DOI:10.16016/j.2097-0927.202405038

天然植物薰衣草精油对多重耐药鲍曼不动杆菌的抗菌作用及机制研究

赵 曼,吴梓靖,孙 存,叶 演,陈 婷,刘姝琳,朱宝行,赵安妮,宋 振,杨 赟,孙红武,曾 浩
400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系微生物与生化药学教研室暨国家免疫生物制品工程技术研究中心

[**摘要**] **目的** 探讨天然植物薰衣草精油对多重耐药鲍曼不动杆菌的抗菌作用及初步机制。**方法** 用微量稀释法测定薰衣草精油对多重耐药鲍曼不动杆菌的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度;用杀菌动力学研究进一步确定其起效和维持时间;用小鼠感染模型评价薰衣草精油对创口愈合的促进作用;用结晶紫染色定量测定法对其生物膜的抑制和清除作用进行研究;用激光共聚焦显微镜观察生物膜中细菌存活情况;用核酸蛋白测定仪器检测 3 mg/mL、6 mg/mL 薰衣草精油干预后的细菌 DNA 核酸和蛋白质泄漏量;用钾离子试剂盒测定钾离子泄漏量,并采用蛋白组学技术结合生物信息学研究方法,初步探究薰衣草精油抗多重耐药鲍曼不动杆菌的作用机制。**结果** 薰衣草精油的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度均为 6 mg/mL,在 120 min 时,该浓度可杀死几乎所有多重耐药鲍曼不动杆菌,且呈现明显的剂量依赖效应和时间依赖效应。整体动物模型评价表明,3 mg/mL 和 6 mg/mL 薰衣草精油均能促进创口愈合,疗效明显。进一步研究发现,3 mg/mL 薰衣草精油具有一定的多重耐药鲍曼不动杆菌生物膜抑制作用,且能显著增加 DNA 核酸和蛋白质的泄漏量,并能促进钾离子外流。同时,6 mg/mL 薰衣草精油展现了对多重耐药鲍曼不动杆菌生物膜的清除作用。蛋白组学研究提示,薰衣草精油的抗菌作用可能与影响多重耐药鲍曼不动杆菌的氧化还原酶活性和细胞代谢过程,干扰细胞壁/膜/包膜等结构的生物合成有关。**结论** 薰衣草精油在 3 mg/mL 时即可发挥对多重耐药鲍曼不动杆菌的抗菌作用,其作用机制可能与破坏细菌生物膜和干扰细菌代谢有关。

[**关键词**] 薰衣草精油;多重耐药;鲍曼不动杆菌;抗菌作用;作用机制
[**中图法分类号**] R322.71; R581.1; R643 [**文献标志码**] A

Anti-bacterial effect and its mechanism of lavender essential oil against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*

ZHAO Man, WU Zijing, SUN Cun, YE Yan, CHEN Ting, LIU Shulin, ZHU Baohang, ZHAO Anni, SONG Zhen, YANG Yun, SUN Hongwu, ZENG Hao Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, National Engineering Technology Research Center of Immunobiologics, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the antibacterial effect and its preliminary mechanism of lavender essential oil on multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Methods** Micro-dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of lavender essential oil against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, and bactericidal kinetic study was employed to determine the onset and maintenance time of lavender essential oil. Meanwhile, the

[**基金项目**] 国家重点研发计划(2021YFC2302603);国家自然科学基金(32070924,32000651);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0159);重庆市高校创新研究群体(CXQT21009)

[**通信作者**] 孙红武,E-mail:sunhongwu2001@163.com;
曾 浩,E-mail:023-68771645,zeng1109@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

promoting and therapeutic effects of lavender essential oil on wound healing were observed in a mouse model of infection. Subsequently, crystal violet staining was used to determine the inhibition and clearance of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* biofilm by lavender essential oil, and laser confocal microscopy was utilized to observe the survival of bacteria in biofilms. NanoDrop instrument was utilized to quantify the leakage of bacterial DNA nucleic acid and protein after intervention with 3 and 6 mg/mL lavender essential oil, and the leakage of bacterial potassium ion was measured by potassium ion test kit. Proteomics technology combined with bio-informatics were applied to explore the action mechanism of lavender essential oil against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Results** The MIC and MBC of lavender essential oil were both 6 mg/mL, which could kill almost all multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* at the time point of 120 min, and showed an obvious dose- and time-dependent manner. The overall animal model evaluation showed that both 3 and 6 mg/mL lavender essential oil could promote wound healing, and the curative effect was obvious. Further studies confirmed that 3 mg/mL lavender essential oil had a certain biofilm inhibitory effect on multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, and 6 mg/mL also had a certain biofilm clearance effect under the same conditions. Meanwhile, when incubated at 37 ℃ for 1 h, the dose of 3 mg/mL could increase the leakage of DNA nucleic acid and protein, and significantly promote the efflux of potassium ions. Proteomic analysis suggested that the antibacterial effect of lavender essential oil may be related to affecting the oxidorereductase activity and cell metabolic process of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, and interfering with the biosynthesis of cell wall/membrane/envelope and other structures. **Conclusion** Lavender essential oil at 3 mg/mL can play an antibacterial effect against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, and its mechanism may be related to the destruction of bacterial biofilm and interference with bacterial metabolism.

[**Key words**] lavender essential oil; multi-drug resistance; *Acinetobacter baumannii*; antibacterial effect; action mechanism

Supported by the National Key R&D Program of China (2021YFC2302603), the National Natural Science Foundation of China (32070924, 32000651), the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0159), and the University Innovation Research Group Project of Chongqing (CXQT21009). Corresponding author: SUN Hongwu, E-mail: sunhongwu2001@163.com; ZENG Hao, E-mail: zeng1109@163.com

作为重要的天然产物之一,精油在药理学[1]、农用化学[2]、营养学[3]和日化用品[4]领域中均具有悠久的应用传统。精油常以芳香疗法或植物疗法[5]的形式广泛应用,其中大部分可当作抑菌药使用[6]。薰衣草(*Lavandula angustifolia* Mill.)属唇形科薰衣草属的一种常见芳香灌木,在我国多个地区均有分布,并作为地方用药,收录于《中华人民共和国卫生部药品标准(维吾药分册)》中。作为其有效部位提取物的薰衣草精油也有着治疗精神障碍和焦虑等疾病的悠久历史,并获得多个国际组织的认可[7-8]。现代研究表明,薰衣草主要含有乙酸芳樟酯、芳樟醇、石竹烯、反式-β-罗勒烯、月桂烯、松油醇等近 20 种化合物[9],其中主要活性成分为乙酸芳樟酯和芳樟醇,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌具有显著的抗菌活性[10]。此外,不同薰衣草精油的成分和含量会直接影响精油的抗菌药理作用。林鹏飞等人[11]采用微量稀释法探究了 3 种薰衣草精油的抑制多种真菌、细菌的活性,其中以醒目薰衣草的精油活性最优,其对须藓毛藓菌、红色毛癣菌、犬小孢子菌等真菌;表面葡萄球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞杆菌等细菌均有较好作用,且相关活性与精油样品中的乙酸芳樟酯、芳樟醇、1,8-桉油醇含量呈正比趋势。虽然薰衣草精油对白色念珠菌[12]、棉花枯萎病菌[13]、金黄色葡萄球菌[11]、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株和耐万古霉素肠球菌属细菌[14]等的抑制活性也表现不俗,但对多重耐药鲍曼不动杆菌抗菌作用少有报道。

鲍曼不动杆菌属革兰氏阴性菌,广泛存在于自然环境及人体呼吸道、皮肤中,尽管其致病能力较弱,但对免疫功能下降的人群仍有较大危害。由其演变的多重耐药甚至全耐药的菌种,是 21 世纪临床医学重点关注的病原菌[15,16]。本研究选用多重耐药鲍曼不动杆菌为研究对象,探究薰衣草精油的抗菌活性,以及其对细菌生物膜完整性、通透性的影响,并采用蛋白组学技术结合生物信息学技术探究其初步作用机制,为薰衣草精油抑菌制剂的深度开发打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 多重耐药鲍曼不动杆菌菌种ATCC17978购自北京百欧博伟生物技术有限公司,在实验室进行该菌的复苏、培养和保种。

1.1.2 试剂 薰衣草精油购自麦克林公司(中国);胰蛋白胨大豆琼脂和肉汤购自奥博星生物(中国);钾离子测定试剂盒购自建成生物公司(中国);蛋白酶抑制剂Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ、辣根过氧化物酶、磷酸化酶抑制剂购自Merck Millipore公司(美国);DNA提取酚试剂、PAGE银染试剂盒购自Solarbio公司(中国);甲醇、乙腈、TMT标记试剂、蛋白标志物、SYTO-9绿色荧光核酸染料和碘化丙啶(PI)红色荧光核酸染料购自Thermo scientific公司(美国);奶粉、丽春红、甘氨酸、SDS购自Amresco公司(美国);胰蛋白酶购自Promega公司(美国);BCA试剂盒、考马斯亮蓝购自于碧云天公司(中国);2-D Quant试剂盒购自GE Healthcare公司(美国);去泛素化酶抑制剂购自Selleck Chemicals公司(美国);去乙酰化酶抑制剂购自MedChemExpress公司(美国);聚偏氟乙烯、硝酸纤维过滤膜购自Bio-Rad Laboratories公司(美国);苏木素、碘溶液、酒精性伊红均购自贝索生物(中国);磷酸氢二钠购自Aladdin公司(中国);无水乙醇购自重庆川东化工(中国);甲酸购自Fluka公司(美国);乙酸铵、4%甲醛溶液、95%乙醇、蔗糖、无菌0.9%NaCl溶液、0.1%结晶紫溶液均自制。

1.1.3 动物 SPF级BALB/c小鼠,雌性,6~8周龄,体质量18~22 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司提供,饲养于陆军军医大学动物房,自由饮食且12 h/12 h光暗循环。动物实验经陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审查,符合动物伦理和动物福利要求。实验动物生产许可证号为SCXK-PLA-20120011,动物使用许可证为SYXK-PLA-20120031。

1.2 方法

1.2.1 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定 用去离子水配置胰蛋白胨大豆琼脂和胰蛋白胨大豆肉汤,经121 ℃、20 min高压灭菌冷却,制得固体、液体培养基。在灭菌环境下用接种环蘸取一环菌液在固体琼脂培养基上分区划线,恒温37 ℃过夜。挑取复苏后的单个菌落置于含10 mL液体培养基的摇瓶中,在摇床上恒温37 ℃ 220转/min培养4~6 h。活化后的菌落备用。

将$OD_{600\ nm}$=1.0的活化后菌落稀释1 000倍。在96孔板中,薰衣草精油组(1.50、2.25、3.00、4.50、6.00、9.00、12.00 mg/mL)及空白组各加入180 μL稀释后菌液及20 μL上述不同浓度的药物。阴性培养基对照组仅加入200 μL培养基。加样后37 ℃恒温培养24 h,检测$OD_{600\ nm}$。肉眼目测菌液无混浊,且其吸光度数值与阴性培养基对照组背景值的差<0.05,即得到其对应的最低浓度,该浓度为最低抑菌浓度。吸取上述各组样品2 μL,滴加在固体培养基平板中,37 ℃恒温培养24 h,若无细菌生长则对应终浓度即为最低杀菌浓度。

1.2.2 杀菌动力学实验 将$OD_{600\ nm}$=1.0的活化后菌落稀释1000倍,精密吸取菌液1.8 mL置于离心管内,分别加入1.5、3.0、6.0 mg/mL薰衣草精油及空白PBS溶液0.2 mL,置于37 ℃培养箱,分别培养1 min、5 min、15 min、30 min、60 min、90 min、120 min、240 min、360 min、1080 min。每组各样品精密吸取10 μL,用液体培养基连续稀释10倍,并在分6区的固体培养基上依次点样2 μL,恒温37 ℃培养24 h。对培养后的玻璃皿进行菌落计数,测算对数生长曲线。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察药物作用后细菌的存活情况 取“1.2.2”项下3 mg/mL薰衣草精油组和阳性细菌对照组培养120 min后的样品,用6 μmol/L绿色SYTO-9(561 nm)探针标记活细胞,30 μmol/L红色PI(488 nm)探针标记死细胞,25 ℃,15 min。通过共焦激光扫描显微镜成像,在488 nm和561 nm波长下测定细菌活性。使用Image J软件计算细菌死亡和存活比值。

1.2.4 小鼠感染模型的药效学试验 随机将小鼠分为3组,分别为创伤感染对照组、3 mg/mL和6 mg/mL薰衣草精油组,腹腔麻醉后背部脱毛处理,形成15 mm×15 mm的面积伤口暴露皮肤,立即感染$OD_{600\ nm}$=1.5的菌液100 μL,固定小鼠30 s后放回鼠笼;在首次感染8 h后进行二次感染;感染完成后每日给药2次,每次50 μL,连续14 d。在感染后的1、3、5、7和14 d测量所有小鼠创伤面积,计算所有小鼠相对于第1天的相对创伤面积,并拍照记录,观察烧伤部位的结痂、脱痂、完全恢复的时间。同时在感染后1、3、5和7 d,用干净无菌棉签分别在所有小鼠背部搔刮20下,迅速浸于装有1 mL无菌生理盐水的离心管中,随后将菌液用无菌生理盐水分别稀释0、10、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6倍,每个稀释倍数取2 μL滴于TSA平板,在37 ℃恒温培养箱中培养24 h,进行菌落计数。上述模型感染后14 d,取样进行HE染色切片观察,即处死后剪取创伤部结痂及周围部分皮肤,4%多聚甲醛固定1 d,脱水、包埋、切片、染色并封片观察。

1.2.5 生物膜形成的抑制能力和清除能力测定 将$OD_{600\ nm}$=1.0的活化后菌落稀释100倍,稀释的培养基添加0.3%蔗糖的液体培养基。在24孔板中加入

1.8 mL 菌液,并各加入 3 mg/mL 薰衣草精油、空白 PBS 溶液 0.2 mL,37 ℃恒温培养 48 h。弃去上清液后,用无菌 0.9% NaCl 溶液漂洗 3 次。室温风干后每孔加入 200 μL 4%甲醛溶液固定 30 min。弃去溶液后,经室温风干、反复漂洗、再进行风干。每孔加入 200 μL 0.1%结晶紫溶液,静置 10 min 后用无菌 0.9% NaCl 溶液漂洗至无色。晾干后每孔加 200 μL 95%乙醇充分溶解,取 100 μL 转移至 96 孔板中,检测 $OD_{600\ nm}$,量化生物膜形成的抑制能力。同时,经预实验确定选用 6 mg/mL 薰衣草精油、空白 PBS 溶液 0.2 mL 按上述方法干预 4 h,检测 $OD_{600\ nm}$,量化生物膜形成的清除能力。

另取干预后的生物膜样品,弃上层培养液,用无菌生理盐水清洗三次。用 30 μmol/L PI 和 6 μmol/L SYTO-9 染色,25 ℃,15 min。通过共焦激光扫描显微镜成像,在 488 nm 和 561 nm 波长下测定细菌活性。使用 Image J 软件计算细菌死亡和存活比值。

1.2.6 DNA、蛋白质和钾离子泄漏量检测 将 $OD_{600\ nm}$=1.0 的活化后菌落稀释 1 000 倍,在 24 孔板中加入 1.8 mL 菌液,并各加入 3 mg/mL、6 mg/mL 的薰衣草精油和空白 PBS 溶液 0.2 mL,37 ℃恒温培养,并在 1 h、2 h、4 h 分别取各组菌液 200 μL,6 000×g 离心 5 min,取 5 μL 上清液,加入 200 μL 生理盐水。用 NanoDrop 核酸蛋白仪器测定 $OD_{260\ nm}$ 及 $OD_{280\ nm}$。依据仪器内定程序测算 DNA、蛋白质泄漏量。另取细菌上清液稀释 3 倍,按南京建成生物科技有限公司的钾离子试剂盒的说明书操作进行测定。

1.2.7 UPLC-MS/MS 串联质谱分析 取“1.2.6”项下用于钾离子泄漏量检测的两组样品,分别加入样本粉末 4 倍体积裂解缓冲液(1% SDS,1%蛋白酶抑制剂),超声裂解送至杭州景杰生物科技股份有限公司,进行 TMT 定量蛋白组学测定。4 ℃,12 000×g 离心 10 min,上清液转移至新的离心管,利用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。取各样品等量蛋白进行酶解。胰酶酶解的肽段用 Strata X C18(Phenomenex)除盐后真空冷冻干燥。用 0.5 mol TEAB 溶解肽段,根据 TMT 试剂盒操作说明标记肽段。简单的操作如下:标记试剂解冻后用乙腈溶解,与肽段混合后室温孵育 2 h,标记后的肽段混合后除盐,真空冷冻干燥。

肽段用高 pH 反相 HPLC 分级,色谱柱为 Agilent 300Extend C18(5 μm 粒径,4.6 mm 内径,250 mm 长),肽段分级梯度为 8%~32%乙腈、pH=9,60 min 时间分离 60 个组分,随后肽段合并为 9 个组分,合并后的组分经真空冷冻干燥后,经含 0.1%甲酸和 2%乙腈的水溶液溶解后使用 EASY-nLC 1200 超高效液相系统进行分离。肽段分离后被注入 NSI 离子源中进行电离,开展 Q Exactive HF-X 质谱分析,相关二级质谱数据使用 Maxquant(v1.6.15.0)数据库进行检索,识别蛋白信息,为后续生物信息学研究做铺垫。

1.2.8 生物信息学分析 基于两组样本中的蛋白相对定量值,进行统计分析,明确差异蛋白分布。针对筛选出的差异蛋白进行 GO 二级分类、COG/KOG 分类和 KEGG 通路分类分析,其中 GO 二级分类主要分为生物过程、细胞组分、分子功能三大类,COG/KOG 分类主要包括胞内过程与信号、信息储存和处理、代谢特征、特征不明四大类,KEGG 通路分类主要包括胞内过程、环境信息处理、代谢特征、有机系统四大类。同时将差异上调和差异下调蛋白的分类结果进行对比展示,并开展差异蛋白功能的 GO、KEGG、蛋白结构域富集分析。

1.2.9 统计分析 实验数据采用 CrapPad Prism 8.0 软件处理,其结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。在筛选差异蛋白时,采用两组间独立 t 检验,具有统计学意义后以差异表达量变化超过 1.3 作为显著上调的变化阈值,小于 1/1.3 作为显著下调的变化阈值。a 表示 P<0.05;b 表示 P<0.01;c 表示 P<0.001。

2 结果

2.1 薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的抗菌作用

最低抑菌浓度和最低杀菌浓度测定可确定薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的抗菌能力,结果见图 1A。在最低抑菌浓度的测定中,600 nm 下 OD 值结果显示,阴性孔 $OD_{600\ nm}$<0.1,阳性孔 $OD_{600\ nm}$>0.1,表明实验未被污染且细菌活性较好。2.25 mg/mL 剂量下的薰衣草精油时即可产生抑菌效应(P<0.01),6.00 mg/mL 薰衣草精油则为最低抑菌浓度(P<0.001)。在最低杀菌浓度测定结果见图 1B,可以看到薰衣草精油浓度≥6.00 mg/mL 时未见菌斑,细菌几乎全部杀死,而阳性细菌对照组出现明显的细菌菌斑。最低抑菌和最低杀菌试验结果表明,薰衣草精油对鲍曼不动杆菌具有显著的抑制和杀死作用。

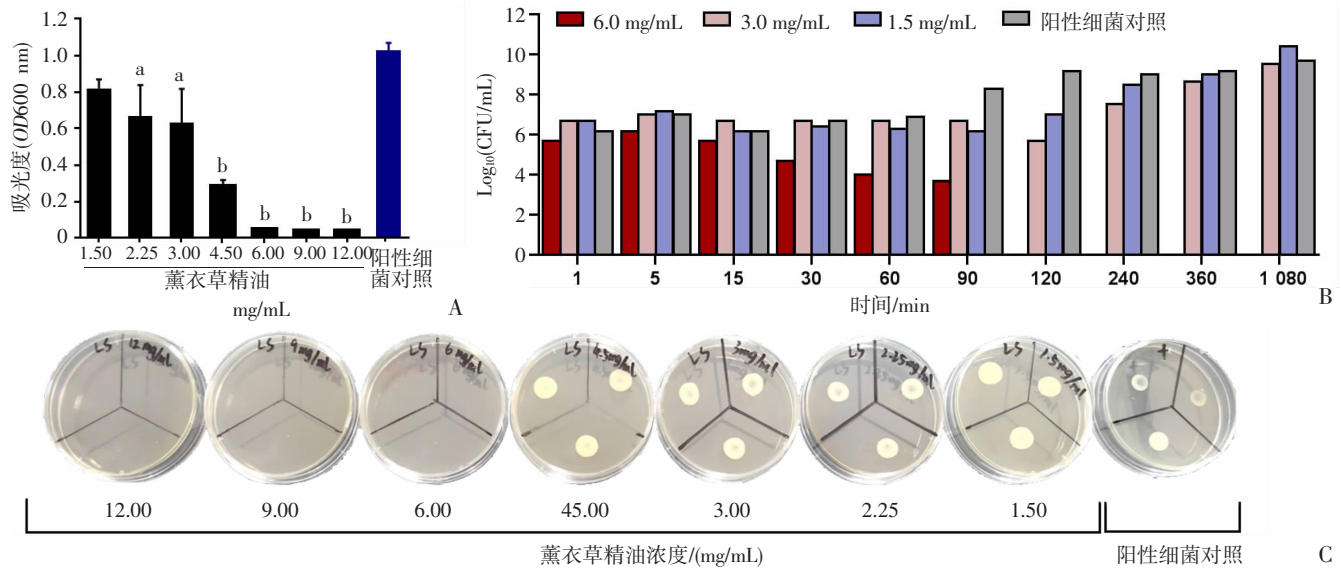
杀菌动力学检测结果,可判断薰衣草精油的起效和维持时间。杀菌动力学检测结果见图 1C,显示薰衣草精油具有剂量依赖效应和时间依赖效应。6.00 mg/mL 薰衣草精油在 120 min 可杀死几乎所有鲍曼不动杆菌。同时,低浓度的 1.50 mg/mL 和 3.00 mg/mL 薰衣草精油能抑制细菌生长,维持时间为 2 h。

由图 2A-C 可知,在激光共聚焦显微镜 10 倍视野下,与未给药干预的情况相比,3 mg/mL 剂量的薰衣草精油均显示出更强的红色荧光和较弱的绿色荧光,表

明鲍曼不动杆菌活性较低。其中,在 10 倍视野下 3 mg/mL 剂量薰衣草精油的细菌死亡和存活比均值为(1.356 9±0.007 2),阳性细菌对照的细菌死亡和存活比均值为(0.607 0±0.048 0),3 mg/mL 薰衣草精油抗菌能力是未给药干预的 2.235 4 倍(P<0.001),见图 2D。

2.2 薰衣草精油清除鲍曼不动杆菌并促进感染创口愈合的研究

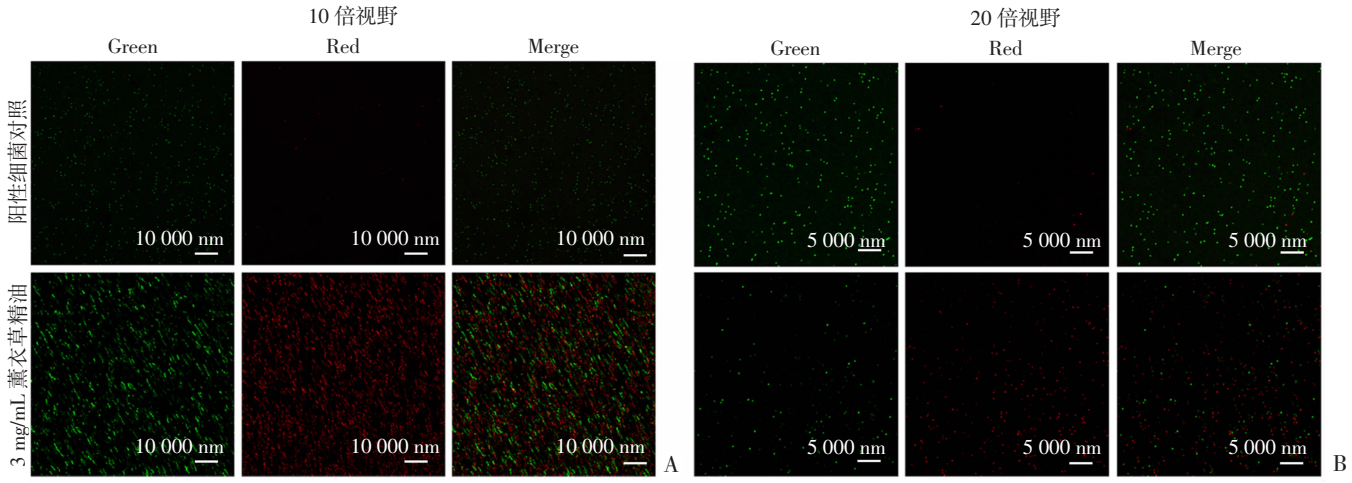
测定小鼠感染模型的愈合速度和进程,可深入评价薰衣草精油清除鲍曼不动杆菌并促进感染后创口愈合的效果。由图 3A 可知,上述两剂量薰衣草精油在给药后第 3 天已具有明显加速清除细菌定植量的效果(P<0.001),提示该精油可能已在给药后第 3 天开始发挥治疗效果。由图 3B、3C 可知,3 mg/ml、6 mg/ml 剂量下的薰衣草精油可加速创伤面积缩小,在给药后第五天与阳性细菌对照组相比具有统计学意义(P<0.001;P<0.01)。由图 3D 的 HE 染色结果可知,阳性细菌对照组无正常组织结构,且有大量炎症细胞聚集,而两剂量薰衣草精油组的皮肤连续性相对较好,伤口显示出轻微的炎症反应,炎症细胞很少,呈散在分布,具有较好的促进创口愈合作用。



A:不同浓度薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的最低抑菌浓度;B:薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的杀菌动力学;C:薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的最低杀菌浓度

与阳性细菌对照比,a:P<0.01,b:P<0.001

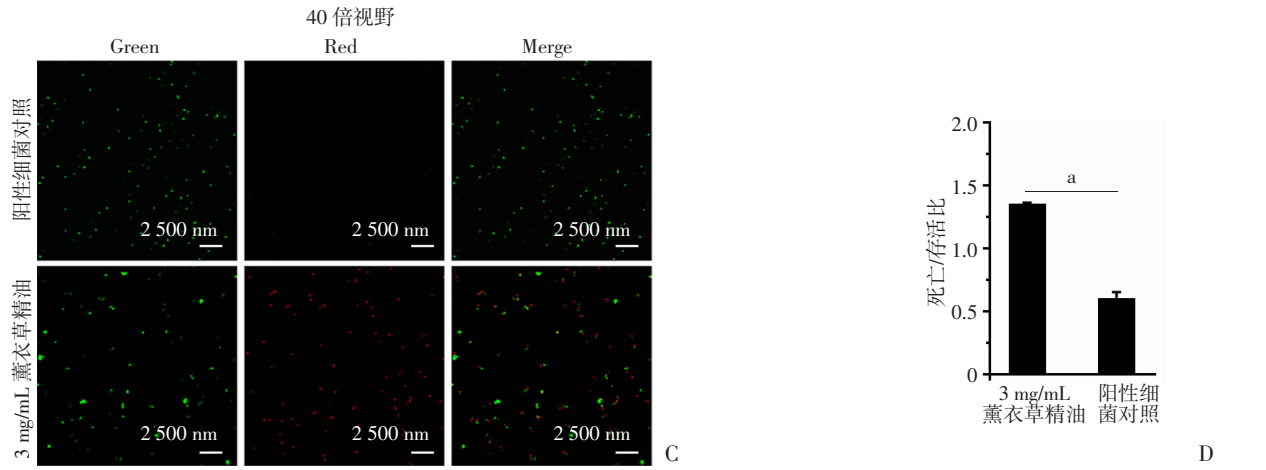
图 1 薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的抗菌作用



A-C:分别在 10 倍、20 倍、40 倍视野下观察药物作用后细菌的存活荧光情况

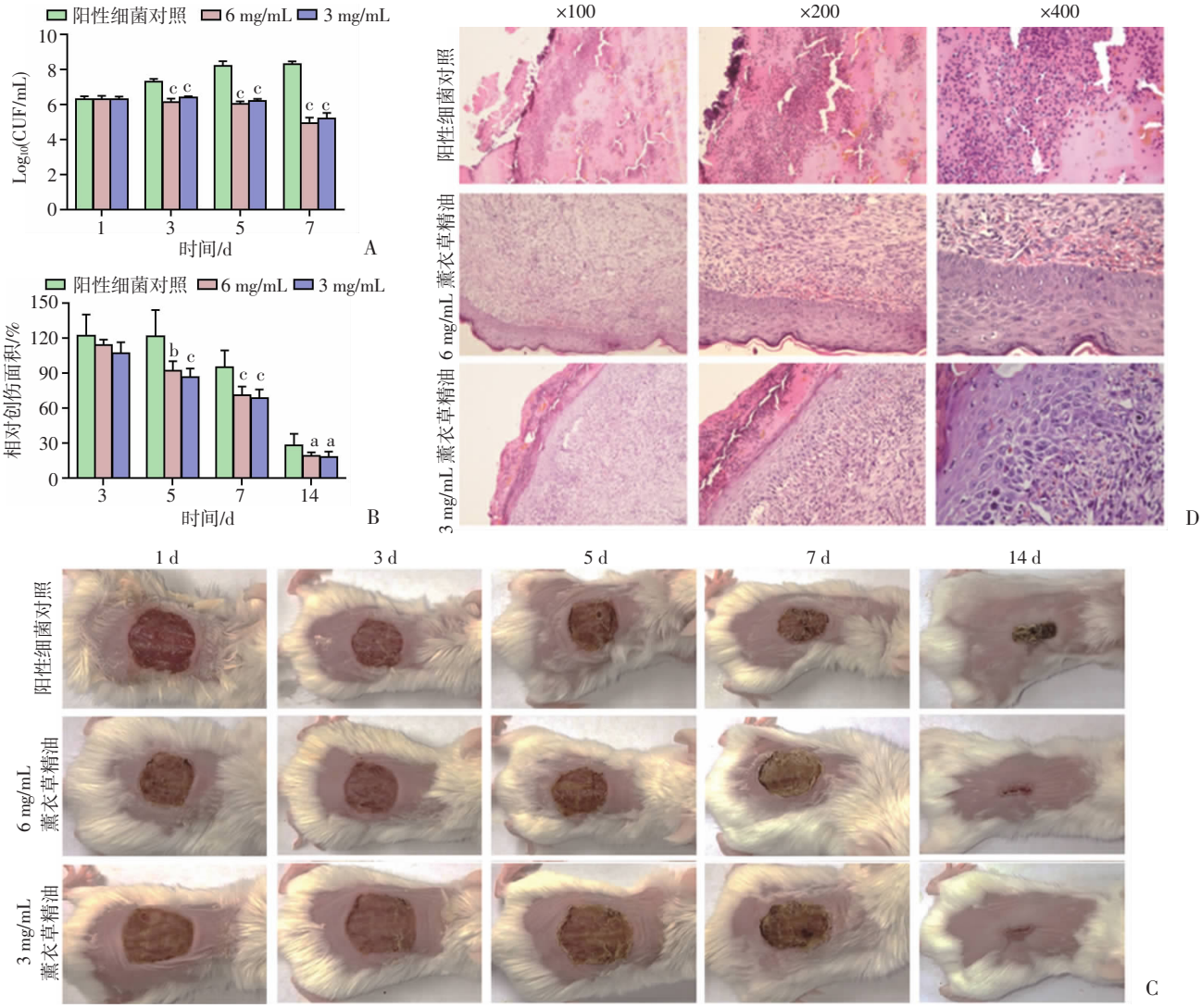
图 2 激光共聚焦显微镜不同视野下观察药物作用后细菌的存活情况

(图 2C、D 续下页)



A-C:分别在 10 倍、20 倍、40 倍视野下观察药物作用后细菌的存活荧光情况;D:10 倍视野下 3 mg/mL 薰衣草精油与阳性细菌对照间的细菌死亡和存活比 a:$P<0.001$,与阳性细菌对照比

续图 2 激光共聚焦显微镜不同视野下观察药物作用后细菌的存活情况



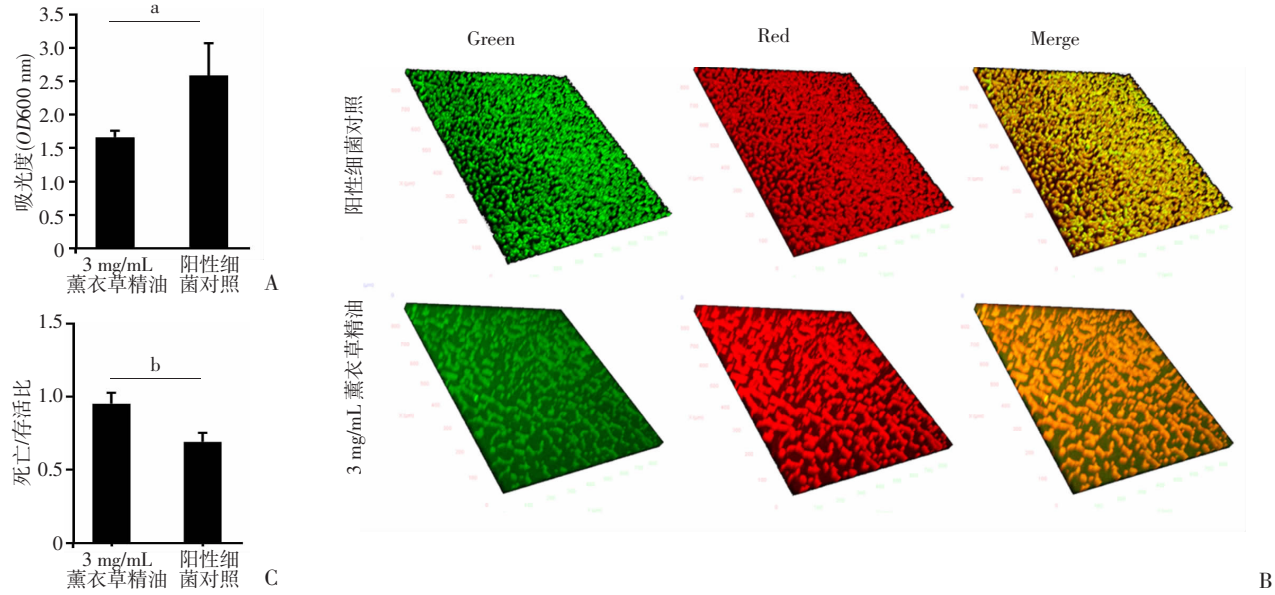
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与阳性细菌对照比

A:小鼠感染模型细菌定植量结果;B:小鼠感染模型伤口平均愈合面积变化;C:小鼠感染模型创伤愈合大体代表图;D:皮肤 HE 染色观察结果

图 3 薰衣草精油体内药效学结果

2.3 薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的生物膜抑制及清除作用

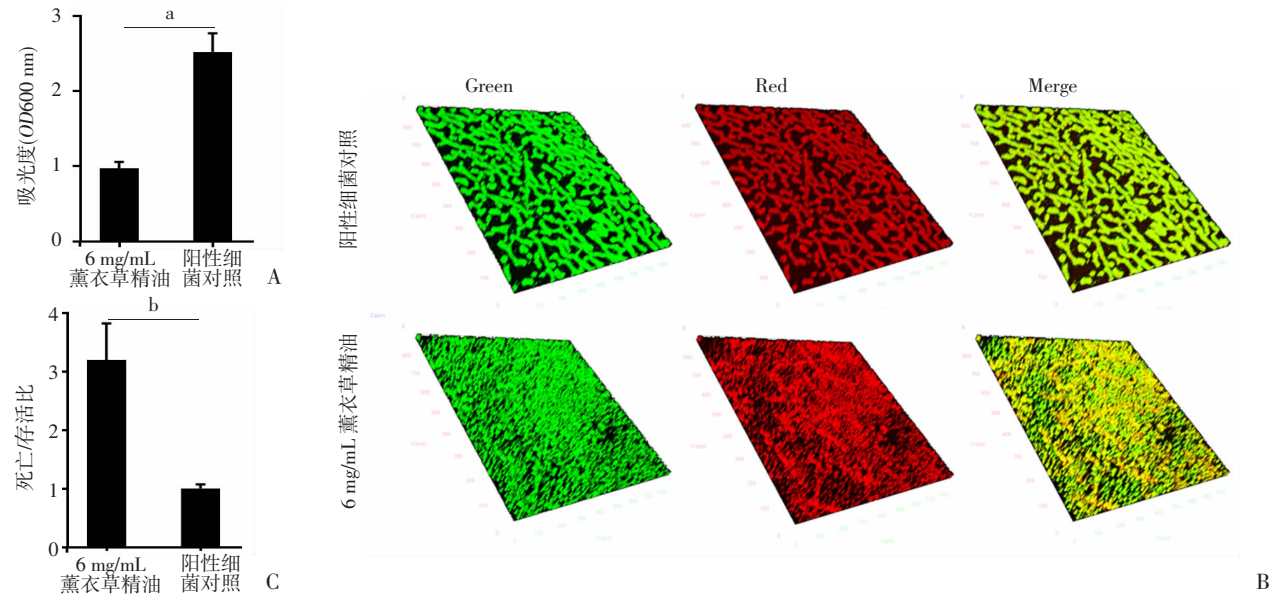
生物膜抑制和清除能力的测定结果,见图4、图5。生物膜抑制结果图4A证实,3 mg/mL薰衣草精油组的生物膜量明显低于阳性细菌对照组($P<0.05$),同时在激光共聚焦显微镜10倍视野下,干预后的细菌显示出了更强的红色荧光和较弱的绿色荧光,细菌死亡和存活比有统计学差异($P<0.01$),见图4B、图4C。上述结果表明3 mg/mL薰衣草精油具有一定的鲍曼不动杆菌生物膜抑制作用。生物膜清除结果图5A所示,6 mg/mL薰衣草精油组展现了对鲍曼不动杆菌生物膜的清除作用($P<0.001$);激光共聚焦显微镜的三维成像也证实了这一结果,两组间细菌死亡和存活比差异明显($P<0.01$),见图5B、图5C。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与阳性细菌对照比

A:生物膜形成抑制情况测定;B:激光共聚焦显微镜10倍视野下观察细菌生物膜抑制情况;C:生物膜抑制后10倍视野下3 mg/mL薰衣草精油与阳性细菌对照间的细菌死亡和存活比

图4 薰衣草精油对鲍曼不动杆菌生物膜形成的抑制情况



a:$P<0.01$;b:$P<0.001$,与阳性细菌对照比

A:生物膜清除情况测定;B:激光共聚焦显微镜10倍视野下观察细菌生物膜清除情况;C:生物膜清除后10倍视野下6 mg/mL薰衣草精油与阳性细菌对照间的细菌死亡和存活比

图5 薰衣草精油对鲍曼不动杆菌生物膜清除情况

2.4 薰衣草精油促进鲍曼不动杆菌的DNA、蛋白质和钾离子泄漏

DNA核酸和蛋白质的泄漏量可初步确定薰衣草精油对鲍曼不动杆菌的抗菌机理。结果图6A、图6B表明,作用1 h时,3 mg/mL薰衣草精油组的细菌DNA、蛋白质泄漏量已明显高于阳性细菌对照组。当作用4 h后,3 mg/mL与6 mg/mL薰衣草精油组的细菌DNA、蛋白质泄漏量已显著高于阳性细菌对照组($P<0.05$)。上述结果表明,薰衣草精油可作用细胞膜,促使膜内DNA、蛋白质泄漏。

钾离子泄漏量同样也可以评价鲍曼不动杆菌生物膜的完整性。结果证实,在培养1 h时,3 mg/mL的薰衣草精油组的钾离子泄漏浓度明显高于阳性细菌对照组的对应浓度($P<0.01$),且随时间延长呈递增状态(图6C),表明薰衣草精油具有促进钾离子外流的作用。

2.5 薰衣草精油干预鲍曼不动杆菌后的差异蛋白鉴定及其蛋白功能分类

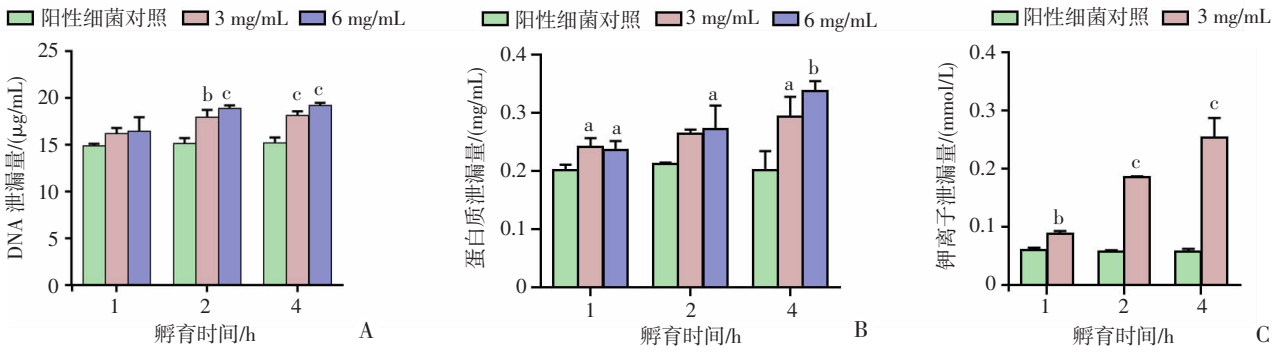
经UPLC-MS/MS串联质谱分析,结果见图7A,发现与阳性细菌对照组相比,薰衣草精油组显著上调的蛋白数量71个,显著下调的蛋白数量为67个。组间差异在GO、COG/KOG、KEGG数据库中蛋白功能分类由图7B、图7C、图7D可知。从生物过程分析,薰衣草精油主要通过影响鲍曼不动杆菌的细胞代谢过程和有机物代谢过程,尤其是破坏脂质运输和代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢等来发挥抗菌作用;从胞内结构看,薰衣草精油可干扰细胞壁/膜/包膜等结构的生物合成;从分子功能层面看,薰衣草精油的抗菌作用机制可能与调节氧化还原酶活性、破坏有机环状化合物和杂化化合物结合有关。

组间差异蛋白的功能富集分析进一步明确了薰衣草精油的作用机制,结果见图8A、8B、8C、8D。结果发现,薰衣草精油的抗菌作用主要可能与一元羧酸代谢及分解过程、非核糖体肽生物合成过程、含儿茶酚的生物合成过程有关,对氧化还原酶、酸性氨基酸连接酶活性、2,3-二羟基苯甲酸-丝氨酸连接酶活性有调节作用,并影响血红素、四吡咯、黄素腺嘌呤二核苷酸的结合。

3 讨论

已有研究[17]表明,薰衣草精油通过GC-MS分析技术鉴定出40种化合物,占全部挥发油总成分的92.03%,其中含氧单萜类化合物占比31.53%、酯类化合物占比43.23%、含氧单萜类化合物占比8.03%、倍半萜类化合物占比3.61%、含氧倍半萜类化合物占比4.54%,其他化合物含量较少,约为1.14%。就单体化合物含量来说,含氧单萜芳樟醇占比可达19.71%,乙酸芳樟醇占比可达26.61%,是薰衣草精油的主要成分。

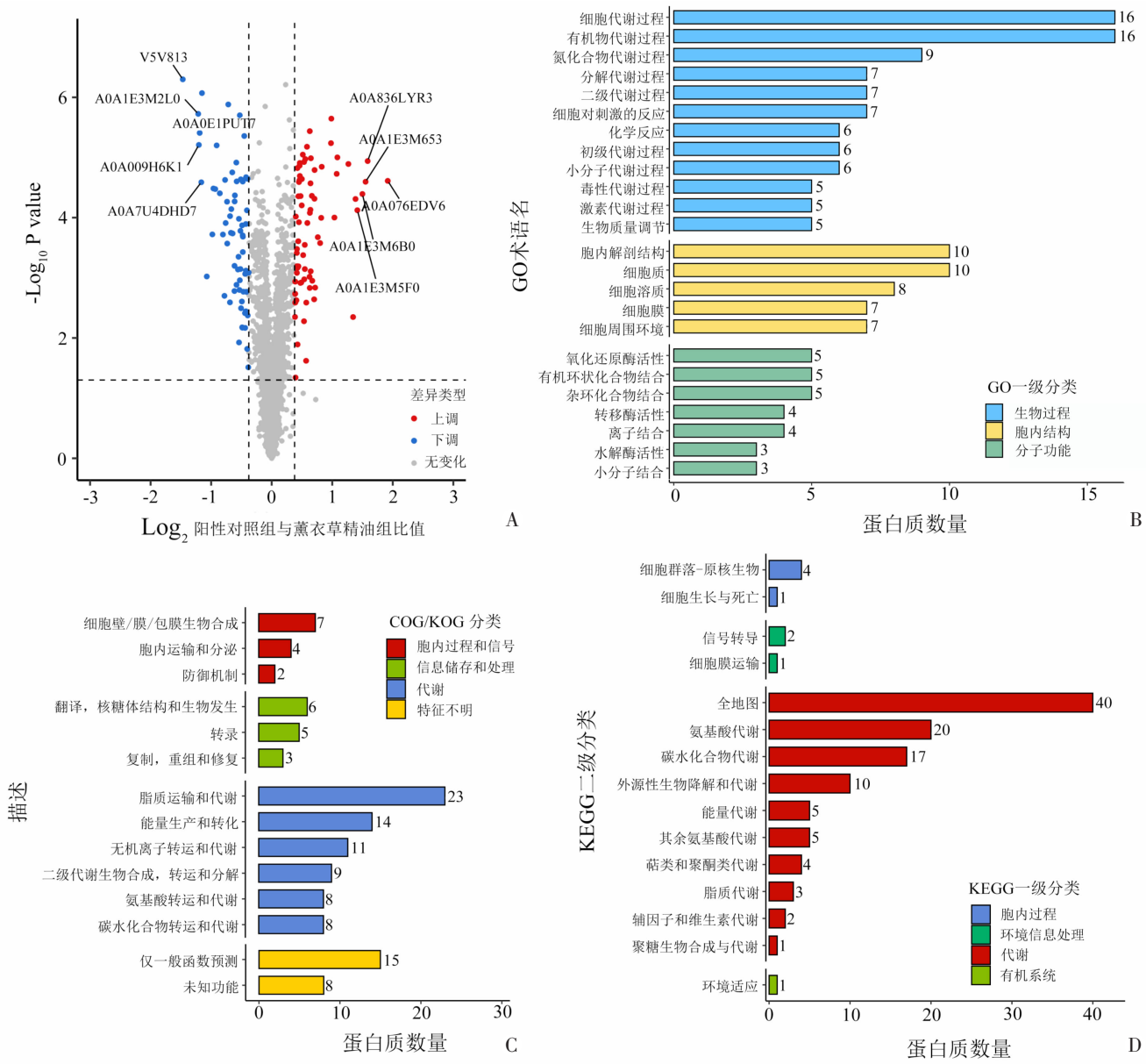
薰衣草精油在对细菌、真菌的抑制作用较为显著,且对白色念珠菌、棉花枯萎细菌、表面葡萄球菌等均有作用。但目前主要机制却鲜有报道。HAN等[18]发现,薰衣草精油可以诱导单核细胞增生李斯特菌(一种典型的食源性致病菌)进入存活但非培养的状态,且1.6%含量即可完全抑制细菌生长。进一步研究证实,薰衣草精油可显著降低单核细胞增生李斯特菌生物膜的生物量和代谢活性,与本研究中干扰细菌正常代谢,尤其是影响脂质代谢的发现一致。因此推测薰衣草精油的主要抗菌机制与生物膜抑制与清除密切相关,可能是潜在的抗生物膜剂。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与阳性细菌对照比

A:薰衣草精油对鲍曼不动杆菌DNA泄漏量的影响;B:薰衣草精油对鲍曼不动杆菌蛋白质泄漏量的影响;C:薰衣草精油对鲍曼不动杆菌钾离子泄漏情况的影响

图6 薰衣草精油对鲍曼不动杆菌DNA、蛋白质和钾离子泄漏量的影响

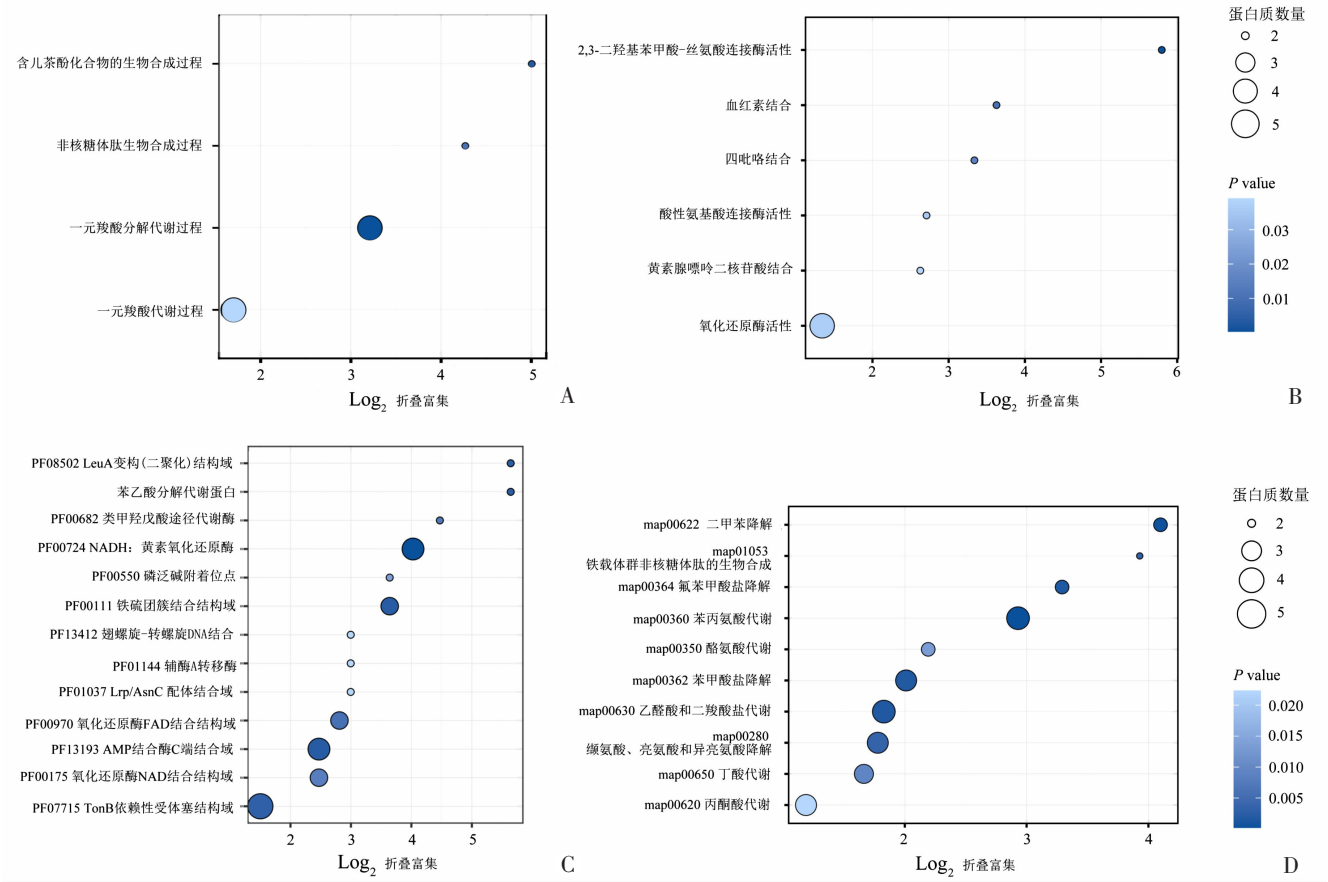


A:薰衣草精油组与阳性细菌对照组的组间差异蛋白鉴定;B:组间差异蛋白在 GO 数据库中对应的功能分类;C:组间差异蛋白在 COG/KOG 数据库中对应的功能分类;D:组间差异蛋白在 KEGG 数据库中对应的功能分类

图 7 差异蛋白鉴定及其在 GO、COG/KOG、KEGG 数据库中蛋白功能分类

此外,YANG 等人[19]研究了薰衣草精油联合美罗培南抑制细菌生长的可行性,发现薰衣草精油可诱导肺炎克雷伯菌产生氧化应激,氧化外层生物膜,使薰衣草精油和美罗培南流入细菌胞体内,从而产生两药协同作用,造成细胞损伤并最终死亡。上述研究进一步证实了薰衣草精油中主要活性成分对细菌生物膜的潜在作用机制。此外,薰衣草精油也可以与樟脑精油、哌拉西林、氯霉素、环丙沙星、制霉菌素和夫西地酸等产生协同抗菌作用[20-22]。在本文中,3 mg/mL 薰衣草精油即可有效抑制多重耐药鲍曼不动杆菌的细菌活性,6 mg/mL 即可产生杀伤作用,且其对细胞生物膜抑制、清除有显著活性,与 DNA 核酸、蛋白质、钾离子的泄露量呈正相关趋势。值得注意的是,多重耐药鲍曼不动杆菌作为革兰阴性条件致病菌的一类,常因在危重病人中引起院内形成感染而臭名昭著,其在成功附着于宿主细胞表面后就开始迅速形成生物膜以表达多种毒力因子[23],因此基于生物膜结构破坏的潜在作用机制可能对该类病菌的抑制和消除更有利,本研究也为深入探究精油抑菌的作用机制提供依据。

综上所述,薰衣草精油具有良好的抗菌疗效,应用前景广泛,本研究为相关产品开发打下坚实基础。



A:组间差异蛋白在 GO 数据库中对应的生物过程富集分析;B:组间差异蛋白在 GO 数据库中对应的分子功能富集分析;C:组间差异蛋白的相关蛋白结构域富集分析;D:组间差异蛋白在 KEGG 数据库中对应的功能富集分析

图 8 差异蛋白功能富集分析

参考文献:

[1] PARK N, PARK S J, KIM M H, *et al*. Efficacy and mechanism of essential oil from *Abies holophylla* leaf on airway inflammation in asthma: Network pharmacology and *in vivo* study[J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153898. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153898.

[2] TIAN F, WOO S Y, LEE S Y, *et al*. Antifungal activity of essential oil and plant-derived natural compounds against *Aspergillus flavus*[J]. Antibiotics (Basel), 2022, 11(12): 1727. DOI: 10.3390/antibiotics11121727.

[3] CANCHÉ-COLLÍ C, ESTRELLA-MALDONADO H, MEDINA-MEDINA L A, *et al*. Effect of yeast and essential oil-enriched diets on critical determinants of health and immune function in Africanized *Apis mellifera*[J]. PeerJ, 2021, 9: e12164. DOI: 10.7717/peerj.12164.

[4] XYLIA P, CHRYSARGYRIS A, TZORTZAKIS N. The combined and single effect of marjoram essential oil, ascorbic acid, and chitosan on fresh-cut lettuce preservation[J]. Foods, 2021, 10(3): 575. DOI: 10.3390/foods10030575.

[5] 丁桃, 胥玉林, 涂梦婷, 等. 芳香疗法临床应用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(07): 226-230. DOI: 10.119541/ytctyy.202307046.
DING T, XU Y L, TU M T, *et al*. Research progress of clinical application of aromatherapy[J]. Asia-Pac Trad Med, 2023, 19(07): 226-230. DOI: 10.119541/ytctyy.202307046.

[6] 邢丽媛, 李慧婷, 万娜, 等. 中药精油在临床应用中的风险控制问题分析[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2458-2464. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.031.
XING L Y, LI H T, WAN N, *et al*. Analysis on risk control of traditional Chinese medicine essential oil in clinical application[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(8): 2458-2464. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.031.

[7] LÓPEZ V, NIELSEN B, SOLAS M, *et al*. Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 280. DOI: 10.3389/fphar.2017.00280.

[8] YAP W S, DOLZHENKO A V, JALAL Z, *et al*. Efficacy and safety of lavender essential oil (Silexan) capsules among

patients suffering from anxiety disorders: a network meta-analysis[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18042. DOI: 10.1038/s41598-019-54529-9.

[9] DONG G Y, BAI X H, AIMILA A, *et al*. Study on lavender essential oil chemical compositions by GC-MS and improved pGC[J]. Molecules, 2020, 25(14): 3166. DOI: 10.3390/molecules25143166.

[10] 赵鑫, 鲍其泠, 王改香. 薰衣草精油成分分析及其抗菌和抗氧化活性研究[J]. 日用化学品科学, 2013, 36(4): 32-34, 43.
ZHAO X, BAO Q L, WANG G X. Analysis of *Lavandula angustifolia* essential oil and its anti-microbial and anti-oxidant effectiveness[J]. Deterg Cosmet, 2013, 36(4): 32-34, 43.

[11] 林鹏飞, 邓榕榕, 祁燕, 等. 薰衣草精油体外抗菌作用研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(6): 793-797. DOI: 10.16809/j.cnki.2096-3653.2017101603.
LIN P F, DENG R R, QI Y, *et al*. Study on the antibacterial action of lavender essential oil [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2017, 33(6): 793-797. DOI: 10.16809/j.cnki.2096-3653.2017101603.

[12] 刘璇, 邵玉龙, 吴泽钰, 等. 薰衣草精油对白念珠菌体外抗菌活性及生物膜的影响[J]. 中国真菌学杂志, 2016, 11(5): 272-274. DOI: 10.3969/j.issn.1673-3827.2016.05.005.
LIU X, SHAO Y L, WU Z Y, *et al*. *In vitro* antifungal activity of lavender essential oil and its effect on biofilm of *Candida albicans*[J]. Chin J Mycol, 2016, 11(5): 272-274. DOI: 10.3969/j.issn.1673-3827.2016.05.005.

[13] 刘凡, 李敏, 顾爱星, 等. 薰衣草精油对几种植物病原菌的抑菌作用[J]. 新疆农业科学, 2017, 54(5): 938-944.
LIU F, LI M, GU A X, *et al*. Preliminary study on bacteriostasis of lavender essential oil to several plant pathogens[J]. Xinjiang Agric Sci, 2017, 54(5): 938-944.

[14] ROLLER S, ERNEST N, BUCKLE J. The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA)[J]. J Altern Complement Med, 2009, 15(3): 275-279. DOI: 10.1089/acm.2008.0268.

[15] TIKU V. *Acinetobacter baumannii*: virulence strategies and host defense mechanisms[J]. DNA Cell Biol, 2022, 41(1): 43-48. DOI: 10.1089/dna.2021.0588.

[16] 汪浩, 吉丽娟, 陈访, 等. 危重症患者导管相关血流感染病原菌耐药性及影响因素分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(1): 88-91. DOI: 10.13350/j.cjpb.240118.
WANG H, JI L J, CHEN F, *et al*. Drug resistance and influencing factors of pathogens causing catheter-related bloodstream infection in critically ill patients[J]. J Pathog Biol, 2024, 19(1): 88-91. DOI: 10.13350/j.cjpb.240118.

[17] WEI M Y, LIU F, RAKA R N, *et al*. *In vitro* and in silico analysis of 'Taikong blue' lavender essential oil in LPS-induced HaCaT cells and $RAW_{264.7}$ murine macrophages [J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1): 324. DOI: 10.1186/s12906-022-03800-0.

[18] HAN X, CHEN Q, ZHANG X, *et al*. The elimination effects of lavender essential oil on *Listeria monocytogenes* biofilms developed at different temperatures and the induction of VBNC state[J]. Lett Appl Microbiol, 2022, 74(6): 1016-1026. DOI: 10.1111/lam.13681.

[19] YANG S K, YUSOFF K, THOMAS W, *et al*. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 819. DOI: 10.1038/s41598-019-55601-0.

[20] KARACA N, ŞENER G, DEMIRCI B, *et al*. Synergistic antibacterial combination of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil with camphor[J]. Z Naturforsch C J Biosci, 2021, 76(3/4): 169-173. DOI: 10.1515/znc-2020-0051.

[21] YAP P S, KRISHNAN T, YIAP B C, *et al*. Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(5): 1119-1128. DOI: 10.1111/jam.12444.

[22] RAPPER S D, VILJOEN A, VAN VUUREN S. The *in vitro* antimicrobial effects of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with conventional antimicrobial agents[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 2752739. DOI: 10.1155/2016/2752739.

[23] MEA H J, YONG P V C, WONG E H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation [J]. Microbiol Res, 2021, 247: 126722. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126722.

(**收稿**:2024-05-10;**修回**:2024-08-01)

(编辑 邓强庭)