

基于序贯分析的绿原酸与头孢噻肟钠相互作用评价

刘爽^{1,2}, 王真真^{1,2}, 谢以清³, 龙江兰^{1,2}, 李江玲^{2,4}, 王爱婷^{1,2},
马强^{3*}, 鄢丹^{1,2*}

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050; 2. 北京市临床药学研究所, 北京 100050;
3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 4. 成都中医药大学药学院, 四川成都 611137)

摘要: 含有绿原酸 (chlorogenic acid, CA) 的中药注射剂与头孢噻肟钠 (cefotaxime sodium, CS) 联合用药在临床上时有发生, 但药物相容性的科学依据尚薄弱。本研究提出基于等温滴定量热技术、冷喷雾电离质谱技术和抑菌活性测评的序贯分析策略, 评价 CA 与 CS 分子间相互作用。等温滴定量热实验表明, CA 滴定 CS 时吉布斯自由能 $\Delta G < 0$ 且由焓变驱动, 提示二者发生了自发化学反应。通过冷喷雾电离质谱发现 CA 与 CS 混合后存在结合态特征离子 m/z 808.143 5, 确认 CA 与 CS 发生了化学结合。通过抑菌实验发现, CA 可显著降低 CS 对肺炎克雷伯菌的抑菌能力 ($P < 0.01$)。进一步通过分子对接技术表明, CA 与 CS 具有共同作用靶点青霉素结合蛋白 3 (penicillin binding protein 3, PBP3), 提示 CA 显著降低 CS 抑菌能力可能与二者竞争性结合 PBP3 有关。综上, CA 可与 CS 发生自发化学结合并降低其抑菌能力, 为绿原酸与头孢噻肟钠相互作用评价提供了研究思路与关键技术。

关键词: 绿原酸; 头孢噻肟钠; 肺炎克雷伯菌; 分子互作; 化学结合

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1471-06

Evaluation of interaction of chlorogenic acid and cefotaxime sodium based on sequential analysis

LIU Shuang^{1,2}, WANG Zhen-zhen^{1,2}, XIE Yi-qing³, LONG Jiang-lan^{1,2}, LI Jiang-ling^{2,4},
WANG Ai-ting^{1,2}, MA Qiang^{3*}, YAN Dan^{1,2*}

(1. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Beijing Institute of Clinical Pharmacy, Beijing 100050, China; 3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;
4. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: The joint application of traditional Chinese medicine injection containing chlorogenic acid (CA) and cefotaxime sodium (CS) is sometimes appeared in clinical practice, but the scientific basis of drug molecular compatibility is still weak. This study proposes a sequential analysis strategy based on isothermal titration calorimetry (ITC), cold-spray ionization mass spectrometry (CSI-MS) and antibacterial activity test to evaluate the molecular interactions between CA and CS. The results of ITC experiments showed that the Gibbs free energy $\Delta G < 0$ and it was driven by enthalpy change when CA titrated CS, suggesting CA could spontaneously chemically react with CS. Subsequently, the parent ions (m/z 808.143 5) of binding molecular of CA and CS was detected by CSI-MS, indicating CA could chemically bond with CS. Furtherly, the antibacterial experiments found the antibacterial ability of CS against *Klebsiella pneumonia* was significantly reduced ($P < 0.01$) by CA in mixed solution. Finally, molecu-

收稿日期: 2021-11-24; 修回日期: 2022-02-08.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (82130112); 国家自然科学基金面上项目 (81773891); 北京市优秀人才“青年拔尖团队”项目 (2018000021223TD09); 北京市“登峰人才”项目 (DFL20190702).

*通讯作者 Tel: 86-10-53897463, E-mail: maqiang@caiq.org.cn;

Tel: 86-10-63139318, E-mail: danyan@ccmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1680

lar docking technology showed CA and CS have a common target of penicillin binding protein 3 (PBP3), suggesting that the phenomenon of CA reduced the antibacterial ability of CS may be related to the competitive binding of two components with PBP3. Our studies have shown that CA could spontaneously chemically bond to CS and reduced its antibacterial ability, providing scientific data for molecular interaction evaluation of CA and CS.

Key words: chlorogenic acid; cefotaxime sodium; *Klebsiella pneumoniae*; molecular interaction; chemical bonding

绿原酸 (chlorogenic acid, CA) 属于苯丙素类小分子物质, 对包括肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 在内的多种细菌具有抑制活性^[1,2]。头孢噻肟钠 (cefotaxime sodium, CS) 属于第三代头孢菌素, 对大肠埃希菌、克雷伯菌属和沙门菌属等革兰阴性菌具有抑菌活性。含有绿原酸的中药注射剂与头孢噻肟钠在临床上联合应用的现象时有发生^[3-6], 但药物分子相容性尚缺乏科学数据支撑。

具有生物活性的药物相互作用主要表现在两个方面: 化学水平的直接相互作用和生物水平的间接相互作用。化学相互作用可以物理化学领域中的等温滴定量热分析^[7,8], 通过焓变和熵变的检测判断分子间是否存在自发反应; 进一步基于冷喷雾电离质谱判断分子间是否发生了弱键化学结合^[9,10]。然而, 分子间化学相互作用检测在满足高通量的同时, 尚难以说明是否影响其生物活性。因此, 本研究提出序贯分析策略^[11], 从物理化学、化学分析和生物活性角度, 序贯地进行绿原酸和头孢噻肟钠相互作用评价。即采用等温滴定量热技术、冷喷雾电离质谱评价绿原酸和头孢噻肟钠化学相互作用, 进一步采取抑菌活性实验 (结合前后对肺炎克雷伯菌抑菌能力) 评价二者生物水平相互作用^[12,13], 以期药物相互作用评价提供研究思路和关键技术。

材料与方法

药品与试剂 绿原酸 (成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: MUST-21070910; 纯度大于 98%); 注射用头孢噻肟钠 (华北制药河北华民药业有限责任公司, 批号: DF3200402); 二甲基亚砜 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 628T031); 色谱级甲醇 (美国 Thermo Fisher 公司); 营养肉汤培养基 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 1121E03210)。

仪器 SQP 电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司); Milli-Q 超纯水机 (德国 Merck 公司); NANO ITC 等温滴定量热仪 (美国 TA 公司); Q-Exactive 质谱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LRH-250 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); Synergy H1 多功

能微孔板检测仪 (美国 BioTek Instruments 公司)。

等温滴定量热技术检测分子间相互作用 精密称取绿原酸和头孢噻肟钠适量, 加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和超纯水 (使溶液中 DMSO 占比为 2%), 混匀, 使绿原酸浓度为 10.0 mmol·L⁻¹, 头孢噻肟钠浓度为 1.0 mmol·L⁻¹。分别进行绿原酸溶液滴定头孢噻肟钠溶液和绿原酸溶液滴定空白溶液的实验。滴定条件为每次 20 滴, 温度 25 °C、转速 300 r·min⁻¹。利用 NanoAnalyze 3.8.0 软件对热量变化曲线进行分析, 热力学参数关系式 $\Delta G = -RT\ln K$ 和 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 计算 (ΔG : 吉布斯自由能; R : 气体常数; K : 平衡常数; ΔH : 焓变; T : 绝对温度; ΔS : 熵变)。

冷喷雾电离质谱技术检测分子化学结合 精密称取绿原酸和头孢噻肟钠适量, 甲醇溶解后制备绿原酸和头孢噻肟钠浓度比 1:5 的混合溶液, 即得混合样品溶液。针泵进样, 进样量 200 μ L, 电喷雾离子源, 辅助气加热器温度为 25 °C, 辅助气流速 0.33 L·min⁻¹, 将通过冷凝装置的氮气接入代替原电喷雾离子源鞘气, 喷雾电压为 3.5 kV, S-lens 电压为 55 V, 毛细管电压为 320 V, 扫描范围 m/z 300~1 000。

细菌保存及活化 肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, BNCC102997) 购于北京北纳创联生物技术研究院。取细菌冻干粉, 用 10 mL 营养肉汤培养基溶液充分溶解后, 4 °C 保存备用。实验前, 将冷藏菌液传代 2 次活化后使用。

肺炎克雷伯菌生长曲线测定 取 20 mL 营养肉汤培养基, 按 1% 比例接种活化菌液, 混匀后分装入 13 支试管, 于生化培养箱中以 37 °C 培养 12 h, 每间隔 2 h 取一支试管, 利用酶标仪测定 A_{600} 。分别测定 0~24 h 的菌液浓度。

绿原酸和头孢噻肟钠单用、联用对细菌生长的影响 配制 5% DMSO 培养基溶液, 倍比稀释使溶液中 DMSO 比例分别为 5%~0.04%。利用 1% DMSO 培养基溶液配制 10.0 mg·mL⁻¹ 绿原酸母液, 以培养基溶液稀释成浓度分别为 9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0、2.0 和 1.0 mg·mL⁻¹ 绿原酸溶液。以培养基溶液配制浓度为 13.0 μ g·mL⁻¹ 的头孢噻肟钠溶液, 倍比稀释浓度分别为

13.0~0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将上述不同浓度绿原酸溶液、头孢噻肟钠溶液和 DMSO 溶液分别加入 96 孔板中, 每孔 200 μL , 每组 3 个复孔。向各孔中加入对数生长期菌液 50 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后测定 A_{600} 。以上实验重复 3 次。同样地, 以 1% DMSO 培养基制备绿原酸组 (6.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)、头孢噻肟钠组 (1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、联用组 (绿原酸浓度 6.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、头孢噻肟钠浓度 1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和空白组 (1% DMSO 培养基), 如上操作检测 A_{600} 。

分子对接探寻绿原酸和头孢噻肟钠对肺炎克雷伯菌的结合位点 从 RCSB 蛋白质数据库获得青霉素结合蛋白 (penicillin binding proteins, PBPs) 亚型 PBP2 (PDB code 5LP4)、PBP3 (PDB code 3OC2) 和 PBP4 (PDB code 1TVF) 结构。从 PubChem 获得绿原酸和头孢噻肟钠的分子结构。分子对接使用 Discovery Studio 2016 进行, 计算 RMSD 值^[14]。

统计学分析 所有统计数据采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 GraphPad Prism 8.0 和 OriginPro 2018 软件进行数据分析和作图。两组间的差异性分析用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 绿原酸与头孢噻肟钠发生分子相互作用

研究采取绿原酸溶液滴定头孢噻肟钠溶液和绿原酸溶液滴定空白溶液。绿原酸滴定空白溶液的过程为吸热过程, 而绿原酸滴定头孢噻肟钠的过程中放出大量热量 (图 1A)。热力学参数吉布斯自由能 $\Delta G = -17.12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表明绿原酸与头孢噻肟钠间反应的自发性, 同时 $\Delta H = -15.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 、 $-T\Delta S = -1.227 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。研究表明在该自发反应过程中焓变的贡献大于熵变 (图 1B), 即绿原酸与头孢噻肟钠间发生的自发反应为化学反应。

2 绿原酸与头孢噻肟钠发生自发化学结合

在负离子模式下, 绿原酸特征离子有 m/z 353.086 7 [M-H]⁻ 和 m/z 707.179 0 [2M-H]⁻ (图 2A); 头孢噻肟钠

特征离子为 m/z 454.048 9 [M-Na]⁻ (图 2B); 绿原酸与头孢噻肟钠发生化学结合后生成的新物质结合态特征离子为 m/z 808.144 2 [M-Na]⁻ (图 2C)。对绿原酸和头孢噻肟钠结合生成的新离子进行二级质谱分析, 在二级质谱 (图 2D) 中出现了绿原酸 (m/z 353.086 4) 与头孢噻肟钠 (m/z 454.049 3) 的特征离子峰, 证明绿原酸与头孢噻肟钠间发生了自发化学结合。

3 绿原酸降低头孢噻肟钠的抑菌能力

在实验室培养条件下, 菌液浓度 A_{600} 在 0.2~0.5 内, 细菌生长状态良好, 处于对数生长期 (图 3A)。溶液中 DMSO 的比例会影响细菌的生长, 随着溶液中 DMSO 的占比下降, 菌液 A_{600} 随之升高, 当溶液中 DMSO 占比为 1.25% 时, 其对细菌生长无抑制作用, 表明溶解绿原酸时可以使用最高 DMSO 比例为 1.25% (图 3B)。当绿原酸浓度为 10.0~8.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 菌液 A_{600} 随绿原酸浓度变化较小; 当绿原酸浓度在 7.0~4.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 随着绿原酸的浓度降低菌液 A_{600} 随之升高 (图 3C)。当头孢噻肟钠浓度为 13.0~3.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 菌液 A_{600} 随头孢噻肟钠浓度变化较小; 当头孢噻肟钠浓度为 1.61~0.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 菌液 A_{600} 随头孢噻肟钠浓度降低而升高 (图 3D)。当绿原酸 (6.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和头孢噻肟钠 (1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 单独与联合作用于肺炎克雷伯菌时, 从第 16 h 开始联合使用组 A_{600} 较头孢噻肟钠组显著升高 ($P < 0.01$, 图 3E), 表明联合使用组对细菌生长的抑制能力弱于头孢噻肟钠组, 即绿原酸显著降低了头孢噻肟钠对肺炎克雷伯菌的抑菌能力。

4 绿原酸与头孢噻肟钠对 PBP3 竞争性结合

头孢噻肟钠属于 β -内酰胺类抗生素, 该类药是通过与细菌表面的 PBPs 结合, 阻断细菌细胞壁的合成而产生抑菌作用^[15]。为了探究绿原酸降低头孢噻肟钠抑菌能力的原因, 基于 PBPs 的亚型结构 PBP2、PBP3 和 PBP4 进行分子对接研究。头孢噻肟钠的分子对接结果表明, 其与 PBP2 和 PBP3 结合较好, 与 PBP4 结合较差, 提示 PBP2 和 PBP3 可能为头孢噻肟钠抑菌作用

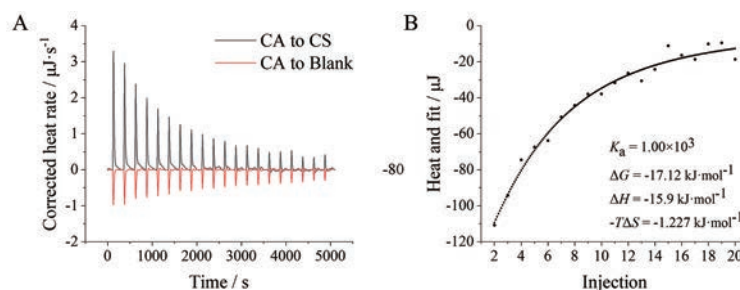


Figure 1 Isothermal titration calorimetry analysis of chlorogenic acid (CA) and cefotaxime sodium (CS). A: Energy maps of CS solution and 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) aqueous solution (blank) titrated with CA solution, respectively; B: Heating curve and thermodynamic parameters of CS solution titrated by CA solution

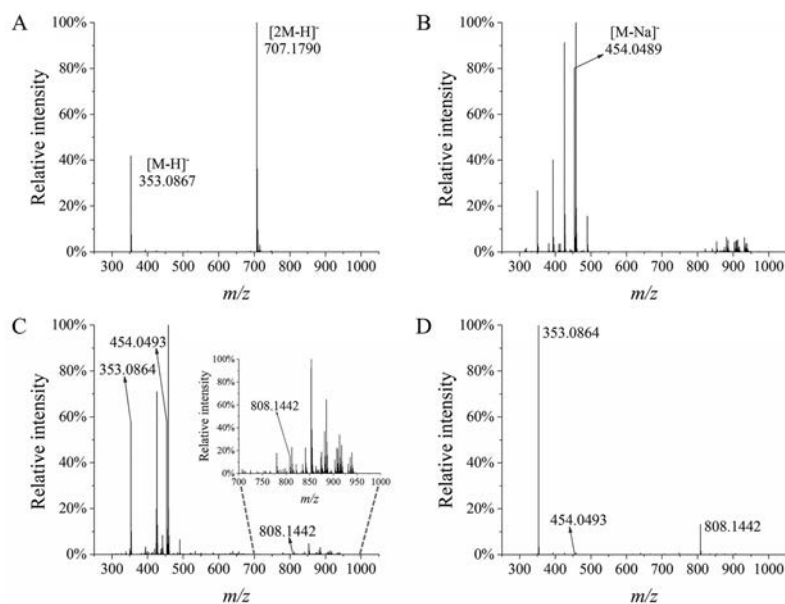


Figure 2 Cold-spray ionization mass spectrometry of CA and CS. A: Full scan mass spectrum of CA; B: Full scan mass spectrum of CS; C: Full scan mass spectrum of mixture of CA and CS; D: MS² spectrum of the binding molecule of CA and CS. Ions of m/z 353.086 4 and m/z 454.049 3 are parent ions of CA and CS. The ion of m/z 808.144 2 is the parent ion of binding molecules of CA and CS

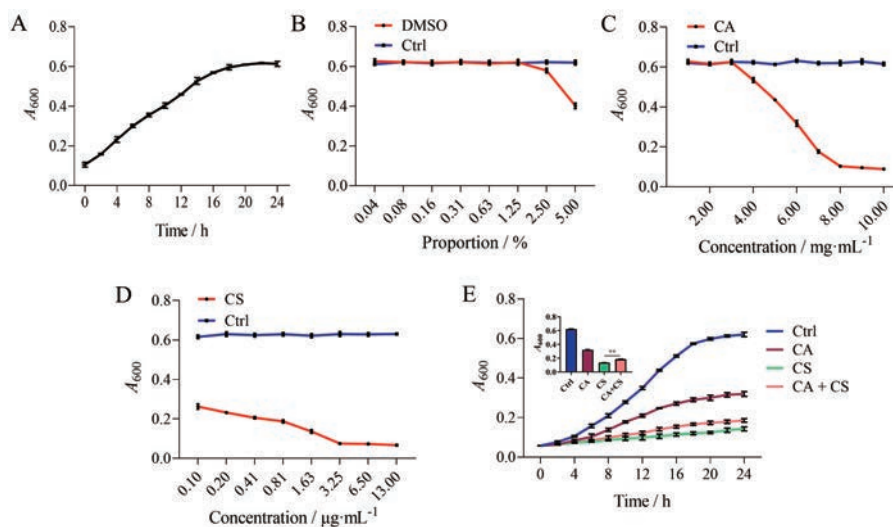


Figure 3 Antibacterial effect of CA and CS against *Klebsiella Pneumoniae* (*K. pneumoniae*). A: Growth curve of *K. pneumoniae* at optical density of 600 nm; B: Antibacterial effect of DMSO; C: Antibacterial effect of CA; D: Antibacterial effect of CS; E: Bacteria were treated with CA and CS separate or in combination and the optical density at 24 h (CA: 6.0 mg·mL⁻¹, CS: 1.6 μg·mL⁻¹, CA+CS: CA 6.0 mg·mL⁻¹ and CS 1.6 μg·mL⁻¹, Ctrl: control group). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$

的靶点。针对与头孢噻肟钠具有较好结合的PBP2和PBP3进行绿原酸分子对接实验,结果表明,绿原酸与其均有较好结合。在PBP2上,两种成分与蛋白上氨基酸残基结合时无明显规律,且在空间上的结合位点相距较远,表明PBP2与绿原酸降低头孢噻肟钠抑菌能力现象的关联性较低。在PBP3上,绿原酸结合的氨基酸残基(图4D)和头孢噻肟钠结合的氨基酸残基(图4E)有较强相似性,同时二者与蛋白结合时在空间上产生

了竞争作用(图4C)。研究提示,绿原酸降低头孢噻肟钠抑菌能力的现象可能由于二者对PBP3的竞争性结合引起。

讨论

临床上多药联合应用情况较为普遍,主要涉及三种情形:① 药物共同使用,指两种或两种以上药物同时使用,包括不同给药方式、药物种类、剂型等;② 药物

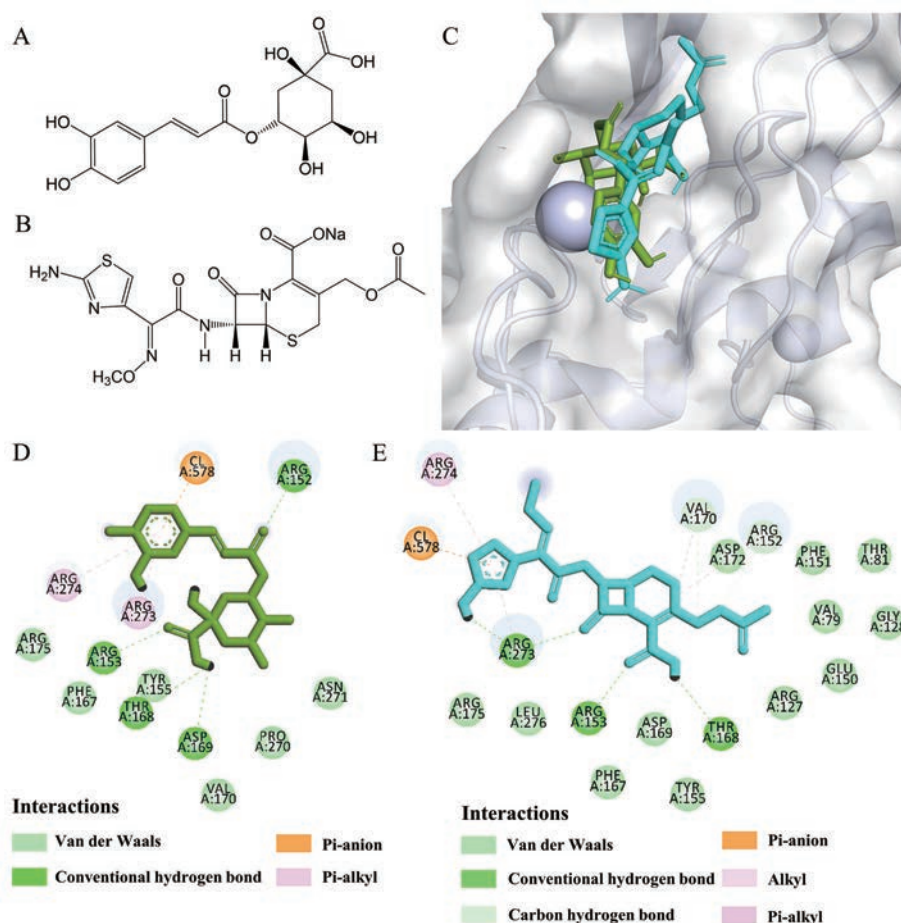


Figure 4 The molecular docking of CA or CS with penicillin binding protein 3 (PBP3, PDB code 3OC2). A: Molecular structure of CA; B: Molecular structure of CS; C: The 3D binding mode of CA and CS; D: The 2D show of interactions of CA; E: The 2D show of interactions of CS. Molecular docking experiments showed that CA and CS have similar binding sites, resulting in their spatially competitive binding with PBP3

“一前一后”使用,指先后分别使用两种或两种以上药物,特别是在前一种药物在体内未经完全代谢或排泄时使用后续药物;③基础用药+新用药物,指患者存在基础疾病、基础用药时,因疾病变化或突发新疾病而使用新的药物。第一种情形较为直接,目前临床上已少见;第二、三种情形临床上时有发生,且隐匿性强、潜在危害大。然而,目前尚缺乏体现临床用药特点的药物相互作用评价策略与技术手段。

本研究以绿原酸与头孢噻肟钠为案例,寄希望于构建研究药物分子之间相互作用的序贯分析策略及相应的关键技术。这是因为,临床传统观念认为,含绿原酸的清热解毒类中药注射剂如双黄连注射液、清开灵注射液,与头孢噻肟钠等抗菌药物联合应用时可以产生协同增效,减少抗菌药物使用强度或耐药产生。本研究建立的基于等温微量热技术、冷喷雾电离质谱技术和联合应用抑菌活性考察的序贯分析策略,从物理化学、化学结合到生物活性序贯地对药物分子间相

互作用进行评价。本研究提示含有绿原酸的中药注射剂与头孢噻肟钠间存在相互作用导致抑菌药效拮抗,存在产生耐药潜在风险。因此,建议避免二者在临床上的联合应用或应延长二者“一前一后”给药的时间间隔,以提高其临床联合用药水平。

上述研究结论得到了来自临床的印证。Li等^[3]、Zou等^[4]、Liu等^[5]、Zheng等^[6]报道,双黄连注射液与头孢噻肟钠联用时存在临床疗效降低和(或)出现不良反应的现象。与此同时,其他清热解毒类中药(如双黄连注射液、清开灵注射液等)含有与绿原酸结构相似(咖啡酰奎宁酸类成分)或具有抑菌作用的成分(黄芩苷等)^[16,17];与头孢噻肟钠及同属第三代头孢菌素酰胺型头孢烯类氨噻肟型包括头孢曲松钠、头孢他啶和头孢唑肟钠等,均为临床常用抗菌药物。因此,本研究所构建的药物分子之间相互作用的序贯分析策略及相应的关键技术具有一定的潜在拓展价值。

值得一提的是,本研究仅是一种有益的分析策略

与关键技术探索;这是因为药物相互作用涉及的内容较多,包括药物剂量范围、配比范围、给药频次、药动学、药效学 and 安全性等诸多方面,构建关联临床特点的高通量序贯研判体系及关键技术是切实的突破口。随着多学科交叉技术的深度融合,借助临床大数据、药物相互作用公共资源、药物共性结构特征与关键作用靶点信息,融入机器学习、迁移学习等人工智能技术,构建基于临床真实世界数据和虚拟计算融合策略的未知药物相互作用智能决策系统,将是未来值得关注的重点发展方向。

作者贡献: 刘爽负责实验研究、数据分析和文章撰写;王真真、谢以清、李江玲在实验研究中协助实验;龙江兰和王爱婷负责文章修改工作;马强和鄢丹负责实验指导和文章修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Wang HY, Liu F, Sun ZL, et al. Synergistic antibacterial effect and mechanism of Helveticin-M combined with chlorogenic acid on *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* [J]. Food Sci (食品科学), 2020, 41: 68-74.
- [2] Fan R, Yi GJ, Lu L, et al. Antimicrobial activities of chlorogenic acid and 13 main metabolites *in vitro* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 6239-6245.
- [3] Li S, Dou HC, Wang Y. One case report of acute renal failure [J]. China Pract Med (中国实用医药), 2008, 3: 209.
- [4] Zou XL. Compatibility of penicillin G sodium, cefotaxime sodium and shuanghuanglian powder injection [J]. Contemp Med Symp (当代医药论丛), 2012, 10: 647.
- [5] Liu HY, Xiao XT, Zhang QY. One case report of hemolytic anemia caused by multiple cephalosporins [J]. Chin J Pharmacoepidemiol (药物流行病学杂志), 2006, 15: 120-121.
- [6] Zheng SX, Cui WC. Three cases of fever in children were treated [J]. Chin Med Mod Distance Educ of China (中国中医药现代远程教育), 2008, 6: 1056-1057.
- [7] Yan D, Chen LH, Feng X, et al. Characterization of interaction in qingkailing injection with clinic administration based on isothermal titration calorimetry [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 2217-2221.
- [8] Chen HS, Yang YQ, Zhang H, et al. Meridian tropism of *Scutellaria baicalensis* based on molecular thermodynamic characteristics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 330-334.
- [9] Li T, Wang PL, Guo WB, et al. Natural berberine-based Chinese herb medicine assembled nanostructures with modified antibacterial application [J]. ACS Nano, 2019, 13: 6770-6781.
- [10] Tian XH, Wang PL, Li T, et al. Self-assembled natural phytochemicals for synergistically antibacterial application from the enlightenment of traditional Chinese medicine combination [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 1784-1795.
- [11] Wang ZZ, Liu S, Li JL, et al. Exploration on rationality evaluation approach of drug combination medication based on sequential analysis and machine learning [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 2356-2362.
- [12] Wang Y, Wang QM, Feng W, et al. Antibacterial activity and mechanism of moxifloxacin nanoparticles against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2460-2465.
- [13] Li W, Wang ZJ, Liu XJ, et al. Based on weak bond chemistry, the interaction mechanism between glycyrrhiza protein and berberine in water decocting process of *Rhizoma Coptidis* and *Liquorice* was investigated [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2119-2126.
- [14] Wang SY, Sun FZ, Sun YF, et al. Triterpenoids from Galbanum of uygur medicine and their anticholinesterase activities [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 283-288.
- [15] Sutaria DS, Moya B, Green KB, et al. First penicillin-binding protein occupancy patterns of β -lactams and β -lactamase inhibitors in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62: 1-12.
- [16] Yun Y, Wang CZ, Du L, et al. Effect of baicalin on expression of TLR4 in RAW264.7 cells infected by ESBLs *Escherichia coli* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 1590-1594.
- [17] Wang CZ, Feng X, Zhang XL, et al. Inhibitory effect of baicalin on germ tube formation and adhesion of *Candida albicans* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2010, 35: 3216-3218.