

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.07.09

茯苓多糖联合恩诺沙星体内外抗菌活性评价

黄松¹, 崔明旭^{1*}, 刘爱玲¹, 武晓英³, 史德胜¹, 王一凡¹, 栗栖凤¹, 李守军², 曹贵东⁴

(1. 瑞普(天津)生物药业有限公司, 天津 300300; 2. 天津瑞普生物技术股份有限公司, 天津 300308;

3. 太原师范学院生物系, 山西晋中 030619; 4. 山西瑞象生物药业有限公司, 太原 030032)

[收稿日期] 2020-02-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 07-0055-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 通过体内外抑菌试验考察茯苓多糖和恩诺沙星联合抗菌的生物活性。采用二倍稀释法测定茯苓多糖联合恩诺沙星对浮游菌的最小抑菌浓度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC), MTT 法检测茯苓多糖联合恩诺沙星对细菌生物膜 (bacterial biofilm, BBF) 的抑制作用, 同时腹腔注射 SA 建立小鼠腹腔感染模型, 并在此基础上, 通过腹腔给药的方式, 检测茯苓多糖联合恩诺沙星在体内抑制 SA 的效果。在体外抑制浮游菌的试验中, 茯苓多糖联合恩诺沙星对鸡 BSA 的 MIC 为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以恩诺沙星计); 茯苓多糖联合恩诺沙星对 SA 的 MIC 为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以恩诺沙星计); 茯苓多糖联合恩诺沙星对 *E. coli* 的 MIC 为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (以恩诺沙星计); 在体外抑制细菌生物膜的试验中, 茯苓多糖可以改善恩诺沙星清除细菌生物膜的能力; 在治疗小鼠腹腔感染试验中, 茯苓多糖可以使恩诺沙星抑制 SA 的活性增强。结果表明, 茯苓多糖具有增强恩诺沙星抗菌能力的作用, 有效减少恩诺沙星的使用剂量。

[关键词] 茯苓多糖; 恩诺沙星; 生物膜; 腹腔感染

Antibacterial Activity Evaluation of Pachymaran Combined with Enrofloxacin *in vivo* and *in vitro*

HUANG Song¹, CUI Ming-xu^{1*}, LIU Ai-ling¹, WU Xiao-ying³, SHI De-sheng¹,WANG Yi-fan¹, LI Qi-feng¹, LI Shou-jun², CAO Gui-dong⁴

(1. Ringpu (Tianjin) Bio-Pharmacy Co., Ltd, Tianjin 300300, China; 2. Tianjin Ringpu Bio-technology Co., Ltd, Tianjin 300308, China;

3. Department of Biology, Taiyuan Normal University, Jinzhong, Shanxi 030619, China;

4. Shanxi Ruixiang Bio-pharmaceutical Co., Ltd, Taiyuan 030032, China)

Corresponding author: CUI Ming-xu, E-mail: 18292819379@163.com

Abstract: *In vivo* and *in vitro* combined medicine sensitivity test was used to detect the antibacterial activity of pachymaran and enrofloxacin. The minimum inhibitory concentration for pachymaran and enrofloxacin and their joint action against floating bacteria *in vitro* were determined by double dilution method. According to the results

作者简介: 黄松, 高级工程师, 从事中药技术研发、生产管理、项目研究与管理等工作。

通讯作者: 崔明旭。E-mail: 18292819379@163.com

of MIC, the inhibitory effect of pachymaran combined with enrofloxacin on bacterial biofilm was detected by MTT method. At the same time, the model of abdominal infection in mice was established by intraperitoneal injection of SA. On this basis, the inhibition effect of pachymaran combined with enrofloxacin on SA *in vivo* was detected by intraperitoneal administration. *In vitro* experiment of inhibiting BSA floating bacteria, the MIC of pachymaran combined with enrofloxacin was 16 $\mu\text{g/mL}$ (measured by enrofloxacin); *In vitro* experiment of inhibiting SA floating bacteria, the MIC of pachymaran combined with enrofloxacin was 8 $\mu\text{g/mL}$ (measured by enrofloxacin); *In vitro* experiment of inhibiting *E. coli* floating bacteria, the MIC of pachymaran combined with enrofloxacin was 4 $\mu\text{g/mL}$ (measured by enrofloxacin); *In vitro* experiment of inhibiting BBF, pachymaran could improve the ability of removing BBF by enrofloxacin. In the treatment of abdominal infection in mice, pachymaran increased the activity of enoxacin in inhibiting SA. The results showed that pachymaran could enhance the antibacterial ability of enrofloxacin and effectively reduce the dosage of enrofloxacin.

Key words: pachymaran; enrofloxacin; biofilm; abdominal infection

生物膜是指细菌粘附于接触物表面,分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等,将其自身包绕其中而形成的大量细菌聚集膜样物^[1]。生物膜可以增强细菌生存的抗逆性,使其在接受药物治疗时,产生抗药性,导致疾病不易治愈^[2]。茯苓多糖是一种阳离子多聚糖,通过碱提醇沉法提取自拟层孔菌科真菌茯苓的干燥菌核。通过物理方法分离得到的茯苓多糖具有良好的生物相容性和无毒性^[3]。有文献报导,壳聚糖和抗生素联用,可以增强抗生素对细菌生物膜的清除能力,增强抗生素的杀菌效果^[4-5]。目前,尚未有关于茯苓多糖与抗生素联合使用的报告,在本研究中,评价了茯苓多糖联合恩诺沙星对不同细菌体外和体内的抗菌作用。

1 材料与方法

1.1 仪器 HR40 - II A2 型生物安全柜(青岛海尔);ME204 电子天平(上海梅特勒);ME55 电子天平(上海梅特勒);0.22 μm 过滤器(日本岛津);1 mL 一次性注射器(江苏治宇);G154TW 高压蒸汽灭菌锅(厦门致微);96 孔培养板(美国 Coming);生化培养箱(宁波江南仪器厂);恒温摇床(金坛杰瑞尔);酶标仪(北京普朗);移液器(德国 Eppendorf)。

1.2 材料与试剂 耐药金黄色葡萄球菌(BSA)分离自白羽肉鸡(Brolier),由瑞普(天津)生物药业有限公司谢玲玲分离鉴定并保存于瑞普药物研究院;金黄色葡萄球菌 ATCC 190807(SA)购自美国菌种

保藏中心;大肠杆菌 BNCC 336902(*E. coli*)购自北纳生物公司;茯苓多糖(SJJ)、壳寡糖(COS)和恩诺沙星注射液(ENR)由瑞普(天津)生物药业有限公司生产;4 周龄昆明小白鼠 36 只,购自天津裕达实验动物养殖有限公司;二甲亚砜(DMSO)购自天津博迪;噻唑蓝(MTT)购自上海阿拉丁公司;医用酒精;脱脂棉;其他试剂均为分析纯。

胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB):取 30 g,加入到 1 L 去离子水中,加热煮沸,完全溶解后,分装,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min,待用。

胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA):取 30 g 胰蛋白胨大豆肉汤培养基和 16 g 琼脂,加入 1 L 去离子水,加热煮沸,完全溶解后,分装,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min,在生物安全柜中冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$,无菌操作倒入 9 cm 无菌培养皿中(每个培养皿 20 mL),冷却凝固,待用。培养基均购自北京陆桥公司。

1.3 MIC 的测定

1.3.1 细菌的复苏 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出冻存的菌液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴快速解冻,在 TSA 平板划线培养,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,挑取单菌落一环,接种于 50 mL TSB 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中震荡培养 8 h,转速为 180 r/min,将菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中保存备用^[6]。

1.3.2 二倍稀释法测定 MIC 取 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的菌液,37 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 培养 6 h 后,采用比浊稀释法

用 TSB 将细菌浓度调整到 10^5 CFU/mL,备用^[7]。

在 96 孔板中,将药物 ENR、SJJ + ENR、COS + ENR、SJJ、COS 做二倍稀释,10 个梯度,然后加入 10^5 CFU/mL 的菌液,过夜培养后观察抑菌情况^[8-9]。

1.4 生物膜试验

1.4.1 生物膜的培养 在 96 孔板的每个孔内加入 200 μ L 稀释至 10^8 CFU/mL 的菌液,四周加无菌 PBS,静置在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内,培养 72 h,让细菌形成生物膜^[10]。

1.4.2 药敏试验 形成生物膜后,弃掉培养基,用 0.9% 的 NaCl 溶液清洗 1 次,洗去浮游菌,再加入一定浓度的药物(ENR 为 16,32,64,128 μ g/mL; CHI 为 512 μ g/mL 和 256 μ g/mL)和 TSB 培养基,分为单独用药和联合用药两种,在恒温箱中孵育 24 h^[1]。

1.4.3 MTT 试验 药物处理后,弃掉培养基,用 0.9% 的 NaCl 溶液清洗 3 次,加入 10 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液和 90 μ L 的 TSB 培养基,37 $^{\circ}$ C 静置孵育 3 h 后,然后弃掉培养基,加入 100 μ L DMSO 溶解蓝紫色结晶甲瓚,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光值,吸光值同活菌数量成正比^[1]。

1.5 体内抑菌试验

1.5.1 试验动物及饲养 清洁级健康昆明小白鼠(20 $\pm$ 2)g,4 周龄,共 36 只,同等条件下饲喂,昼夜节律,供给充足的饮水和饲料^[10]。

1.5.2 攻毒菌液的制备 取对数期金黄色葡萄球菌(SA),调整菌液浓度至 10^8 CFU/mL,9000 r/min 离心 10 min,弃去上清培养基,用无菌 PBS 重悬细菌,调整菌液浓度至 5×10^5 CFU/mL,4 $^{\circ}$ C 静置待用^[11]。

1.5.3 小鼠急性感染模型 将试验小鼠随机分为 6 组,每组 6 只,每只小鼠腹腔注射 100 μ L 金黄色葡萄球菌(5×10^5 CFU/mL,无菌 PBS 稀释),24 h 后腹腔注射给药,空白组注射 100 μ L 生理盐水,对照组 1 注射 100 μ L ENR,对照组 2 注射 100 μ L SJJ,对照组 3 注射 100 μ L COS,实验组 1 注射 100 μ L SJJ + ENR,实验组 2 注射 100 μ L COS + ENR,

每天一次,连续给药 2 d^[12]。

1.5.4 小鼠体内细菌载量的测定 最后一次给药 12 h 后,断颈处死小鼠,无菌取肝脏、肾脏和肺脏,称取 0.1 g,加入 1 mL 无菌 PBS 匀浆,稀释适当倍数,取 50 μ L 均匀涂布于 TSA 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,计数 CFU^[10]。

1.6 数据采集和分析 所有数据的分析和显著性差异 *P* 值的计算均采用 GraphPad Prism V6.01 数据分析软件进行,用平均值 $\pm$ 标准偏差 (means $\pm$ SD) 表示,*P* 值小于 0.05 为显著性差异,*P* 值大于 0.05 为无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 MIC 的测定 如表 1 所示,SJJ 在两种浓度下,没有使 ENR 在体外抑制 BSA 的 MIC 降低。

表 1 各种药物对 BSA 的 MIC

Tab 1 MIC of BSA for various medicines	
药物	MIC 值
ENR	16 μ g/mL
SJJ(512 mg/mL) + ENR	16 μ g/mL
SJJ(256 mg/mL) + ENR	16 μ g/mL
COS(512 mg/mL) + ENR	> 128 μ g/mL
COS(256 mg/mL) + ENR	> 128 μ g/mL
SJJ	4096 μ g/mL
COS	> 4096 μ g/mL

如表 2 所示,SJJ 在两种浓度下,没有使 ENR 在体外抑制 SA 的 MIC 降低。

表 2 各种药物对 SA 的 MIC

Tab 2 MIC of SA for various medicines	
药物	MIC 值
ENR	8 μ g/mL
SJJ(512 mg/mL) + ENR	8 μ g/mL
SJJ(256 mg/mL) + ENR	8 μ g/mL
COS(512 mg/mL) + ENR	> 128 μ g/mL
COS(256 mg/mL) + ENR	> 128 μ g/mL
SJJ	4096 μ g/mL
COS	> 4096 μ g/mL

如表 3 所示,SJJ 在两种浓度下,没有使 ENR 在体外抑制 *E. coli* 的 MIC 降低。

表 3 各种药物对 *E. coli* 的 MIC

药物	MIC 值
ENR	4 μg/mL
SJJ(512 mg/mL) + ENR	4 μg/mL
SJJ(256 mg/mL) + ENR	4 μg/mL
COS(512 mg/mL) + ENR	> 128 μg/mL
COS(256 mg/mL) + ENR	> 128 μg/mL
SJJ	4096 μg/mL
COS	> 4096 μg/mL

综上,SJJ 联合 ENR 在体外抑制浮游菌的试验表明,其没有明显的改善 ENR 的抑菌能力,不能使 ENR 的 MIC 降低。

2.2 生物膜试验 在抑制 BSA 生物膜试验中,结果如图 1 所示,低浓度的 ENR 无明显的抑制 BSA 生物膜的效果,而联合 SJJ 后,表现出明显的对 BSA 生物膜的抑制效果;在图 2 中,COS 与 ENR 联合使用抑制 BSA 生物膜,无明显的增效作用。

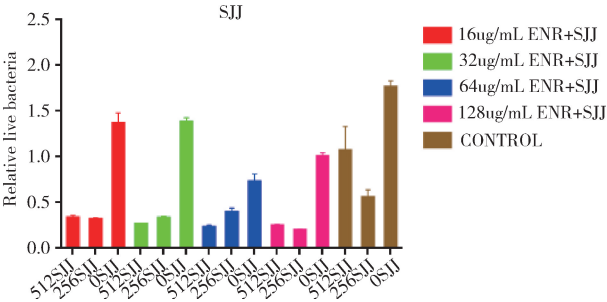


图 1 SJJ 联合 ENR 抑制 BSA 生物膜

Fig 1 SJJ combined with ENR inhibits BSA biofilms

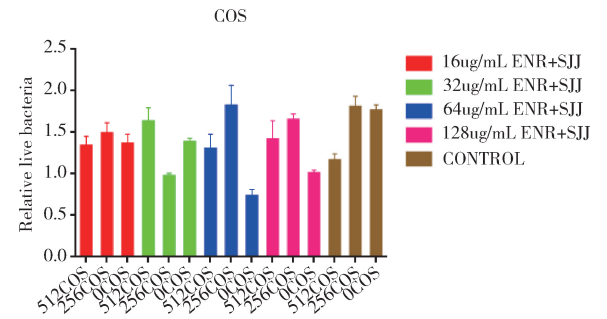


图 2 COS 联合 ENR 抑制 BSA 生物膜

Fig 2 COS combined with ENR inhibits BSA biofilms

在抑制 SA 生物膜试验中,结果如图 3 所示,低浓度的 ENR 联合 SJJ 后,抑制 SA 生物膜的效果无显著性增加,高浓度的 ENR 联合 SJJ 后,抑制 SA 生物膜的效果有显著性增加;在图 4 中,COS 与 ENR 联合使用抑制 SA 生物膜,无明显的增效作用。

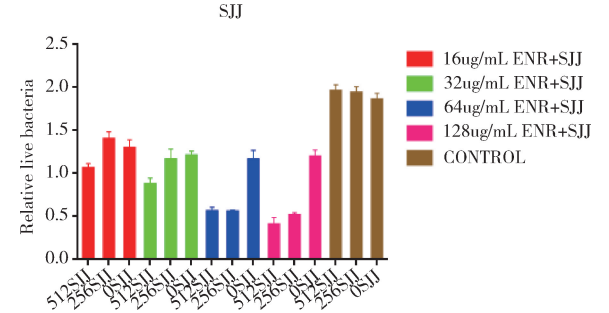


图 3 SJJ 联合 ENR 抑制 SA 生物膜

Fig 3 SJJ combined with ENR inhibits SA biofilms

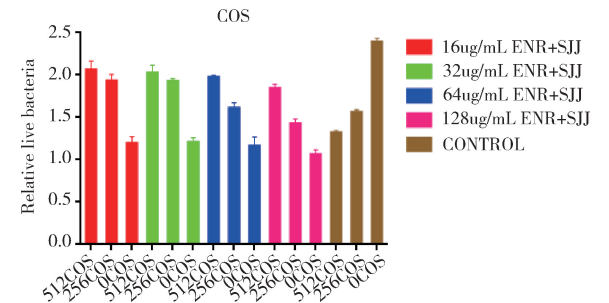


图 4 COS 联合 ENR 抑制 SA 生物膜

Fig 4 COS combined with ENR inhibits SA biofilms

2.3 脏器载菌量的检测 在体内抑菌试验中,肝脏活菌计数结果如图 5 所示,SJJ + ENR 用药后,肝脏的活菌数量明显少于单独使用 ENR 给药组,表明 SJJ 可以显著增加 ENR 在体内抑制 SA 的效果,如图 6 和图 7 所示,这一结果在肾脏和肺脏中也得到了验证。

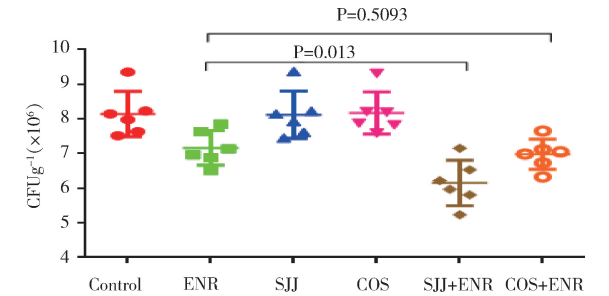


图 5 药物处理后的肝脏活菌计数

Fig 5 Viable count of liver bacteria after drug treatment

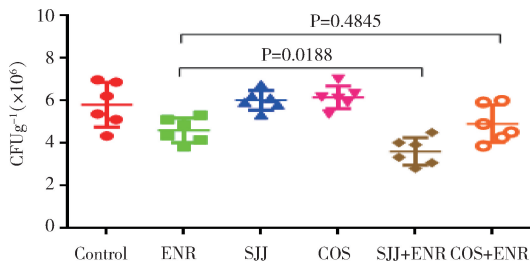


图 6 药物处理后的肾脏活菌计数

Fig 6 Viable count of kidney bacteria after drug treatment

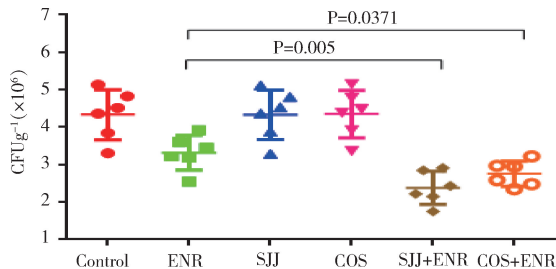


图 7 药物处理后的肺脏活菌计数

Fig 7 Viable count of lungs bacteria after drug treatment

3 讨论与结论

试验结果显示,在抑制浮游菌的实验中,SJJ 和 COS 联合 ENR 没有明显增强抑菌效果,其最小抑菌浓度仍保持不变;在抑制细菌生物膜的试验中,SJJ 联合 ENR 在抑制 BSA 和 SA 生物膜的活性方面,有较好的效果,COS 联合 ENR 在抑制 BSA 生物膜方面,没有明显的增强 ENR 的抑菌活性,在抑制 SA 生物膜方面,COS 减弱了 ENR 的生物活性;在体内试验中,SJJ 联合 ENR 在治疗小鼠肝脏和肾脏的细菌感染时,SJJ 使 ENR 的抑菌效果显著性增强,而 COS 处理的小鼠 ENR 抑菌活性没有显著性增强;在治疗肺部感染方面,SJJ 和 COS 均可以使 ENR 的抑菌效果显著性提高,但是 SJJ 要略优于 COS。

吴俊伟^[7]研究表明,恩诺沙星的抗菌谱广,能作为广谱抗菌药使用,但是其抑菌能力偏弱。其设计的恩诺沙与硫酸粘菌素联合药敏试验结果显示,硫酸粘菌素对恩诺沙星抑制大肠杆菌、沙门氏菌有显著的增效作用,对金黄色葡萄球菌的增效作用略有降低,这可能与硫酸粘菌素作用于细胞膜机理相

关;马燕^[13]在研究壳聚糖与磺胺类抗生素联合用药抑制绿脓杆菌的试验中发现,壳聚糖可以作为增强剂和抗生素联用,起到强效抗菌的目的。本试验中,采用水提醇沉得到的茯苓多糖联合恩诺沙星进行体外和体内的药敏试验,在体外的浮游菌实验中,茯苓多糖没有明显增强抗生素抑菌能力的作用,但是在生物膜和小鼠体内实验中,可以从试验结果看到明显的增效,这和母海钰^[14]在研究壳聚糖联合庆大霉素抑制细菌生物被膜的实验结果相吻合,表明阳离子多聚糖可以在富含大量阴离子的细菌生物被膜表面聚集,并破坏生物被膜的结构,增大其通透性,促进抗生素透过生物被膜,从而增强其抑制生物被膜的能力。本试验所使用的茯苓多糖,也会富含大量阳离子的多聚糖,在联合药敏试验中,表现出了更好的抑菌增效作用,为茯苓多糖产品开发提供了思路。

本文的研究发现,相比单独的恩诺沙星,茯苓多糖(SJJ)和恩诺沙星联用能更有效地破坏金黄色葡萄球菌的生物膜。根据文献报导,阳离子多糖可以促进抗生素透过细菌的生物膜,从而破坏生物膜,抑制致病菌^[15-16]。而茯苓多糖(SJJ)作为一种多阳离子多聚糖,正好利用这一策略,提高了抗生素的作用效果,减少了所需抗生素的剂量,有助于减少由于抗生素滥用导致的耐药菌增多这一现象。同时,茯苓多糖和恩诺沙星联用,在抑制分离自白羽肉鸡的金黄色葡萄球菌(BSA)方面,也有很明显的抗菌效果,这也为后续开发针对耐药性致病菌提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 段高飞,韩峰,李京宝,等. 细菌生物膜相关感染的防治方法研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(5):107-111.
- Duan G F, Han F, Li J B, et al. Advances in the prevention and treatment of bacterial biofilm related infections [J]. China ocean Journal of university (natural science), 2010, 40(5): 107-111.
- [2] 贾蓓蓓,邵世和. 金黄色葡萄球菌生物膜感染的治疗新技术研究进展[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(5):375-377.

- Jia B B, Shao S H. Advances in the treatment of *staphylococcus aureus* biofilm infection [J]. Journal of clinical laboratory, 2014, 32(5):375-377.
- [3] 刘迎鸣. 茯苓多糖的提取及生物活性研究[D]. 华中科技大学, 2008.
- Liu Y M. extraction and bioactivity of poria cocos polysaccharide [D]. Huazhong university of science and technology, 2008.
- [4] 陈凌云, 杜予民, 刘 义. 羧甲基壳聚糖的结构与抗菌性能研究[J]. 武汉大学学报(理学版), 2000, 46(2):191-194.
- Chen L Y, Du Y M, Liu Y. study on the structure and antibacterial properties of carboxymethyl chitosan [J]. Journal of wuhan university (science edition), 2000, 46(2):191-194.
- [5] 胡志鹏. 壳寡糖的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2003, (4):50-52.
- Hu Z P. Research progress of chitosan oligosaccharides [J]. Chinese journal of biochemical medicine, 2003, (4):50-52.
- [6] 廖香香. EDTA 联合洗必泰对粪肠球菌抗菌作用的体外研究[D]. 南昌大学, 2013.
- Liao X X. *in vitro* study on the antibacterial effect of EDTA combined with zebitai on enterococcus faecalis [D]. Nanchang university, 2013.
- [7] 吴俊伟, 杨俊卿. 恩诺沙星与硫酸粘菌素联合抗菌活性的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2006, 28(4):558-561.
- Wu J W, Yang J Q. Study on the combined antibacterial activity of enoxacin and colistin sulfate [J]. Journal of southwest university (natural science edition), 2006, 28(4):558-561.
- [8] 杨春蕾, 李丽娟, 黄晶晶, 等. 恩诺沙星纳米乳的体外抑菌试验及对仔猪空肠细胞活力的影响[C]// 中国猪业科技大会暨中国畜牧兽医学会 2015 年学术年会. 2015.
- Yang C L, Li L J, Huang J J, *et al.* *In vitro* bacteriostatic test of enrofloxacin nanoemulsion and its effect on jejunum cells of piglets Influence of force [C]// China pig science and technology conference and 2015 annual conference of China animal husbandry and veterinary association. 2015.
- [9] 胡 帅, 欧阳五庆, 李向辉, 等. 复方替米考星纳米乳的体外联合抑菌试验[J]. 西北农业学报, 2010, 19(6):48-51.
- Hu S, Ou Yang W Q, Li X H, *et al.* *In vitro* combined bacteriostatic test of compound temicox nanoemulsion [J]. Acta agriculturae northwestern, 2010, 19(6):48-51.
- [10] 韩 东, 冯 新, 韩文瑜, 等. 基因工程萤素对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及对小鼠感染的治疗[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(8):1241-1246.
- Han D, Feng X, Han W Y, *et al.* The bacteriostatic effect of genetic engineering limulus on *staphylococcus aureus* and the treatment of infection in mice[J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2013, 33(8):1241-1246.
- [11] 高亚萍, 黑 研, 纪星涉, 等. 西他沙星对小鼠金黄色葡萄球菌感染抑制作用的实验研究[J]. 抗感染药学, 2015, (4):27-29.
- Gao Y P, Hei Y, Ji X S, *et al.* Experimental study on the inhibitory effect of sitacin on *staphylococcus aureus* infection in mice [J]. Anti-infective pharmacy, 2015, (4):27-29.
- [12] 邓少嫦, 罗银珠, 李 航, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌系统性感染小鼠模型的制备[J]. 中国实验动物学报, 2016, (6):596-600.
- Deng S C, Luo Y Z, Li H, *et al.* Preparation of a mouse model of mrsa systemic infection [J]. Chinese journal of experimental animals, 2016, (6):596-600.
- [13] 马 燕. 壳聚糖与抗生素联用对铜绿假单胞菌的抗菌活性[J]. 国外医药(抗生素分册), 2009, (2):46.
- Ma Y. Antibacterial activity of chitosan and antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Foreign medicine (antibiotics), 2009, (2):46.
- [14] 母海钰. 基于氨基糖苷类抗生素的抗细菌生物膜和胞内寄生菌的药物设计和活性评价[D]. 博士论文. 2016.
- Mu H B. Drug design and activity evaluation of antimicrobial biofilms and intracellular parasites based on aminoglycoside antibiotics [D]. Doctoral dissertation. 2016.
- [15] 杨冬芝, 刘晓非, 李 治, 等. 壳聚糖抗菌活性的影响因素[J]. 应用化学, 2000, (6):598-602.
- Yang D Z, Liu X F, Li Z, *et al.* Factors influencing the antibacterial activity of chitosan [J]. Applied chemistry, 2000, (6):598-602.
- [16] 林水森, 李明春, 辛梅华, 等. 壳聚糖及其衍生物抗菌机理研究进展[J]. 化学通报, 2014, 077(3):220-226.
- Lin S S, Li M C, Xin M H, *et al.* Progress in antibacterial mechanism of chitosan and its derivatives [J]. Chemical bulletin, 2014, 077(3):220-226.

(编辑:侯向辉)