

冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用

汪伦记^{1,2*}, 许美秋¹, 纠敏², 原江锋¹, 赵亚美²¹河南科技大学食品与生物工程学院 畜禽疫病诊断与食品安全检测河南省工程实验室;²河南科技大学食品与生物工程学院 微生物资源开发与利用重点实验室, 洛阳 471023

摘要:研究了冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物被膜形成的影响。采用结晶紫染色法评价了冬凌草提取物在不同质量浓度和不同添加时间下干预金黄色葡萄球菌生物被膜的作用。实验结果表明,冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 分别为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在亚抑菌浓度,冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的干预作用不明显;当冬凌草提取物质量浓度大于 1 倍 MIC 时,其对金黄色葡萄球菌生物膜形成的有明显的抑制作用,在生物膜形成的初始时间(0 h)添加药物抑制效果最佳,2MIC 冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌成膜的抑制率达到 79% 以上;24 h 后添加抑制作用较弱,抑制率仅有 60% 左右。采用银染法和荧光染色法研究了冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除效果和抑制胞外多糖的合成,实验结果也表明,在亚抑菌浓度,冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除和胞外多糖合成的抑制作用很弱,当冬凌草提取物质量浓度大于 1 MIC 时,在生物膜形成的初始时间(0 h)添加药物,对金黄色葡萄球菌生物膜清除效果明显,胞外多糖的合成也受到显著的抑制。本研究为冬凌草提取物在食品防腐和保鲜,以及无抗饲料的广泛应用提供理论基础。

关键词:冬凌草;金黄色葡萄球菌;生物膜;抑菌活性

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.6.017

Inhibition Activity of *Rabdosia rubescens* Extract on Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*

WANG Lun-ji^{1,2*}, XU Mei-qi¹, JIU Min², YUAN Jiang-feng³, ZHAO Ya-mei²¹College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Henan EngineeringLaboratory of Livestock Disease Diagnosing and Food Safety Testing; ²College of Food and Bioengineering, Henan

University of Science and Technology Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Utilization, Luoyang 471023, China

Abstract: The effect of *Rabdosia rubescens* extract on biofilm formation of *Staphylococcus aureus* was tested. Inhibitory activity of *R. rubescens* extract with different concentrations and different addition times on the biofilm formation of *S. aureus* were analyzed by crystal violet staining assay and sliver staining methods. The results showed that the MIC and MBC of *R. rubescens* crude extract against *S. aureus* were 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Under sub-MIC concentrations, the intervention effect of *R. rubescens* extract on biofilm formation of *S. aureus* was not obvious, but when the concentration of *R. rubescens* crude extracts was more than double MIC, it can significantly inhibit the biofilm formation of *S. aureus* and the best inhibition effect can be achieved after adding drugs at the initial time of biofilm formation. The inhibition rate was over 79% when the concentrations of *R. rubescens* crude extracts were 2MIC. The inhibition rate was only 60% at 24 h of biofilm formation after adding drugs. The eradication effect on biofilm and the inhibition of extracellular polysaccharide (EPS) synthesis were studied by using crystal violet staining assay and sliver staining methods. The results also showed that the eradication effect of *R. rubescens* crude extracts on biofilm and the inhibition of its on extracellular polysaccharide synthesis were weak. An obvious decrease of *S. aureus* biofilms and EPS were observed after adding drugs at the initial time of biofilm formation when the concentration of *R. rubescens* crude extracts was more than double MIC. This study provided a theoretical basis for the wide application of *R. rubescens* extract in food storage and preservation, as well as antibiotic-free feed.

Key words: *Rabdosia rubescens*; *Staphylococcus aureus*; biofilm; antibacterial activity

收稿日期:2016-10-10 接受日期:2017-02-27

基金项目:河南省教育厅重点项目(14B180019)

* 通信作者 Tel:86-379-64282342; E-mail: wanglunji7215@163.com

生物被膜是粘附于生物材料或非生物材料表面,由自身产生胞外多聚基质包裹的具有三维立体结构的菌细胞群体。在上世纪70年代,人类才开始认识生物被膜。随着研究的不断深入,人们发现,微生物在自然界中更常见的是以生物膜的形式存在,引起的危害也更为严重,对其带来的危害也更加难以控制。据专家估计,其中约65%人类细菌性感染是由生物被膜引起的^[1]。食品含有丰富的营养物质,为细菌提供了适宜的生存环境,在一些食品加工设备的表面极易附着微生物,形成生物被膜。科学研究表明 *salmonella*、*Listeria monocytogenes* 和 *Staphylococcus aureus*^[2-4] 等食源性病原菌具有粘附到食品及加工器具表面形成生物被膜的能力。食源性病原菌在食品加工设备表面形成生物膜不仅会在食品加工设备、输送管道造成表面损伤,更是一种潜在的污染源,引起食品腐败和疾病的传播,威胁食品安全。

随着食品加工越来越向“绿色”和“天然”等理念转变,食品防腐剂天然化已成为防腐技术的大趋势。天然植物源防腐剂以其安全、高效、抗氧化效果好、抗菌谱广等优点,已经成为近年来人们研究的热点^[5]。本文选择的冬凌草是我国的特色中草药,学名碎米桠 [*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara],为唇形科香茶菜属多年生草本植物,植物资源十分丰富。冬凌草主要活性成分为冬凌草甲素^[6,7]和乙素^[8]。对冬凌草甲素和乙素的现代药理学研究证实,其具有抗肿瘤、抗菌消炎、抗氧化和增强免疫功能的功效^[9,10],而且低毒,对人体重要脏器如骨髓、肝、肾等无明显损伤^[11]。冬凌草的醇提物和水提物对金黄色葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、大肠杆菌、变形杆菌都有抑制作用^[12],其中对金黄色葡萄球菌抑制效果最好。目前,对冬凌草抑制食品致腐致病菌生物膜的研究尚未见报道。因此,本文对冬凌草抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成和清除效果,以及对金黄色葡萄球菌胞外多糖合成的影响进行了研究,为在食品工业和畜牧业中控制金黄色葡萄球菌生物膜的形成提供相关科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

冬凌草地上部分,采自河南省济源市,由河南科技大学食品与生物工程学院原江锋副教授鉴定,干燥后经中药粉碎机粉碎,过60目筛放入干燥器中备

用。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*),本实验室保存。

胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)和胰蛋白胍大豆琼脂(TSA),青岛海博生物技术有限公司;24孔和96孔细胞培养板,生工生物工程(上海)股份有限公司;荧光增白剂,Sigma;冬凌草甲素,上海源叶生物科技有限公司;25%戊二醛,氯化钙,硝酸银,结晶紫,对苯二酚等,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器

超净工作台,江苏苏净集团有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;680型全自动酶标仪,美国 BIO-RAD;普通光学显微镜,江南光电(集团)股份有限公司;荧光显微镜,日本 OLYMPUS。

1.2 实验方法

1.2.1 冬凌草提取物的制备

称取制备的冬凌草20g,放入回流装置的提取瓶中,加入95%的乙醇300mL,把回流装置放入超声波发生器中进行超声乙醇回流提取,提取温度40℃、每次提取时间30min、超声功率150W,提取2次,合并两次滤液,减压抽滤,滤液经45℃旋转蒸发器浓缩制得浸膏,浸膏经真空干燥制成固体粉末。

获得的醇提物按1:10(m/v)的比例加入蒸馏水进行溶解制备冬凌草醇提物悬浮液,采用液液萃取法,先用2倍体积的石油醚对冬凌草醇提取水悬浮液进行萃取,2次石油醚萃取后,分离的水相加入2倍体积的三氯甲烷溶液,充分混匀后静置分层,分离出氯仿相,萃取2次,合并2次氯仿萃取液,30±2℃下减压浓缩、制得浸膏,浸膏经真空干燥制成固体粉末置干燥器备用。

1.2.2 冬凌草提取物溶液制备

准确称取一定质量的冬凌草提取物溶于用甲醇中,配成质量浓度为1mg/mL的冬凌草提取物溶液,4℃冰箱备用。冬凌草甲素的含量测定采用高效液相色谱法^[13]。

1.2.3 标准菌悬液制备

将复苏好的金黄色葡萄球菌菌悬液按体积比1:50接种于新鲜TSB培养基中,37℃,220rpm,培养约20h后,4℃,8000g,离心10min,沉淀物用无菌生理盐水洗涤2次,每次10mL,然后用无菌生理盐水调整菌悬液浓度为OD₆₀₀=0.1(约0.5麦氏单位,5×10⁸cfu/mL),得到标准菌悬液。

1.2.4 冬凌草提取物对 *S. aureus* MIC 及 MBC 的测定

1.2.4.1 最小抑菌浓度(MIC)测定。二倍稀释法:取7支试管分别加入5 mL液体培养基(其中第一支试管加9.5 mL),加入0.5 mL药液于第1支试管中,混匀后取出5 mL加入第2管中,然后依次取出5 mL移入下一管,到第7管时弃去5 mL,再在这7管中分别加入0.1 mL培养好的菌液。另取2支试管分别编号为第8和9,其中第8号试管作为空白对照,只加5 mL液体培养基,不加药液;第9号试管作为空白对照,加5 mL液体培养基和溶解组分的甲醇。用二倍递减稀释法将供试提取物配制成2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 mg/mL的氯仿溶剂提取物,37 °C恒温培养24 h,培养基中完全没有菌生长(透明)的最低浓度作为提取物的最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.4.2 最小杀菌浓度(MBC)测定:在最小抑菌浓度的基础上,将一无菌的含培养基的培养皿均分为6个部分,用接种环分别取编号为1~6的实验试管,接种于平板上对应的编号接种区,接种完成后,把培养皿置于恒温培养箱中,37 °C恒温培养24 h,平板中未见细菌生长的最低的药液浓度即为其对细菌的最小杀菌浓度。

1.2.5 *S. aureus* 成膜能力的测定

参考 Tremblay 等^[14]方法,采用结晶紫染色定量分析。用酶标仪于 A_{490} 下测 OD 值,记录结果。BF 形成阳性菌株的判断标准为:以 $A_{490} < 0.11$ 为阴性菌株, $0.11 < A_{490} < 0.5$ 为弱产膜菌株, $0.5 < A_{490} < 1.5$ 的为中产膜菌株, $A_{490} > 1.5$ 的为强产膜菌株。

1.2.6 冬凌草提取物对 *S. aureus* 生物膜形成的影响

结晶紫染色法:参照 O'Toole 等^[15]方法,采用96孔细胞培养板进行生物膜制备。分别在0 h和24 h添加冬凌草提取物浓度分别为1/2 MIC、1 MIC和2 MIC,同时以不含冬凌草提取物的TSB培养基作为空白对照,37 °C静置培养24、72 h和120 h后取出96孔细胞培养板,进行结晶紫染色15 min,染色后用蒸馏水清洗去除多余的结晶紫,然后加入95%乙醇溶解出结合于生物膜中结晶紫,并转移到另一酶标板,在595 nm处进行酶标仪测定吸光度。以上实验,每次测定均独立重复3次,计算平均值。

1.2.7 冬凌草提取物对 *S. aureus* 生物膜的清除

银染法:金黄色葡萄球菌 BF 制备和银染:参照

文献^[16],采用24孔细胞培养板进行生物膜制备。分别在0 h和24 h添加冬凌草提取物浓度分别为1/2 MIC、1 MIC、2 MIC,同时以不含冬凌草提取物的TSB培养基作为空白对照,37 °C静置培养,定时取出玻片进行银染。银染后普通光学显微镜观察。

1.2.8 冬凌草提取物对 *S. aureus* 生物膜胞外多糖的影响

采用24孔细胞培养板进行生物膜制备,采用荧光染料 Calcofluor 标记胞外多糖,荧光显微镜观察生物膜胞外多糖的分布情况^[17,18]。在每孔中加入600 μL 已灭菌的2%的琼脂,待其凝固后,每孔垂直插入无菌盖玻片(10 mm \times 10 mm)载体1片。加入100 μL 上述标准菌悬液,然后分别在培养0 h和24 h加入1.9 mL上述含不同质量浓度冬凌草提取物的TSB培养基,以不含冬凌草提取物的TSB培养基为空白对照。37 °C静置培养,每隔24 h,药物处理组更换1 mL含不同质量浓度冬凌草提取物的TSB培养基,对照组更换1 mL TSB培养基,分别在培养1、3 d和5 d的盖玻片取出,用PBS缓慢冲洗未粘附的细菌,向载玻片上加入20 μL 荧光增白剂和20 μL 10% KOH溶液,吹打均匀。将玻片放入染液上,静置1 min后,立即用荧光显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 冬凌草提取物对 *S. aureus* MIC 及 MBC 的测定

最低抑菌浓度和最低杀菌浓度是测量抗菌药物的抗菌活性大小的重要指标。本文对 *S. aureus* 的冬凌草提取物最小抑制浓度和最低杀菌浓度进行了测定。实验结果表明,冬凌草提取物对受试菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的最低抑菌浓度为125 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最小杀菌浓度为250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

冬凌草中主要抑菌活性成分为冬凌草甲素,因此,采用高效液相色谱法对冬凌草提取物的冬凌草甲素的含量进行了测定,实验结果见图1。由图1可知,采用有机溶剂对冬凌草抑菌活性分离提取后,获得的冬凌草提取物中主要成分是冬凌草甲素,其含量达到91 mg/g。

2.2 *S. aureus* 生物膜形成能力的测定

采用96孔板进行生物膜的制备,结晶紫染色后,使用酶标仪测定 A_{490} 的吸光度值为0.851,其值介于0.5~1.5之间,参照 Tremblay 等人的BF形成阳性菌株的判断标准,本实验采用的 *S. aureus* 为中产膜菌株。

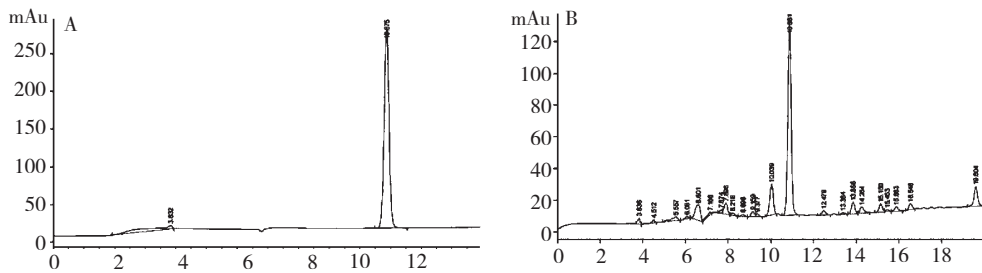


图1 冬凌草甲素(A)及冬凌草粗提取物(B)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of rubescensin(A) and *R. rubescens* extract(B)

2.3 冬凌草提取物对 *S. aureus* 生物膜形成的影响

结晶紫可以和细菌生物膜内物质结合而使细菌呈现颜色,因此,可以通过染色的方法对生物膜进行定量^[15]。本文采用结晶紫染色法研究了1/2 MIC、1 MIC和2 MIC三种不同质量浓度的冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜不同形成阶段的清除效果,实验结果见表1。由表1可知,冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制活性随着冬凌草提取物的质量浓度的升高而提高,且在生物膜形成的初始时间(0 h)加入冬凌草提取物,对金黄色葡萄球

菌生物膜形成的抑制活性要显著高于培养24 h后加入冬凌草提取物。

在生物膜形成的初始时间(0 h)加入冬凌草提取物,分别在药物作用的24、72 h和120 h测定生物膜的活菌数,2 MIC冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制率79%以上,而成膜24 h后加入冬凌草提取物,2 MIC冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除率60%左右。1 MIC和1/2 MIC冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成抑制活性很弱,且不随加入时间的改变而改变。

表1 不同质量浓度冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的影响

Table 1 Effect of different concentrations of *R. rubescens* extract on *S. aureus* biofilm formation

冬凌草提取物质量浓度 Concentrations	加入时间 Adding time (h)	抑制率 Inhibition rate (%)		
		24 h	72 h	120 h
2MIC(0.25 mg/mL)	0	79.23 ± 0.004	81.25 ± 0.023	83.56 ± 0.015
1MIC(0.125 mg/mL)	0	25.46 ± 0.006	32.49 ± 0.002	31.28 ± 0.008
1/2MIC(0.0625 mg/mL)	0	11.87 ± 0.009	9.95 ± 0.003	12.36 ± 0.023
2MIC(0.25 mg/mL)	24	63.58 ± 0.09	62.59 ± 0.012	67.31 ± 0.007
1MIC(0.125 mg/mL)	24	46.35 ± 0.011	48.24 ± 0.003	34.12 ± 0.006
1/2MIC(0.0625 mg/mL)	24	6.76 ± 0.005	8.17 ± 0.008	9.62 ± 0.014

2.4 冬凌草提取物对 *S. aureus* 生物膜的清除

采用银染法,通过显微镜观察了冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除效果,为更直观地观察冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除效果,冬凌草提取物的质量浓度提高至8 MIC,实验结果见图2。由图2可知,冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除效果随着冬凌草提取物浓度的升高而提高,初始时间加入冬凌草提取物能抑制生物膜的形成,且高浓度抑制的效果更明显,当冬凌草提取物浓度高于2 MIC,生物膜形成很少。与在初始时间加入冬凌草提取物相比,成膜培养24 h后加入不同浓度的冬凌草提取物,清除效果差,这也印

证了上文实验结果。

2.5 冬凌草提取物对 *S. aureus* 生物膜胞外多糖的影响

胞外多糖在细菌生物膜形成过程中扮演着至关重要的作用,因此,采用荧光染色法研究了冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成过程中胞外多糖合成的影响,实验结果见图3。由图3可知,冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌胞外多糖合成的抑制活性随着冬凌草提取物的质量浓度的升高而提高,且在生物膜形成的初始时间(0 h)加入冬凌草提取物,对金黄色葡萄球菌胞外多糖合成的抑制活性要高于培养24 h后加入冬凌草提取物。在生物膜形成的初

始时间(0 h)加入冬凌草提取物,分别在药物作用的24、72 h和120 h后经荧光染料染色后进行荧光显微镜观察,与同期对照组相比,高质量浓度药物(> 1 MIC)处理组产生的胞外多糖明显减少,表现在荧光强度弱和产生荧光的区域小。而成膜24 h后加入冬凌草提取物,其对金黄色葡萄球菌胞外多糖合

成的抑制活性较弱,高质量浓度药物(> 1 MIC)处理组出现了较多荧光染色区域。这表明,处理已经初步形成的金黄色葡萄球菌生物膜时,需要提供药物的质量浓度才能提高对胞外多糖合成的抑制活性。

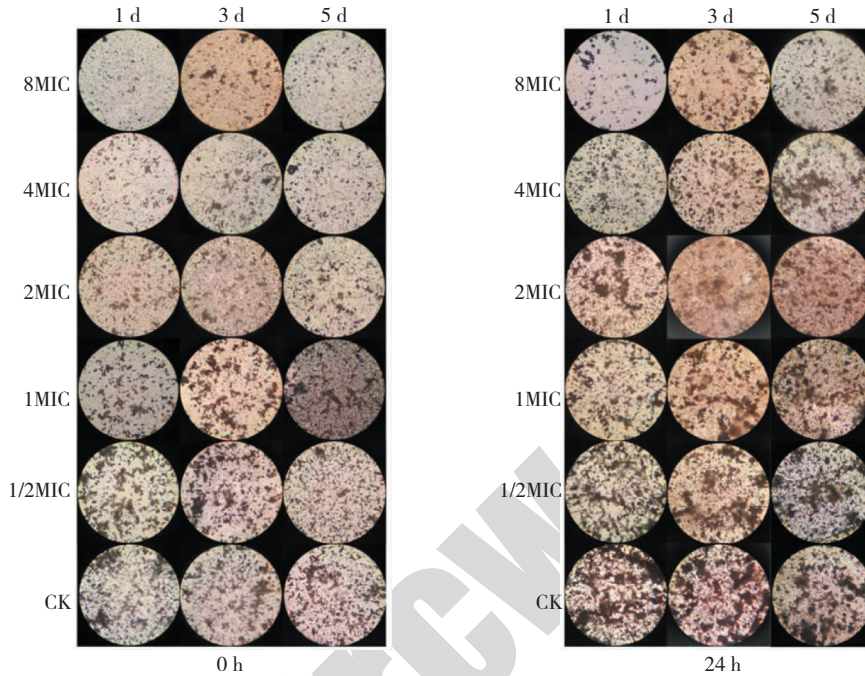


图2 不同加入时间的冬凌草提取物对 *S. aureus* 生物膜的清除

Fig. 2 Biofilm removal of *S. aureus* using *R. rubescens* extract under different adding time

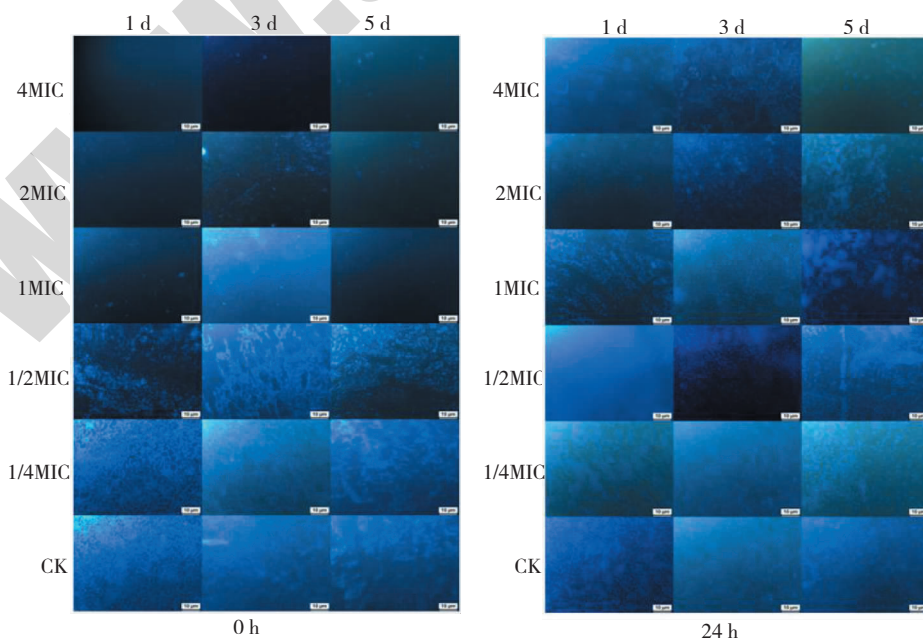


图3 不同加入时间的冬凌草提取物对 *S. aureus* 胞外多糖合成的影响

Fig. 3 Effects of extracellular polysaccharide synthesis of *S. aureus* using *R. rubescens* extract under different adding times

3 讨论与结论

金黄色葡萄球菌是一种常见的食源性病原菌,广泛存在于自然界中,且易粘附在食品加工设备、包装材料的表面并形成生物膜,造成设备腐蚀和食品污染,由其肠毒素引发的食品中毒事件屡屡发生。金黄色葡萄球菌也是危害奶牛业发展的重要疾病—奶牛乳腺炎的病原菌之一,其易形成生物膜的特性导致很难治疗由金黄色葡萄球菌引起的感染。

冬凌草是我国的特色中草药,1972年才从民间被发掘出来。由于其出色的抗肿瘤和抗菌效果,国内外的科学家从植物分类、活性成分的提取分离和结构鉴定、药理和临床应用等方面对其进行了系统深入的研究。1977年,冬凌草被收入《中华人民共和国药典》,并编入《全国中草药汇编》,1991年我国卫生部颁布中药材标准将其地上部分作为中药材^[19]。目前,冬凌草的应用主要有三大块:咽喉药市场、茶饮市场和抗癌药市场,也有一些应用与化妆品和保健牙膏的研究报道。作为天然抗癌抑菌植物,冬凌草被誉为“紫杉醇第二”,并被称为“绿色抗生素”,具有巨大的抗癌和抗菌的开发利用价值,是一种能够抑制食品有害菌和食品氧化的良好资源。

本文研究了冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制和清除作用。采用结晶紫法、MTT法、银染法和荧光染色法评价了冬凌草提取物在不同质量浓度和不同添加时间下干预金黄色葡萄球菌生物被膜形成的作用。实验结果表明,冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌的MIC和MBC分别为125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在生物膜形成的初始时间(0 h)加入冬凌草提取物,对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制活性要显著高于培养24 h后加入冬凌草提取物。在生物膜形成的初始时间(0 h)加入2MIC冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制率79%以上,而成膜24 h后加入冬凌草提取物,2 MIC冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成的清除率仅有60%左右。1 MIC和1/2 MIC冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜形成抑制活性很弱。冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌生物膜的清除效果随着冬凌草提取物浓度的升高而提高,初始时间加入冬凌草提取物能抑制生物膜的形成,且高浓度抑制的效果更明显,当冬凌草提取物浓度高于2 MIC,生物膜形成很少。与在初始时间加入冬凌草提取物相比,成膜培养24 h后加入不同浓度的冬凌

草提取物,清除效果差。

在生物膜形成的初始时间(0 h)加入冬凌草提取物,对金黄色葡萄球菌胞外多糖合成的抑制活性要高于培养24 h后加入冬凌草提取物,且冬凌草提取物对金黄色葡萄球菌胞外多糖合成的抑制活性随其质量浓度的升高而提高,与同期对照组相比,高质量浓度药物(>1 MIC)处理组产生的胞外多糖明显减少,表现在荧光强度弱和产生荧光的区域小。而成膜24 h后加入冬凌草提取物,其对金黄色葡萄球菌胞外多糖合成的抑制活性较弱,高质量浓度药物(>1 MIC)处理组出现了较多荧光染色区域。这表明,处理已经初步形成的金黄色葡萄球菌生物膜时,需要提供药物的质量浓度才能提高对胞外多糖合成的抑制活性。

参考文献

- 1 Pasmore M, Costerton JW. Biofilms bacterial signaling and their ties to marine biology. *J Ind Microbiol Biot*, 2003, 30: 407-413.
- 2 Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden N, et al. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int*, 2012, 45: 502-531.
- 3 Takahashi H, Kuramoyo S, Miya S, et al. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. *Food Control*, 2011, 22: 633-637.
- 4 Ciccio PD, Vergara A, Festino AR, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, 2015, 50: 930-936.
- 5 Sahari MA, Asgari S. Effects of plants bioactive compounds on foods microbial spoilage and lipid oxidation. *Food Sci Technol*, 2013, 1(3): 52-61.
- 6 Kang N, Zhang JH, Qiu F, et al. Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Cancer Lett*, 2010, 294: 147-158.
- 7 Cheng Y, Qiu F, Ye YC, et al. Oridonin induces G2/M arrest and apoptosis via activating ERK-p53 apoptotic pathway and inhibiting PTK-Ras-Raf-JNK survival pathway in murine fibrosarcoma L929 cells. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 490(1): 70-75.

(下转第1019页)