

亚抑菌质量浓度的百里香酚对金黄色葡萄球菌 α -溶血素表达的影响*

孙 茂, 何学文, 邓嘉强, 徐 悦, 王君锐, 尹立子**

(四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】 α -溶血素在金黄色葡萄球菌(金葡菌)肺炎的感染过程中起着非常重要的作用,可作为治疗金葡菌肺炎的新靶标。因此,研究百里香酚对金葡菌 α -溶血素表达的影响具有重要意义。【方法】测定最小抑菌质量浓度(MIC)和生长曲线并进行了溶血试验、蛋白免疫印迹分析、荧光定量PCR以及细胞毒性试验。【结果】百里香酚对金葡菌USA300的MIC为256 $\mu\text{g/mL}$,亚抑菌质量浓度的百里香酚(32 $\mu\text{g/mL}$)可下调金葡菌 hla 和 $RNAIII$ 的转录水平,降低 α -溶血素的表达,对溶血素介导的肺癌上皮细胞A549损伤具有保护作用。【结论】百里香酚具有成为新型抗金葡菌感染药物的潜力。

关键词: 百里香酚;金黄色葡萄球菌; α -溶血素;抗毒力

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2019)03-0414-06

The Effect of Thymol Subinhibitory Concentration on the Secretion of α -Hemolysin in *Staphylococcus aureus*

SUN Mao, HE Xuewen, DENG Jiaqiang, XU Yue, WANG Junrui, YIN Lizi

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

Abstract: [Purpose] Alpha-hemolysin (Hla) plays a significant role in the process of *Staphylococcus aureus* pneumonia. Hla is regarded as a novel target for the treatment of *S. aureus* infection.

[Method] The inhibitory effect of thymol against *S. aureus* Hla was studied via determining the effects of thymol on the growth of *S. aureus* and hemolysis assay, Western-blot, Real-time PCR and cytotoxicity assay. [Result] The MIC of thymol against *S. aureus* was 256 $\mu\text{g/mL}$. Thymol can down-regulate the transcriptional levels of hla and $RNAIII$, inhibited the expression of Hla. Thymol protected A549 cells injury induced by *S. aureus* Hla. [Conclusion] Our results showed that thymol has the potential to be developed a novel drug for *S. aureus* pneumonia targeting Hla.

Keywords: thymol; *Staphylococcus aureus*; α -hemolysin; anti-virulence

金黄色葡萄球菌(金葡菌)是一种常见的条件性致病菌,它广泛地存在于人和动物体内^[1]。当宿主的非特异性免疫系统出现缺陷时,金葡菌可以感染宿主,引起多种疾病,给人和动物的健康

造成严重的威胁^[2]。其中最典型的疾病就是金葡菌肺炎,具有高发病率、高致死率的特点。目前常采用抗生素治疗金葡菌肺炎,但是抗生素在使用过程中会对金葡菌的生长造成巨大的选择性压

收稿日期: 2018-05-03

修回日期: 2018-07-06

网络出版时间: 2019-03-19

*基金项目: 四川农业大学双支计划(03571444); 四川省教育厅青年基金(16ZB0036)。

作者简介: 孙茂(1991—),男,四川眉山人,在读硕士研究生,主要从事兽医药理学研究。

E-mail: 2587496814@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 尹立子(1983—)男,湖南邵阳人,博士,副教授,主要从事中药及其有效成分抗菌毒力因子的研究。E-mail: yinlizi@scia.edu.cn

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201805007](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201805007)



力, 使菌群中耐药菌的比例上升, 甚至出现多重耐药株, 使得临床治疗效果下降甚至无效。因此, 我们迫切需要新的药物或治疗策略来防治细菌感染尤其是耐药菌的感染。

抗毒力因子治疗策略是抑制细菌毒力因子的表达或其活性的一种治疗策略^[3]。这些毒力因子通常是细菌生长的非必需蛋白, 以此为目标进行特异性干预, 不会对细菌的生存带来选择性压力, 因而不易产生耐药性而受到广泛关注^[4]。 α -溶血素 (Hla) 是金葡菌的一种重要的毒力因子, 在金葡菌感染肺部的过程中起着关键性作用^[5-7]。因此, Hla 可以作为一种新的抗金葡菌肺炎的潜在靶标^[8]。

百里香酚 (thymol) 又名麝香草酚, 是一种主要从唇形科植物中提取的单萜酚, 为伞花烃的衍生物, 与香芹酚互为同分异构体。百里香酚具有多种药理活性, 如抗氧化^[9]、抗寄生虫^[10]、抗菌^[11]、调节免疫^[12]和促生长等^[13]。我们通过体外溶血实验模型筛选药物时, 发现百里香酚具有抑制菌上清溶血的作用。本研究首先进行 MIC 和生长曲线的测定, 然后通过蛋白免疫印迹和荧光定量 PCR 试验来探讨百里香酚对金葡菌 Hla 的作用机制, 再通过细胞毒性试验研究百里香酚对金葡菌 Hla 介导的肺癌上皮细胞 A549 损伤的保护作用, 为百里香酚治疗金葡菌肺炎提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞株

金葡菌菌株 USA300 和人肺癌上皮细胞 A549 (ATCC CCL 185) 购于美国模式培养物集存库 (ATCC)。

1.1.2 主要试剂

百里香酚 (HPLC 98%, 成都瑞芬思生物科技有限公司); TSB 培养基 (青岛高科园海博生物技术有限公司); α -溶血素多克隆抗体和溶葡萄球菌素 (Sigma 公司); 羊抗兔二抗 (Solarbio 公司); PVDF 膜 (Pall 公司); Super ECL Plus 超敏发光液 (Thermo fisher 公司); Qiagen RNeasy Maxi column (Qiagen 公司); 反转录试剂 Takara RNA PCR kit (AMV) Ver.3.0 和荧光定量 PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq TM (Takara 公司); Cytotoxicity Detection Kit (LDH, Roche 公司); live/dead (green/red) reagent

(Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 百里香酚对金葡菌最小抑菌质量浓度 (MIC) 的测定

按照临床与实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的倍比稀释法测定百里香酚对金葡菌的最小抑菌质量浓度, 苯唑西林作为对照组。

1.2.2 百里香酚在亚抑菌质量浓度下对金葡菌 USA 300 的生长曲线的测定

将金葡菌 USA300 过夜培养后, 进行扩大培养, 待金葡菌生长到 $OD_{600\text{ nm}}=0.3$ 时, 加入不同量的百里香酚使其质量浓度分别达到 0、4、8、16 和 32 $\mu\text{g/mL}$, 隔一段时间测定菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.3 百里香酚对金葡菌上清液溶血能力的影响

将金葡菌培养至 $OD_{600\text{ nm}}=0.3$, 加入百里香酚使其质量浓度分别达到 0、4、8、16 和 32 $\mu\text{g/mL}$, 培养至稳定期, 离心 (4 500 r/min, 5 min) 取菌上清 100 μL , 加入到 880 μL PBS 中, 再加入 20 μL 脱纤维兔血, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min, 离心 (4 500 r/min, 2 min) 取上清, 在 543 nm 波长处测定吸光值, 以不加药组为 100% 溶血。

1.2.4 蛋白免疫印迹分析

取 1.2.3 节中稳定期菌液, 离心吸取细菌上清液 80 μL 与 20 μL 5 \times Loading buffer 混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min, 进行 SDS-PAGE 后, 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 与 α -溶血素抗体 (1 : 5 000) 孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗涤 3 次每次 5 min, 再用 HRP 标记的二抗 (1 : 8 000) 孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤 3 次, 加 ECL 暗室孵育 2 min 后, 用全功能成像仪进行成像。

1.2.5 荧光定量 PCR 试验

取 1.2.3 节中稳定期的菌液, 参照 SAMB-ANTHAMOORTHY 等^[14]的方法提取总 RNA。离心 (4 500 r/min, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 弃去上清液, 收集菌体, 重悬于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶葡萄球菌酶的 TES 缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min。于波长为 260 nm 处测样品的吸光值, 检查 RNA 的质量、完整性和浓度。按照试剂盒说明书, 将 RNA 反转录成为 cDNA。荧光定量 PCR 所用引物见表 1。在 Real-Time PCR 扩增仪中进行扩增。反应体系为 25 μL , 循环参数为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 40 个循环。采用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析基因的相对表达水平。

表 1 荧光定量 PCR 引物		
Tab. 1 Primers used for real-time RT-PCR		
基因 gene	引物 primers	序列 sequences
16S rRNA	16S rRNA sense	5'-GCTGCCCTTTGTATTGTC-3'
	16S rRNA antisense	5'-AGATGTTGGGTTAAGTCCC-3'
hla	hla sense	5'-TTGGTGCAAATGTTTC-3'
	hla antisense	5'-TCACTTCCAGCCTACT-3'
RNAIII	RNAIII sense	5'-TTCACGTGTCGATAATCCA-3'
	RNAIII antisense	5'-CGGAAGGAGTGATTCAATGG-3'

1.2.6 细胞毒性试验

参照文献[14]的方法培养人肺癌上皮癌细胞 A549，用无菌 PBS 缓冲液冲洗细胞 3 次，然后用培养基调整细胞密度为 2.0×10^5 个/mL，接种于 96 孔板中，每孔 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 培养 12~24 h。移除细胞培养基，然后加入含有不同浓度百里香酚的 USA300 细菌混悬液 (USA300 混悬于无双抗的 DMEM 培养基中)，每孔 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 培养 6 h。Live/Dead 试验：按照说明书加入 Live/Dead 试剂将细胞染色，再使用激光共聚焦显微镜进行染色并拍照。LDH 试验：按照说明书加入 Cytotoxicity Detection Kit 试剂进行孵育，在波长为 490 nm 处检测吸光值，计算 LDH 的释放量。

1.2.7 统计分析

每个试验均单独重复 3 次，数据以“mean \pm SD”表示；用 SPSS 19.0 统计软件进行分析，组间进行 Student’s *t*-test 检验，*P*<0.05 为差异显著，*P*<0.01 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 百里香酚对金葡菌的抗菌活性

百里香酚和苯唑西林对金葡菌 USA300 的 MIC 分别为 256 μ g/mL 和 64 μ g/mL，表明百里香酚对耐药性金葡菌有一定的抗菌活性。

2.2 百里香酚在亚抑菌质量浓度下对金葡菌 USA300 生长的影响

在金葡菌 USA300 和百里香酚共培养体系中，百里香酚的质量浓度分别为 0、4、8、16 和 32 μ g/mL，并测试了对金葡菌生长的影响。结果表明：百里香酚在这些质量浓度下对金葡菌 USA300 的生长没有影响 (图 1)。

2.3 百里香酚对金葡菌 Hla 的影响

金葡菌 USA300 在稳定期能够产生 Hla 并分泌至培养液中，Hla 对兔红细胞敏感，从而发生

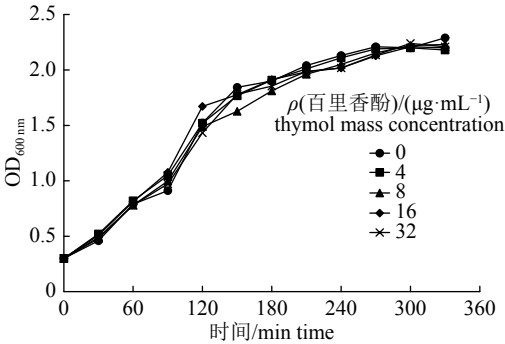


图 1 不同质量浓度的百里香酚对金葡菌 USA300 的生长曲线

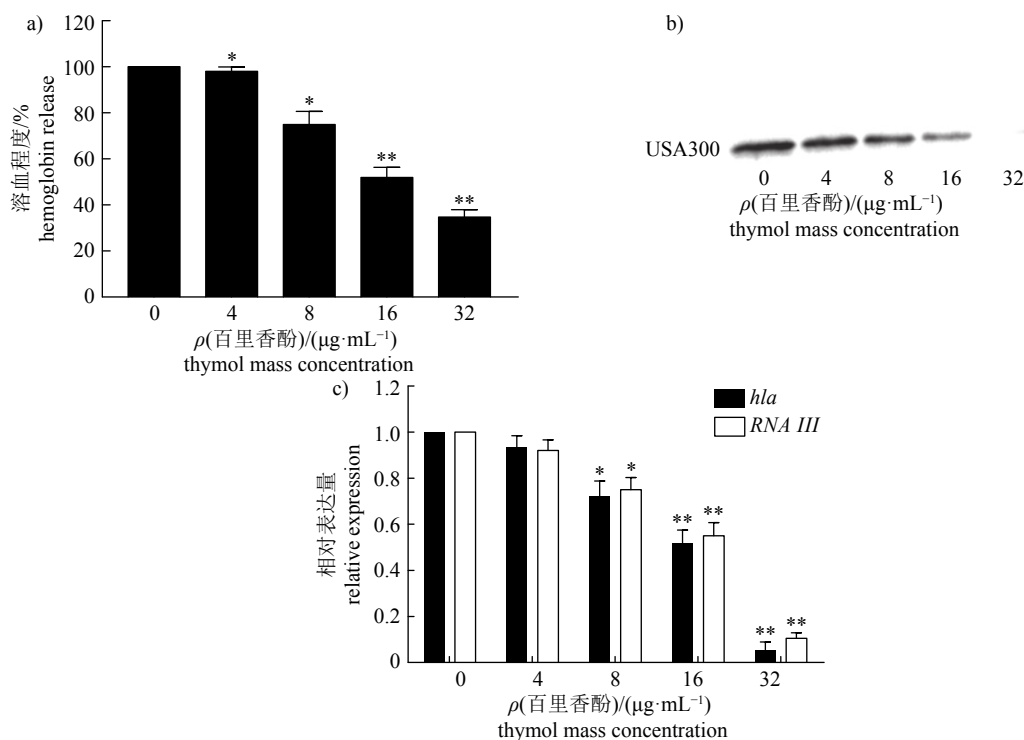
Fig. 1 Growth curve for *S. aureus* USA300 cultured under different mass concentrations of thymol

溶血现象。若细菌培养液的溶血能力下降，则说明 Hla 的含量减少或者生物活性受到抑制。本试验以不加百里香酚组的溶血能力为 100%，当百里香酚质量浓度为 16 μ g/mL 和 32 μ g/mL 时，溶血能力分别下降至 $51.9\%\pm3.7\%$ 和 $34.8\%\pm2.6\%$ ，差异极显著 (*P*<0.01)(图 2a)。接着通过蛋白免疫印迹试验考察溶血能力下降的原因，结果显示：随着百里香酚质量浓度的增加，Hla 蛋白条带的颜色明显减弱，说明 Hla 的含量减少 (图 2b)。Hla 的编码基因为 *hla*，*RNA III* 的转录与 Hla 表达呈正相关关系。RT-PCR 结果表明：不同质量浓度的百里香酚对 USA300 的 *hla* 和 *RNA III* 的转录水平与蛋白免疫印迹的结果基本一致，随着药物质量浓度的增加，*hla* 和 *RNA III* 的转录水平都降低。当百里香酚质量浓度为 32 μ g/mL 时，与对照组相比 *hla* 和 *RNA III* 的转录水平分别下降至 $5.5\%\pm3.0\%$ 和 $10.5\%\pm2.1\%$ ，差异极显著 (*P*<0.01)(图 2c)。

2.4 百里香酚对金葡菌 USA300 α -溶血素介导的人肺癌上皮细胞 A549 损伤的保护作用

通过 Live/Dead 试剂盒染色，在激光共聚焦显微镜下可观察到绿色荧光的为活细胞，红色荧光的为死细胞。试验结果表明：百里香酚可以提高由金葡菌 Hla 介导的 A549 细胞损伤的保护率 (图 3a~d)，随着百里香酚质量浓度的增加，死细胞数量减少，活细胞数量增加。

乳酸脱氢酶 (LDH) 是胞内酶，在细胞坏死破裂后释放到细胞外。本研究通过检测细胞培养基上清液中 LDH 的释放量，定量分析百里香酚对 α -溶血素介导的 A549 细胞的保护作用。随着百里香酚质量浓度的增加，LDH 的释放量降低，在质量浓度为 4、8、16 和 32 μ g/mL 时 LDH 的释放



注: a) 不同质量浓度百里香酚与金葡菌培养上清液对兔红细胞的溶血作用; b) 不同质量浓度百里香酚对金葡菌 USA300 Hla 表达影响的免疫印迹结果; c) 不同浓度的百里香酚对金葡菌 USA300 的 *hla* 和 *RNA III* 相对基因表达量的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$; 下同。

Note: a) hemolytic activity of *S. aureus* culture supernatants grown in the presence of increasing mass concentrations of thymol; b) Western blot of α -hemolysin produced by *S. aureus* USA300 co-cultured with different mass concentrations of thymol; c) relative expression of *hla* and *RNAIII* in *S. aureus* strain USA300 after growth with various mass concentrations of thymol. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$; the same as below.

图2 百里香酚对金葡菌 Hla 的影响

Fig. 2 The effects of thymol on *S. aureus* Hla

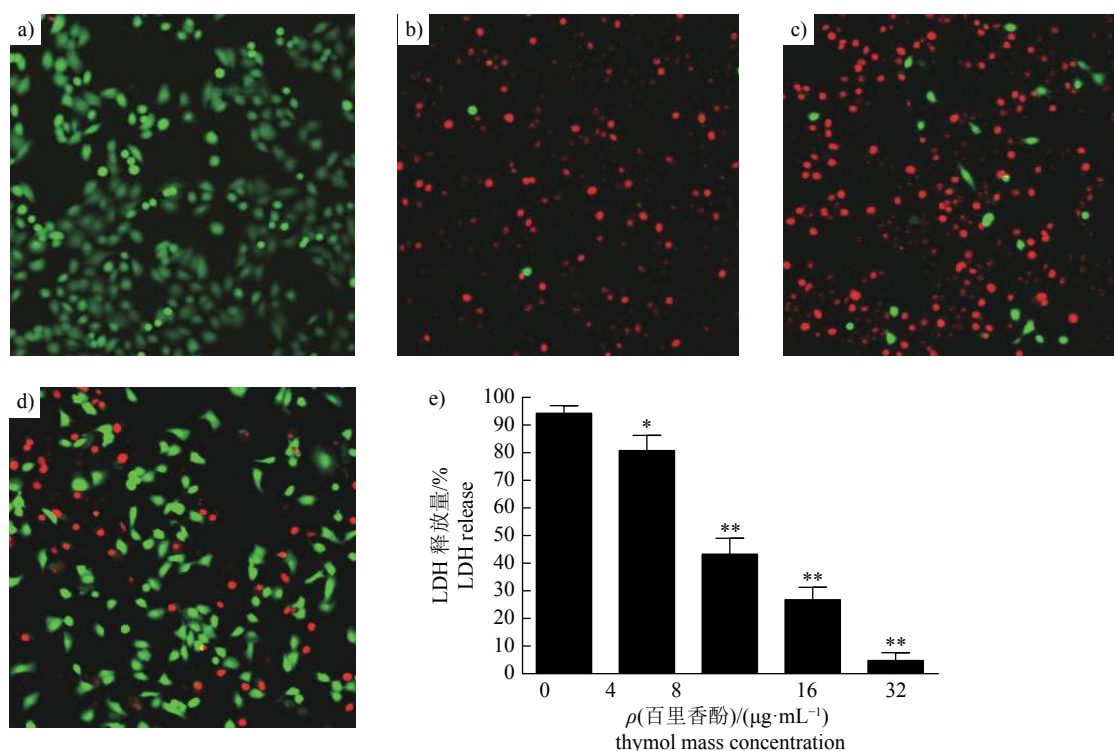
量分别为 $80.8\%\pm4.8\%$ 、 $43.3\%\pm5.0\%$ 、 $26.8\%\pm4.0\%$ 和 $4.8\%\pm2.5\%$ (图 3e)。以上结果说明百里香酚具有保护金葡菌 Hla 介导的 A549 细胞损伤的作用, 且与药物质量浓度呈正相关关系。

3 讨论

α -溶血素 (Hla) 是细菌生长后期所分泌的一种外毒素, 大小约为 33 ku, 多种细胞 (红细胞、单核细胞、淋巴细胞、内皮细胞) 的细胞膜对 Hla 敏感。Hla 可在敏感细胞的细胞膜上形成中空的七聚体圆柱体, 贯穿细胞膜形成孔道, 破坏其完整性, 从而破坏细胞内物质的平衡, 最终导致细胞裂解引起多种疾病。已有文献报道 Hla 在金葡菌肺炎的致病过程中起非常关键性的作用^[5-7]。因此, 可将 Hla 作为抗金葡菌肺炎的新靶点。众所周知, 传统的抗生素主要是通过阻碍细菌的生长和增殖达到抗菌效果, 如抑制细胞壁的合成、破坏细胞膜、阻断 DNA 复制、干扰细菌代谢以及抑制蛋白质的合成等。传统抗生素能有效地治疗细菌感染, 但是其对细菌产生选择性压力, 使

细菌产生耐药性^[15]。使用抗生素治疗金葡菌感染极易产生耐药性。而 Hla 是细菌生长的非必需物质, 抑制其表达或者生物活性不会给细菌的生长造成选择性压力, 因而不产生耐药性, 在抗生素耐药性如此严重的今天具有重要意义。

本研究中, 百里香酚在亚抑菌质量浓度下对金葡菌的生长没有影响, 但是却能通过下调 *hla* 和 *RNAIII* 的转录水平使 Hla 的表达量下降, 是一种潜在的抗 Hla 的药物。目前抗 Hla 药物还处于试验研究阶段, 抗生素仍然是治疗金葡菌肺炎的主流。可以考虑与抗生素联用增加效果, 这一联用思路主要是抗生素抑菌或者杀菌, 抗 Hla 药物抑制 Hla 可能会有更好的效果。另外, 某些抗生素 (如 β -内酰胺和氟喹诺酮类抗生素) 在亚抑菌浓度下会增加 Hla 的表达, 该类抗生素与抗 Hla 药物联用后可以弥补抗生素的不足^[16-17]。Hla 的表达量增加还会增加其他细菌 (尤其是革兰阴性菌) 的生长繁殖, 加重肺炎感染的症状^[18]。因此, 抗生素与抗 Hla 药物联用在未来是一个非常受关注的热点。



注: a) 未处理组; b) 感染金葡菌 USA300 组; c) 感染金葡菌 USA300, 并加入百里香酚使其质量浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$; d) 感染金葡菌 USA300, 并加入百里香酚使其质量浓度 32 $\mu\text{g/mL}$; e) 加入不同质量浓度百里香酚的金葡菌 USA300 与 A549 共培养体系的 LDH 释放率。

Note: a) Uninfected A549 cells; b) A549 cells infected by USA300 without thymol; c) A549 cells infected by USA300 with 8 $\mu\text{g/mL}$ thymol; d) A549 cells infected by USA300 with 32 $\mu\text{g/mL}$ thymol; e) LDH release level in cultural medium co-cultured with USA300 and different mass concentrations of thymol (40 μm).

图 3 不同质量浓度百里香酚对金葡菌 USA300 介导的 A549 细胞损伤的保护作用

Fig. 3 Thymol alleviates A549 cell injury caused by *S. aureus* strain USA300

4 结论

百里香酚通过下调金葡菌的 *hla* 和 *RNAlII* 的转录水平降低 Hla 的表达, 并对金葡菌 Hla 介导的肺癌上皮细胞 A549 的损伤具有保护作用, 这提示抑制 Hla 的表达对治疗金葡菌肺炎具有潜在的效果, 至于效果如何还有待进一步研究。本研究尚未对百里香酚的安全性进行评价, 这将是接下来要研究的内容。USA300 菌株为 MRSA 菌株, 本研究结果发现百里香酚对该菌株也有抑菌效果, 但对其他耐药菌株是否同样有效果还需进一步研究。百里香酚与 β -内酰胺和氟喹诺酮类抗生素联用增加治疗效果还有待于深入研究。

[参考文献]

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [2] LOWY F D. *Staphylococcus aureus* infections[J]. New England Journal of Medicine, 1998, 339(8): 520. DOI: 10.1056/NEJM199808203390806.

- [3] RASKO D A, SPERANDIO V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(2): 117. DOI: 10.1038/nrd3013.
- [4] 郑峰, 周婷婷, 孙倩男, 等. 金黄色葡萄球菌 α -溶血素的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(10): 795. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2017.10.013.
- [5] BUBECK WARDENBURG J, BAE T, OTTO M, et al. Poring over pores: alpha-hemolysin and Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. Nature Medicine, 2007, 13(12): 1405. DOI: 10.1038/nm1207-1405.
- [6] FRITZ S A, TIEMANN K M, HOGAN P G, et al. A serologic correlate of protective immunity against community-onset *Staphylococcus aureus* infection[J]. Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 2013, 56(11): 1554. DOI: 10.1093/cid/cit123.
- [7] RAGLE B E, BUBECK WARDENBURG J. Anti-alpha-hemolysin monoclonal antibodies mediate protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. Infection and Immunity, 2009, 77(7): 2712. DOI: 10.1128/IAI.00115-09.
- [8] KONG C, NEOH H M, NATHAN S. Targeting staphyl-

- ococcus aureus toxins: a potential form of anti-virulence therapy[J]. *Toxins*, 2016, 8(3): 72. DOI: [10.3390/toxins8030072](https://doi.org/10.3390/toxins8030072).
- [9] 姚正颖, 赵银纤, 侯北伟, 等. 3种脂溶性酚类对紫苏籽油的抗氧化作用研究[J]. *中国油脂*, 2017, 42(5): 92. DOI: [10.3969/j.issn.1003-7969.2017.05.021](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-7969.2017.05.021).
- [10] 付立新. 百里香酚对爪哇根结线虫的毒杀活性研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2016(S1): 68. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2016.S1.013](https://doi.org/10.16211/j.issn.1004-390X(n).2016.S1.013).
- [11] MARCHESE A, ORHAN I E, DAGLIA M, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature[J]. *Food Chemistry*, 2016, 210 (2016): 402. DOI: [10.1016/j.foodchem.2016.04.111](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111).
- [12] 杜恩存. 百里香酚和香芹酚对肉仔鸡肠上皮屏障和免疫功能的调节作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [13] 张显东. 香芹酚和百里香酚的作用机理及其在单胃动物中的应用研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(11): 25. DOI: [10.19556/j.0258-7033.2017-11-025](https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.2017-11-025).
- [14] SAMBANTHAMOORTHY K, SMELTZER M S, ELASRI M O. Identification and characterization of *msa* (SA1233), a gene involved in expression of *SarA* and several virulence factors in *Staphylococcus aureus*[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2006, 152(Pt 9): 2559. DOI: [10.1099/mic.0.29071-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.29071-0).
- [15] CEGELSKI L, MARSHALL G R, ELDRIDGE G R, et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(1): 17. DOI: [10.1038/nrmicro1818](https://doi.org/10.1038/nrmicro1818).
- [16] OHLSEN K, ZIEBUHR W, KOLLER K P, et al. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(11): 2817. DOI: [10.1128/AAC.42.11.2817](https://doi.org/10.1128/AAC.42.11.2817).
- [17] WORLITZSCH D, KAYGIN H, STEINHUBER A, et al. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(1): 196. DOI: [10.1128/AAC.45.1.196-202.2001](https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.196-202.2001).
- [18] COHEN T S, HILLIARD J J, JONES-NELSON O, et al. *Staphylococcus aureus* α toxin potentiates opportunistic bacterial lung infections[J]. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(329): 329ra31. DOI: [10.1126/scitranslmed.aad9922](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9922).

责任编辑: 何承刚