J]. *Skinmed*, 2015, 13(2):111-120.
- [4] O'NEILL A M, GALLO R L. Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1):177.
- [5] MCCLAIN S L, BOHAN J G, STEVENS D L. Advances in the medical management of skin and soft tissue infections[J]. *BMJ*, 2016, 2016:i6004.
- [6] SWAMY M K, AKHTAR M S, SINNIHAH U R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016:3012462.
- [7] PAZYAR N, YAGHOORI B, BAGHERANI N, et al. A review of applications of tea tree oil in dermatology[J]. *Int J Dermatol*, 2013, 52(7):784-790.
- [8] HAMMER K A. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 45(2): 106-110.
- [9] CARSON C F, HAMMER K A, RILEY T V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1):50-62.
- [10] MCKAY D L, BLUMBERG J B. A review of the bioactivity

and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.)[J]. *Phytother Res*, 2006,20(7):519-530.

[11] EDDIN L B, JHA N K, GOYAL S N, et al. Health benefits, pharmacological effects, molecular mechanisms, and therapeutic potential of α -bisabolol[J]. *Nutrients*, 2022,14(7):1370.

[12] OLIVEIRA F S, FREITAS T S, CRUZ R P D, et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α -bisabolol, β -cyclodextrin and α -bisabolol/ β -cyclodextrin complex[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2017,92:1111-1118.

[13] BELLIO P, FAGNANI L, NAZZICONE L, et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay[J]. *MethodsX*, 2021,8:101543.

[14] FILIPE G A, BIGOTTO B G, BALDO C, et al. Development of a multifunctional and self-preserving cosmetic formulation using sophorolipids and palmarosa essential oil against acne-causing bacteria[J]. *J Appl Microbiol*, 2022,133(3):1534-1542.

[15] NING H Q, WANG S T, LI Y Q, et al. The cell structure damage and embden-meyerhof-parnas pathway inhibition of *Listeria monocytogenes* induced by glycinin basic peptide[J]. *Microb Pathog*, 2021,152:104635.

[16] CORDEIRO L, FIGUEIREDO P, SOUZA H, et al. Terpinen-4-ol as an antibacterial and antibiofilm agent against *Staphylococcus aureus*[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(12):4531.

[17] CHENG F, MO Y N, CHEN K Y, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics indicates changes in MRSA

exposed to terpinen-4-ol[J]. *BMC Microbiol*, 2021,21(1):305.

[18] 周静,杜航,吴芳草,等. 松油烯-4-醇体外抑制痤疮主要致病菌作用研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018,13(2):160-163,167.

[19] ABUGHAZAL T, SCHELZ Z, VIDÁCS L, et al. Antimicrobial, multidrug resistance reversal and biofilm formation inhibitory effect of *origanum majorana* extracts, essential oil and monoterpenes[J]. *Plants*, 2022,11:1432.

[20] 邱海荣. 红没药醇和姜醇的协同抗炎性研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.

[21] CUTRO A C, CASTELLI M V, LÓPEZ S N, et al. Chemical composition of *Schinus areira* essential oil and antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Prod Res*, 2021,35(17):2931-2936.

[22] HANEY E F, TRIMBLE M J, HANCOCK R E W. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria[J]. *Nat Protoc*, 2021,16(5):2615-2632.

[23] LEE A S, DE LENCASTRE H, GARAU J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018,4:18033.

[24] FORRER M, KULIK E M, FILIPPI A, et al. The antimicrobial activity of alpha-bisabolol and tea tree oil against *Solobacterium moorei*, a Gram-positive bacterium associated with halitosis[J]. *Arch Oral Biol*, 2013,58(1):10-16.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第 349 页)

[12] PETROVIC-DJERGOVIC D, GOONEWARDENA S N, PINSKY D J. Inflammatory disequilibrium in stroke[J]. *Circ Res*, 2016,119(1):142-158.

[13] LAMBERTSEN K L, FINSEN B, CLAUSEN B H. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? [J]. *Acta Neuropathol*, 2019,137(5):693-714.

[14] KASNER S E. Clinical interpretation and use of stroke scales [J]. *Lancet Neurol*, 2006,5(7):603-612.

[15] WANG D X, LIU F, ZHU L Y, et al. FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages[J]. *J Neuroinflammation*, 2020,17(1):257.

[16] WICHA P, TOCHARUS J, JANYOU A, et al. Hexahydrocurcumin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury, attenuates inflammation, and improves antioxidant defenses in a rat stroke model [J]. *PLoS One*, 2017,12(12):e0189211.

[17] ANRATHER J, IADECOLA C. Inflammation and stroke: An overview[J]. *Neurotherapeutics*, 2016,13(4):661-670.

[18] OTO J, SUZUE A, INUI D, et al. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients[J]. *J Anesth*, 2008,22(3):207-212.

[19] GAO Y, FANG X B, TONG Y, et al. TLR4-mediated

MyD88-dependent signaling pathway is activated by cerebral ischemia-reperfusion in cortex in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2009,63(6):442-450.

[20] TAN L W, LI J S, WANG Y Y, et al. Anti-neuroinflammatory effect of alantolactone through the suppression of the NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Cells*, 2019,8(7):739.

[21] WILLIAMS A J, HALE S L, MOFFETT J R, et al. Delayed treatment with MLN519 reduces infarction and associated neurologic deficit caused by focal ischemic brain injury in rats via antiinflammatory mechanisms involving nuclear factor- κ B activation, gliosis, and leukocyte infiltration[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003:75-87.

[22] LV H, LI J, CHE Y Q. CXCL8 gene silencing promotes neuroglial cells activation while inhibiting neuroinflammation through the PI3K/Akt/NF- κ B-signaling pathway in mice with ischemic stroke[J]. *J Cell Physiol*, 2019,234(5):7341-7355.

[23] CHONG W S, HYUN C L, PARK M K, et al. Midazolam protects B35 neuroblastoma cells through Akt-phosphorylation in reactive oxygen species derived cellular injury[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2012,62(2):166-171.

[24] XU W, HU J M, LIU W W, et al. Remimazolam inhibits glioma cell growth and induces apoptosis through down-regulation of NF- κ B pathway[J]. *IUBMB Life*, 2021,73(2):341-348.

(本文编辑 范睿心 厉建强)