

分类号: R783.6
学号: 20222114137

密级: 内部★1年
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



姜黄素、槲皮素、百里香醌在种植体周围炎中的 抗菌效果评价及其作用机制研究

学位申请人	钱艺
指导教师	周政 教授
申请学位类别	专业硕士
专业名称	口腔医学
研究领域	修复与种植
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

分类号: R783.6
学号: 20222114137

密级: 内部★1年
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



姜黄素、槲皮素、百里香醌在种植体周围炎中的 抗菌效果评价及其作用机制研究

学位申请人	钱艺
指导教师	周政 教授
申请学位类别	专业硕士
专业名称	口腔医学
研究领域	修复与种植
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2025年5月

**Evaluation of Antibacterial Efficacy and Mechanism of Action of
Curcumin, Quercetin, and Thymoquinone in Peri-implantitis**

A Dissertation Submitted to
Shihezi University
In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Stomatological Medicine

By

Qian Yi
(Repair and planting)

Dissertation Supervisor: Prof. Zhou Zheng

May, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 钱光

时间：2025年5月17日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 钱光

时间：2025年5月17日

导师签名： 周敏

时间：2025年5月17日

摘要

目的：评估姜黄素（CU）、槲皮素（QU）及百里香醌（TQ）单独或联合使用对种植体周围炎主要致病菌（牙龈卟啉单胞菌 *P. gingivalis* 和伴放线放线杆菌 *A. actinomycetemcomitans*）生物表型的抑制效果，利用代谢组学探索最佳联合药物对其作用的抑制机制，通过网络药理学初步探索最佳联合药物对种植体周围炎的作用机制。

方法：通过微量稀释法测定姜黄素、槲皮素、百里香醌单独使用和联合使用时的最低抑菌浓度（MIC）和最低杀菌浓度（MBC）；通过棋盘法测定联合药敏实验（FICI 分析）；选取 1/2MIC、MIC、2MIC、4MIC 为单独使用药物的浓度，以 MIC 联合为联合药物浓度，以 48h 为时间点对两种细菌生长曲线进行测定；选取 MIC 单用和 MIC 联合为药物浓度，和两种细菌进行厌氧共培养 48h 后，对细菌的产酸水平、黏附能力进行定量检测；通过微量稀释法进行三种药物对牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌的生物膜抑制、清除实验，并确定出最低生物膜形成抑制浓度（MBIC）、最低清除已形成生物膜浓度（MBRC）；结合扫描电镜观察以上作用能力最强的药物联合对细菌微观结构的破坏作用；通过 LC-MS/MS 的方法，定量、定性的比较最佳联合药物对牙龈卟啉单胞菌和伴放线放线杆菌的代谢物差异，初步探索其对细菌的作用机制；通过网络药理学及分子对接的方法初步探讨最佳联合药物对种植体周围炎作用靶点及相关通路的作用机制。

结果：

1. CU、QU、TQ 单独使用对 *P. gingivalis* 的 MIC 分别为 3.75mM、20mM、33.5mM，对 *A. actinomycetemcomitans* 的 MIC 分别为 7.5mM、40mM、67mM，联合用药时的 MIC、MBC 均呈倍数性降低；CU+TQ 对 *P. gingivalis* 的 FICI=0.5，为协同作用，CU+QU/QU+TQ 对 *P. gingivalis* 的 FICI=0.75，为相加作用，CU+TQ/CU+QU/QU+TQ 对 *A. actinomycetemcomitans* 的 FICI=0.75，为相加作用；联合用药缩短了 *P. gingivalis* 和 *A. actinomycetemcomitans* 进入平台期时间，MIC 浓度的联合药物作用时细菌无明显生长曲线形态，且在细菌的生长对数期的抑制作用最明显，三种药物对 *P. gingivalis* 和 *A. actinomycetemcomitans* 的抑制作用随浓度的增加而增强；三种药物减少了 *P. gingivalis* 和 *A. actinomycetemcomitans* 产酸作用 ($P<0.05$)，降低了其黏附率 ($P<0.05$)；CU、QU、TQ 对 *P. gingivalis* 和 *A. actinomycetemcomitans* 的单菌种生物膜的形成均表现出较强的抑制作用；CU、QU、TQ 对 *P. gingivalis* 的 MBIC₅₀ 值分别为：7.5mM、20mM、67mM，CU、QU、TQ 对 *P. gingivalis* 的 MBRC₅₀ 值分别为：15mM、40mM、67mM，CU、QU、TQ 对 *A. actinomycetemcomitans* 的 MBIC₅₀ 值分别为：3.75mM、40mM、16.8mM，CU、QU、TQ 对 *A. actinomycetemcomitans* 的 MBRC₅₀ 值分别为：7.5mM、80mM、33.5mM，三种药物联合使用对 *P. gingivalis* 和 *A. actinomycetemcomitans* 的生物膜行清除时，药物浓度均比单独用药低；

2.扫描电镜显示 CU+TQ 联用破坏了细菌细胞膜完整性; CU+TQ 对 *P. gingivalis* 处理后的差异代谢物有 328 个, 具有统计学意义的有 184 个 ($P<0.05$), 其中上调的有 117 个, 下调的有 67 个, 差异物主要为脂质及类脂分子、有机酸及其衍生物等; CU+TQ 对 *A. actinomycetemcomitans* 处理后的代谢物有 295 个, 其中具有统计学意义的有 150 个 ($P<0.05$), 其中上调的有 78 个, 下调的有 72 个, 两种细菌的共同差异代谢物上调的有 19 个, 下调的有 7 个; 其作用的代谢通路主要为其他次生代谢物的生物合成、氨基酸代谢及脂质代谢;

3.CU+TQ 的化合物靶点有 336 个, 种植体周围炎的靶基因有 375 个, 联合药物治疗种植体周围炎的潜在靶点有 31 个, 其中核心靶点为 *TNF*、*IL6*、*MMP9*、*PTGS2*、*PPARG*、*MMP2*, 且分子对接呈现不同级别的结合活性; 联合药物主要通过 *Relaxin* 信号通路及 *IL-17* 信号通路治疗种植体周围炎。

结论: 姜黄素、槲皮素、百里香醌均对种植体周围炎主要致病菌中牙龈卟啉单胞菌和伴放线放线杆菌的生长活性、产酸能力、黏附能力、生物膜形成等生物表型有显著的抑制作用且联合用药比单独用药效果好; 姜黄素联合槲皮素、姜黄素联合百里香醌对牙龈卟啉单胞菌的抑制呈协同作用; 槲皮素联合百里香醌对牙龈卟啉单胞菌的抑制呈相加作用; 姜黄素、槲皮素、百里香醌两两联合使用对伴放线放线杆菌的抑制呈相加作用; 姜黄素联合百里香醌为抑制牙龈卟啉单胞菌和伴放线放线杆菌生物表型的最佳药物。姜黄素联合百里香醌通过破坏牙龈卟啉单胞菌和伴放线放线杆菌的细胞膜、干扰其代谢过程及能量对其起到抑制作用; 经网络药理学和分子对接验证, 姜黄素联合百里香醌可以通过与疾病相同的靶点基因治疗种植体周围炎, 并且治疗的关键可能在于血管的形成、组织的重塑以及抑制炎症级联反应等。

关键词: 种植体周围炎; 姜黄素; 槲皮素; 百里香醌; 协同作用

Abstract

Objective: To evaluate the inhibitory effects of curcumin (CU), quercetin (QU), and thymoquinone (TQ) alone or in combination on the biological phenotypes of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, the major pathogens of peri-implantitis. Metabolomics was used to explore the inhibitory mechanism of the optimal combination drug on bacterial synergy, and network pharmacology was employed to preliminarily investigate the mechanism of the optimal combination drug on peri-implantitis.

Methods: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of CU, QU, and TQ alone or in combination were determined using the microdilution method. Checkerboard assays were used for combined drug sensitivity testing (FICI analysis). Concentrations of 1/2MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC for single drugs and MIC combination for combined drugs were selected to measure bacterial growth curves at 48 hours. After anaerobic co-culture with bacteria for 48 hours at MIC single and MIC combined concentrations, bacterial acid production and adhesion ability were quantitatively detected. Microdilution assays were performed to evaluate biofilm inhibition and eradication effects of the three drugs on *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, and minimum biofilm inhibition concentration (MBIC) and minimum biofilm eradication concentration (MBRC) were determined. Scanning electron microscopy was used to observe the membrane damage effects of the most effective drug combination. LC-MS/MS was applied to quantitatively and qualitatively analyze differential metabolites of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* treated with the optimal combination, preliminarily exploring the antibacterial mechanism. Network pharmacology and molecular docking were used to investigate the potential targets and related pathways of the optimal combination in treating peri-implantitis.

Results:

1. The MIC values of CU, QU, and TQ against *P. gingivalis* were 3.75 mM, 20 mM, and 33.5 mM, respectively, and against *A. actinomycetemcomitans* were 7.5 mM, 40 mM, and 67 mM, respectively. MIC and MBC of combined drugs showed multiplicative decreases. CU+TQ exhibited synergy (FICI=0.5) against *P. gingivalis*, while CU+QU/QU+TQ showed additive effects (FICI=0.75). All combinations showed additive effects (FICI=0.75) against *A. actinomycetemcomitans*. Combined drugs shortened the lag phase of both bacteria; concentrations \geq MIC and combined drugs completely inhibited growth, with the

strongest effects during the logarithmic phase. Inhibitory effects increased with concentration. All drugs reduced acid production ($P<0.05$) and adhesion rates ($P<0.05$). MBIC₅₀ values for *P. gingivalis* were 7.5 mM (CU), 20 mM (QU), and 67 mM (TQ); MBRC₅₀ values were 15 mM (CU), 40 mM (QU), and 67 mM (TQ). For *A. actinomycetemcomitans*, MBIC₅₀ values were 3.75 mM (CU), 40 mM (QU), and 16.8 mM (TQ); MBRC₅₀ values were 7.5 mM (CU), 80 mM (QU), and 33.5 mM (TQ). Combined drugs required lower concentrations for biofilm eradication.

2. Scanning electron microscopy revealed membrane damage in bacteria treated with CU+TQ. CU+TQ induced 328 differential metabolites in *P. gingivalis* (184 significant, $P<0.05$; 117 upregulated, 67 downregulated), primarily lipids, lipid-like molecules, and organic acid derivatives. In *A. actinomycetemcomitans*, 295 differential metabolites were identified (150 significant; 78 upregulated, 72 downregulated). Common differential metabolites included 19 upregulated and 7 downregulated compounds. Key metabolic pathways involved biosynthesis of other secondary metabolites, amino acid metabolism, and lipid metabolism.

3. CU+TQ had 336 compound targets, and peri-implantitis had 375 disease targets. Thirty-one overlapping targets were identified, with core targets *TNF*, *IL6*, *MMP9*, *PTGS2*, *PPARG*, and *MMP2* showing varying binding affinities in molecular docking. The combination primarily acted through the relaxin and IL-17 signaling pathways.

Conclusion: CU QU and TQ significantly inhibited growth, acid production, adhesion, and biofilm formation of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, with combined effects superior to monotherapy. CU+TQ and CU+QU showed synergy against *P. gingivalis*, while QU+TQ showed additivity. All combinations showed additivity against *A. actinomycetemcomitans*. CU+TQ exerted antibacterial effects via membrane damage, metabolic disruption, and energy perturbation. CU+TQ targets shared pathways with peri-implantitis, potentially acting through angiogenesis, tissue remodeling, and inflammation inhibition.

Key words: Peri-implantitis; Curcumin; Quercetin; Thymoquinone; Synergistic effect.

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	1
英文缩略语.....	1
第1章 前言.....	1
第2章 姜黄素、槲皮素、百里香醌对种植体周围炎中牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌的表型研究.....	3
2.1 材料与制备.....	3
2.1.1 主要材料和试剂.....	3
2.1.2 细菌及培养基.....	3
2.1.3 培养基配制.....	4
2.2 研究方法.....	4
2.2.1 姜黄素、槲皮素、百里香醌药液的制备.....	4
2.2.2 细菌活化及菌液制备.....	4
2.2.3 药物对主要致病菌最低抑菌浓度（MIC）及最低杀菌浓度（MBC）的测定.....	5
2.2.4 联合药敏的测定.....	5
2.2.5 药物对主要致病菌细菌生长曲线测定.....	6
2.2.6 药物对主要致病细菌浮游状态产酸水平的影响.....	6
2.2.7 药物对主要致病细菌黏附能力的影响.....	6
2.2.8 药物对主要致病细菌单菌种生物膜最低生物膜形成抑制浓度（minimum biofilm inhibition concentration, MBIC）、最低清除已形成生物膜浓度（minimum biofilm reduction concentration, MBRC）的测定.....	7
2.2.9 统计学方法.....	8
2.3 实验结果.....	8
2.3.1 牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌的复苏、鉴定及培养.....	8
2.3.2 MIC 及 MBC 的测定结果.....	9
2.3.3 姜黄素、槲皮素、百里香醌联合药敏测试结果.....	10
2.3.4 姜黄素、槲皮素、百里香醌对两种主要致病细菌生长曲线的影响.....	10

2.3.5 姜黄素、槲皮素、百里香醌对两种主要致病细菌产酸的影响	11
2.3.6 姜黄素、槲皮素、百里香醌对两种致病细菌黏附能力的影响	12
2.3.7 姜黄素、槲皮素、百里香醌对两种主要致病细菌单菌种生物膜 MBIC 和 MBRC 的测定	13
2.4 讨论	14
第 3 章 基于 LC-MS/MS 非靶代谢组学分析药物对 <i>P.gingivalis</i>、<i>A.actinomycetemcomitans</i> 的作用机制	18
3.1 实验材料与设备	18
3.1.1 试剂耗材	18
3.1.2 仪器设备	18
3.2 实验方法	18
3.2.1 药物对主要致病细菌细胞膜的破坏作用	18
3.2.2 LC-MS/MS 前处理方法	19
3.2.3 上机条件	19
3.2.4 数据注释条件	20
3.2.5 KEGG 富集通路分析	20
3.3 实验结果	20
3.3.1 姜黄素、槲皮素、百里香醌对两种主要致病细菌细胞膜的破坏作用	20
3.3.2 非靶向代谢物的分析与筛选	21
3.3.3 差异代谢物分析	22
3.3.4 KEGG 富集分析	25
3.4 讨论	27
第 4 章 基于网络药理学与分子对接初步探讨姜黄素联合百里香醌治疗种植体周围炎的作用机制	30
4.1 主要数据来源与工具	30
4.2 实验方法	30
4.2.1 筛选药物的活性化学成分	30
4.2.2 获取种植体周围炎相应的靶基因信息	31
4.2.3 姜黄素和百里香醌治疗种植体周围炎的交集靶点	31
4.2.4 构建中药-成分-靶点网络	31
4.2.5 PPI 网络图的构建与核心靶点筛选	31
4.2.6 姜黄素联合百里香醌治疗种植体周围炎作用靶点的 GO 与 KEGG 富集分析	32

4.2.7 关键药物成分与靶点基因的分子对接验证	32
4.3 实验结果	32
4.3.1 姜黄素联合百里香醌中的有效成分和靶点的获取	32
4.3.2 姜黄素联合百里香醌治疗种植体周围炎的潜在靶点	33
4.3.3 “药物-成分-核心靶点”网络分析	33
4.3.4 PPI 蛋白互作网络图分析及核心靶点的筛选	34
4.3.5 药物-活性成分-作用靶点-信号通路网络分析	35
4.3.6 核心作用靶点与核心活性成分的分子对接	37
4.4 讨论	40
第 5 章 结论	43
第 6 章 综述	44
参考文献	49
作者简介	59
致谢	60
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	61

英文缩略语

英文缩写	英文全名	中文译名
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	最低抑菌浓度
MBC	Minimize Bactericidal Concentration	最低杀菌浓度
MBIC	Minimum Biofilm Inhibition Concentration	最低生物膜形成抑制浓度
MBRC	Minimum Biofilm Reduction Concentration	最低清除已形成生物膜浓度
OD	Optical Density	吸光度值
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砜
CU	Curcumin	姜黄素
QU	Quercetin	槲皮素
TQ	Thymoquinone	百里香醌
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	牙龈卟啉单胞菌
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	伴放线放线杆菌

第 1 章 前言

种植体周围炎是种植体种植失败的常见原因之一，该疾病患病率高 22%^[1,2]，是一种由口腔生物膜引起的牙种植体周围炎症状态。种植体植入口内后，致病菌粘附于其表面并形成生物膜，这是导致种植体植入术后感染的主要原因^[3,4]，与种植体周围炎相关的细菌大多数是革兰氏阴性厌氧菌，其中牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*），在种植体周围炎患者中的检出率较高^[1,2,5-7]；伴放线聚集杆菌（*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomitans*）在种植体周围炎中起重要作用^[1,5,8]。

种植体周围炎的临床症状表现为：黏膜颜色的发红、肿胀、探诊出血、种植体周围袋内有溢脓、探诊深度的增加、种植体周骨吸收，当疾病进展时可能出现的种植体松动，甚至脱落，是目前种植体失败的最主要因素^[9-11]，种植体周围炎的治疗重点是控制感染创造易于菌斑控制的条件以及促进种植体周围骨再生^[12]Mombeli 和 Lang^[13]提出了累加阻断性支持治疗（cumulative interceptive supportive therapy, CIST）的序列治疗程序。CIST 根据病损的严重程度和范围，依次给与机械治疗、杀菌治疗和抗生素治疗等，以控制进行中的感染，随后采用切除性手术或再生性手术处理骨缺损。但因种植体表面结构粗糙，使得种植体周围袋深处的细菌生物膜难以清除常需联合抗生素进行治疗。然而，有部分报告指出种植体周围炎受试者中有 71.7%在体外表现出对一种或多种测试抗生素的粘膜下细菌病原体耐药^[14]。并且，常用于种植体周围炎及牙周炎辅助治疗的抗生素，如多西环素和米诺环素有不良的副作用和局限性^[15,16]，因此相对安全的天然产物或传统中草药植物可用作这些抗菌剂的替代品。在这些天然产物或传统中草药植物中，姜黄素（Curcumin, CU）^[17-19]、槲皮素（Quercetin, QU）^[20,21]、百里香醌^[22,23]（Thymoquinone, TQ）均被广泛报道有抗口腔抗生物膜及抗菌活性，是较有潜力的药物。姜黄素是一种源自咖喱香料的亲脂性多酚^[24]，具有抗炎，抗菌，抗氧化和收敛性能，当其用于牙龈下冲洗时，显著改善了牙龈健康^[25]，姜黄素对牙龈卟啉单胞菌表现出抗生物膜和抗菌活性^[19]，并且姜黄素联合蓝光可利用光动力灭活伴放线聚集杆菌^[25]。槲皮素是一种从樱桃水果和蔬菜中提取的膳食类黄酮，近年来，由于具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗过敏等活性而被证明具有重要的药用价值^[26-28]。槲皮素可引起细菌膜的破坏，导致细菌表面和内部结构的破坏，发挥抗菌活性^[29]。其单独或连用其他药物对牙龈卟啉单胞菌^[20]、伴聚集放线杆菌^[30]有一定的杀灭作用。百里香醌也称为 2-异丙基-5-甲基-1,4-苯醌，是从黑种草种子（黑孜然）分离的挥发性油的主要生物活性成分（27.8-57.0%）黑种草籽^[31]，百里香

醌具有多种药理学特性，包括抗氧化、抗炎、抗癌以及针对细菌和真菌的抗菌特性^[32]。此外，百里香醌对牙龈卟啉单胞菌及伴放线聚集杆菌具有强效的抗菌特性^[22, 23]。百里香醌和四环素联用可以降低抗生素耐药现象^[33]。

姜黄素、槲皮素及百里香醌都具有对种植体周围炎的致病菌的抗菌作用。但对于种植体周围炎的主要致病菌的相比之下，哪种药物的抗菌作用最好？亦或是它们联合使用时会更好？在药物联用方面，姜黄素被证实与根皮素联合使用对金黄色葡萄球菌的抑菌作用优于单独使用^[34]，槲皮素和姜黄素在体外联合使用对耐甲西林金黄色葡萄球菌表现出协同抗菌作用^[27]，还有研究聚焦于槲皮素和姜黄素^[35]，姜黄素和百里香醌^[36]的联合使用表现出的潜在抗肿瘤活性^[37]，但是此三种药物的联合使用在种植体周围炎的主要致病菌的抗菌作用尚未见研究。并且当三种药物混合使用时，他们相互间会出现协同？拮抗？还是其他作用？因此，本研究拟从体外抗菌实验对姜黄素、槲皮素及百里香醌三种药物单独或联合使用时对种植体周围炎优势菌群的表型作用进行评价，比较出疗效最优的药物或药物组合，再从代谢方面研究此最佳药物组合对种植体周围炎主要致病菌的抗菌机制，以及从网络药理学上初探最佳药物组合治疗种植体周围炎的作用机制，以期为治疗种植体周围炎的抗菌药物提供新的选择，并为进一步开发治疗种植体周围炎的复合药物提供理论依据。

第2章 姜黄素、槲皮素、百里香醌对种植体周围炎中牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌的表型研究

2.1 材料与制备

2.1.1 主要材料和试剂

槲皮素：西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司，CAS号：117-39-5；
姜黄素：西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司，CAS号：458-37-7；
百里香醌：西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司，CAS号：490-91-5；
盐酸米诺环素：瀚晖制药有限公司，国药准字号：H20174080；
厌氧产气袋：日本两菱瓦斯化学株式会社，货号：C-35；
革兰氏染色液试剂盒：北京索莱宝科技有限公司，货号：G1060；
无菌过滤器（0.22 μ m）：武汉塞维尔生物科技有限公司，货号：SF-PES-223301；
结晶紫：北京索莱宝科技有限公司，CAS号：548-62-9；
二甲基亚砜（DMSO）：北京索莱宝科技有限公司，货号：D8371

2.1.2 细菌及培养基

牙龈卟啉单胞菌（*P. gingivalis* bio-53046，引种于 ATCCBAA-308），智立中特（武汉）生物科技有限公司；

伴放线放线杆菌（*A. actinomycetemcomitans* BNCC337071，引种于 ATCC700685），商城北纳创联生物科技有限公司；

脑心浸出液液体培养基（BHI）：青岛海博生物技术有限公司，货号：HB8297-1；
氯化血红素：青岛海博生物技术有限公司，货号：HB0310a；
维生素 K1：青岛海博生物技术有限公司，货号：HB0310b；
琼脂粉：兰杰柯科技有限公司，货号：bs195；
脱纤维羊血：青岛海博生物技术有限公司，货号：1001339-1；
胎牛血清（FBS）：浙江天杭生物科技股份有限公司，货号：11011-8611

2.1.3 培养基配制

BHI 液体培养基制备：电子天秤称量 3.85g BHI 培养基，加入 100mL 纯水，加热搅拌待完全溶解后，放入 121℃、20min 高压灭菌，冷却至 55℃时，加入 0.1mL 氯化血红素及 0.1mL 维生素 K₁溶液，加入 FBS，形成含 2%FBS 的 BHI 液体培养基；

BHI 血琼脂平板制备：电子天秤称量 3.85g BHI 培养基，加入 0.9g 琼脂，加入 100mL 纯水，加热搅拌待完全溶解后，放入 121℃、20min 高压灭菌，冷却至 55℃左右，加入 0.1mL 氯化血红素、0.1mL 维生素 K₁溶液及 5mL 无菌脱脂纤维羊血，混合均匀后排出多余气泡，每平板倾注 20mL，冷却后待用。

2.2 研究方法

2.2.1 姜黄素、槲皮素、百里香醌药液的制备

姜黄素 (CU)，≥80% (HPLC)。浓度为 60mM 的姜黄素母液：将姜黄素溶于的 BHI 液体培养基 (含 1%DMSO) 中，经 0.22μm 的无菌滤器过滤后，置 4℃冰箱内备用。将姜黄素母液按照倍比稀释法溶于 BHI 液体培养基 (含 1%DMSO) 中，使其最终浓度为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.9375、0.46875、0.234375mM；

槲皮素 (QU)，≥95% (HPLC)。浓度为 320mM 的槲皮素母液：将槲皮素溶于含 BHI 液体培养基 (含 1%DMSO) 中，经 0.22μm 的无菌滤器过滤后，置 4℃冰箱内备用。将槲皮素母液按照倍比稀释法溶于 BHI 液体培养基 (含 1%DMSO) 中，使其最终浓度为 160、80、40、20、10、5、2.5mM；

百里香醌 (TQ)，≥98% (HPLC)。浓度为 134mM 的百里香醌母液：将百里香醌溶于 BHI 液体培养基 (含 1%DMSO) 中，经 0.22μm 的无菌滤器过滤，置 4℃冰箱内备用。将百里香醌母液按照倍比稀释法溶于 BHI 液体培养基 (含 1%DMSO) 中，使其最终浓度为 67、33.5、16.75、8.375、4.1875、2.09375mM；

2%盐酸米诺环素溶液：称取盐酸米诺环素粉末 20mg，加入甘油 10mL，震荡混匀后，即得 2%盐酸米诺环素溶液，置 4℃冰箱避光保存备用。

2.2.2 细菌活化及菌液制备

细菌活化复苏：将牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌取出冻干管后，放入 0.5mL 纯水充分溶解后，吸取 200μL 菌悬液放入 BHI 血琼脂平板表面，均匀涂布，于 37℃厌氧培养 96h。用接种环取一环菌以平板划线法放入 BHI 血琼脂平板，于 37℃厌氧培养 48h。