

# 广藿香油治疗急性中耳炎模型豚鼠的实验探讨

唐正伟<sup>1,2</sup>, 彭成<sup>1,2\*</sup>, 王蓬勃<sup>3</sup>, 曹小玉<sup>1</sup>

(1. 成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137; 2. 成都中医药大学 药学院, 成都 611137; 3. 河南大学 第一附属医院, 郑州 475001)

**[摘要]** 目的:探讨广藿香油对急性中耳炎模型豚鼠的治疗作用。方法:采用倍比稀释法测定广藿香油对中耳炎常见致病菌(金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌、绿脓杆菌)的体外最小抑菌浓度(MICs);通过鼓膜穿刺法注射 $1.0 \text{ McF} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的耐加氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)于豚鼠一侧中耳腔内制作豚鼠急性中耳炎模型;造模成功后,将动物分为广藿香油高、中、低剂量组( $100, 50, 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),阳性药物组(万古霉素 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和氧氟沙星 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和模型组,分别滴耳给予各组动物相应药物,模型组给予等体积生理盐水,每日2次,每次 $0.04 \text{ mL}$ ,连续4 d。分别于第1,2,4,6,8次给药前用灭菌生理盐水清洗中耳腔,洗液稀释后行细菌培养并计数。于给药后第7天断头处死动物,取出中耳腔,HE染色,观察中耳黏膜炎性细胞浸润及分布情况。结果:体外实验证实广藿香油对金黄色葡萄球菌的MIC值为 $0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,对卡他莫拉菌的MIC值为 $0.026 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,但对绿脓杆菌无效;与模型组比较,广藿香油能明显减少急性中耳炎模型豚鼠中耳腔内细菌数量( $P < 0.05$ ),并降低其中耳黏膜中炎性细胞的浸润度。结论:广藿香油对急性中耳炎模型豚鼠有良好的治疗效果。

**[关键词]** 广藿香油;金黄色葡萄球菌;急性中耳炎

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0144-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180144

**Effect of Pogostemonis Herba Oil in Treating Acute Otitis Media Model Guinea Pigs** TANG Zheng-wei<sup>1,2</sup>, PENG Cheng<sup>1,2\*</sup>, WANG Peng-bo<sup>3</sup>, CAO Xiao-yu<sup>1</sup> (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources; Key Laboratory of Standardization of Traditional Chinese Medicinal Materials under Ministry of Education, Chengdu 611137, China; 2. College of Pharmacology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. The First Affiliated Hospital of Henan University, Zhengzhou 475001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the curative effect of Pogostemonis Herba oil in guinea pigs in the acute otitis media model. **Method:** Doubling dilution was used to determine the MICs (minimum inhibitory concentration) of Pogostemonis Herba oil against common pathogens in otitis media (*Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis* and *Pseudomonas aeruginosa*). The acute otitis media model was established by puncturing tympanic membrane and injecting methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) at  $1.0 \text{ McF} \cdot \text{mL}^{-1}$  into the middle ear. After the successful modeling, the guinea pigs were divided into six groups: Pogostemonis Herba high, middle and low dose groups ( $100, 50, 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), positive groups (Vancomycin  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and Ofloxacin  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and the model group. All of them were dropped with corresponding drugs through ears. The model group was given isopyknic normal saline,  $0.04 \text{ mL}$  a time, 2 times a day, for consecutively days. Their middle ear cavities were cleaned with sterilized saline water before the first, second, fourth, sixth, eighth administration. The cleaning liquors were diluted and used for counting bacterial colonies. At the seventh day after the administration, the guinea pigs were beheaded to collect middle ear cavities for HE staining and observe the inflammatory cell

**[收稿日期]** 20141029(007)

**[基金项目]** 四川省重点支撑计划项目(2012JY0114)

**[第一作者]** 唐正伟,在读博士,从事中药药效及毒理学研究,E-mail:346830654@qq.com

**[通讯作者]** \*彭成,博士,博士生导师,从事中药药效及毒理学研究,E-mail:pengchengsichuan@126.com

infiltration and distribution on middle ear mucosa. **Result:** Pogostemonis Herba showed a MIC value of  $0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  against *S. aureus* and  $0.026 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  against *M. catarrhalis*, but with no effect against *P. aeruginosa*. Compared with the model group, Pogostemonis Herba oil can significantly reduce the bacteria number in middle ears of guinea pigs in the acute otitis media model ( $P < 0.05$ ) and the inflammatory cell infiltration at the middle ear mucosa. **Conclusion:** Pogostemonis Herba oil has a good efficacy in treating guinea pigs in the acute otitis media model.

[**Key words**] Pogostemonis Herba oil; *Staphylococcus aureus*; acute otitis media

急性中耳炎(acute otitis media, AOM)是儿童期发病仅次于上呼吸道感染的最常见的感染疾病,频繁的中耳感染仍然是目前临床治疗的棘手难题,不仅会引起患儿鼓室硬化、黏连性中耳炎以及中耳胆脂瘤,从而导致患儿听力下降,甚至会影响到语言的发育等<sup>[1]</sup>。目前临床上主要采取两种方式治疗中耳炎:①单用抗病原微生物类药物,如氯霉素、链霉素、氧氟沙星滴耳液等;②针对炎症症状采用抗生素+类固醇激素类药物合用,如:氯霉素可的松液等。但临床效果并不理想,且较长时间使用时会产生耐药性(如氧氟沙星),甚至有的药物还对耳蜗和前庭产生毒性(如新霉素、庆大霉素等),使中耳炎的治疗颇为棘手。

广藿香油,又名百秋李油,是常用中药广藿香的主要药用成分,是名优中成药-藿胆丸的主要药效成分。祖国医学认为,藿胆丸具有芳香化浊,清热通窍之功效,临床上主要用于鼻炎,鼻窦炎等感染性疾病的治疗,疗效显著<sup>[2]</sup>。现代药理学研究揭示其主要药效成分为广藿香油,不仅能抗菌、抗病毒,还具有抗炎、镇痛、增强免疫等药理作用<sup>[3-5]</sup>。在民间及一些古籍偏方中,有用广藿香油治疗中耳炎的记载,但临床上尚未有相关报道。故本研究旨在从动物实验方面对广藿香油治疗中耳炎进行研究,为广藿香油的临床运用提供理论基础。

## 1 材料

**1.1 动物及菌株** 正常健康豚鼠,SPF级,雌雄各半,体重( $200 \pm 20$ )g,由四川大学医学动物实验中心提供。金黄色葡萄球菌(美国临床实验室菌种保藏中心,批号 ATCC25923),耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA,美国临床实验室菌种保藏中心,批号 ATCC43300),金黄色葡萄球菌和卡他莫拉菌临床分离株(2011年8月至2012年4月分离于四川省妇幼保健院)。实验前将各菌株接种于LB固体培养基,37℃培养24h后,挑选单个菌落接种于TSB液体培养基中,37℃培养18~24h,备用。

**1.2 药物及试剂** 广藿香油及广藿香,购自于广东省湛江,经成都中医药大学药学院鉴定教研室李敏

老师鉴定为唇形科植物广藿香 *Pogostemon cablin* 的干燥地上部分。切段后用水蒸气蒸馏法提取广藿香油,相对密度为0.9985,经GC-MS测得百秋李醇含量为42.1%。临用时用0.5%聚山梨酯-80配制成供试药物,用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后备用。注射用盐酸万古霉素(日本 Seishin Laboratories 公司,批号 WM21371),氧氟沙星滴耳液(上海运佳黄浦制药,批号 11121831),临用时用灭菌生理盐水配制成阳性药物;Mueller-Hinton agar(美国 Oxoid 公司,批号 729683),营养琼脂培养基(杭州微生物试剂有限公司,批号 20100831-02),氯化钠(天津市大茂化学试剂厂,批号 20080328),MILLEX-GP 过滤装置(0.22 μm,德国 Merck Millipore 有限公司,批号 PR03692),一次性无菌培养皿(90 mm,江苏康健生物有限公司,批号 20131025),Mcfarland Standard(法国 BioMerièux 公司,批号 821772701)。

**1.3 仪器** EJ-II型耳鼻喉科检耳镜(上海跃进医疗器械有限公司),MLS-3780型实验室用高压灭菌器(日本 SANYO 公司),MOC-15A型CO<sub>2</sub>培养箱(日本 SANYO 公司),SNY-40型节能净化工作台(成都新光非兰特净化工程有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 广藿香油体外抑菌活性测定

**2.1.1 含药培养基的制备** 采用二倍稀释法将供试药物用灭菌的0.5%聚山梨醇-80稀释成10个浓度梯度,取1 mL药液加入14 mL MHA固体培养基,阴性对照组以1 mL溶剂代替,混匀,静置,晾干,即成含药培养基。

**2.1.2 最低抑菌浓度的测定** 将培养至对数生长期的细菌用灭菌生理盐水稀释成 $1.5 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>,使用多点接种仪接种于含药培养基上,待表面菌液晾干,将平板倒置于37℃培养箱内培养18~24h后观察统计结果。以无细菌生长平板内药物的最小浓度为此药对该菌株的最低抑菌浓度(MIC)。

### 2.2 急性中耳炎模型豚鼠的建立

**2.2.1 菌液制备** 将培养至对数生长期的 MRSA

用灭菌生理盐水稀释至  $1.0 \text{ MCF} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 备用。

**2.2.2 造模方法** 正常健康豚鼠 80 只, 洁净环境下, 另一名实验人员用双手固定豚鼠, 使之不能随意摆动。在耳内窥镜帮助下用注射器针头于豚鼠一侧鼓膜前下象限穿刺并注入 0.1 mL 菌液, 2 日后取中耳腔分泌物接种于 LB 固体培养基上,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养, 24 h 后观察结果, 若为阳性则视为造模成功, 若为阴性则剔除<sup>[6]</sup>。

**2.3 分组及给药** 将造模成功的动物分为 6 组, 每组 12 只, 即: 广藿香油高剂量组  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 广藿香油中剂量组  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 广藿香油低剂量组  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 万古霉素组  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 氧氟沙星滴耳液组  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 模型组。即日开始滴耳给药, 每次 0.04 mL, 每日 2 次, 连续 4 d, 模型组给以等体积的生理盐水, 每次给药前用棉签拭净脓液后方可滴药。

**2.4 菌落计数** 分别于第 1, 2, 4, 6, 8 次给药前先用乙醇消毒清洁外耳道后, 用少量灭菌生理盐水清洗中耳腔, 并收集清洗液, 稀释后均匀涂布于琼脂平板上,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养 24 h, 对 MRSA 计数<sup>[7]</sup>。

**2.5 病理切片及观察** 给药后第 7 天, 将豚鼠断头处死, 迅速取出听泡, 打开圆窗膜和前庭窗, 在耳蜗蜗顶尖打开一小孔, 用玻璃吸管由蜗顶小孔灌注新鲜配制 4% 多聚甲醛, 经过冷藏, 固定, 脱钙, 漂洗, 包埋, 冰冻, 切片, HE 染色, 在光镜下观察中耳腔黏膜炎性细胞 (主要是中性粒细胞) 浸润及分布情况。

**2.6 炎性细胞计数** 随机读取 5 个高倍镜 ( $\times 1000$ ) 下单一视野内炎性细胞的数量, 取其平均值为该动物的炎性细胞数目。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件对各组数据进行数据统计, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析进行组间数据的显著性检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 广藿香油体外 MIC 测定** 广藿香油对金黄色葡萄球菌标准株和临床分离株均有较强的抗菌活性, 对标准菌株 ATCC25923, MRSA 和临床分离株的 MICs 均为  $0.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 对卡他莫拉菌临床分离株的 MICs 为  $0.026 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。阳性药物氧氟沙星和万古霉素对这些细菌均有极强的抗菌活性, 其中氧氟沙星对金黄色葡萄球菌的 MIC 值为  $0.20 \sim 0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 对卡他莫拉菌 MIC 值为  $0.01 \sim 0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 对绿脓杆菌 MIC 值为  $0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。万古霉素对金黄色葡萄球菌的 MIC 值为  $0.33 \sim 0.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 对卡他莫拉菌的 MIC 值为  $1.3 \sim 2.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。然而, 万古霉

素和广藿香油对绿脓杆菌无效。见表 1。

表 1 广藿香油体外最低抑菌浓度 MICs 的测定

Table 1 MICs of patchouli essential oil on Bacterial

受试菌株	MICs/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			菌对照
	氧氟沙星	万古霉素	广藿香油	
MRSA	0.20	0.33	210.63	+
ATCC25923	0.20	0.33	210.63	+
J20	0.39	0.65	210.63	+
J5	0.39	0.33	210.63	+
J8	0.20	0.65	210.63	+
J3	0.20	0.33	210.63	+
J14	0.78	0.65	210.63	+
J16	0.20	0.33	210.63	+
J4	0.20	0.33	210.63	+
K6	0.78	1.30	26.33	+
K3	0.01	2.60	26.33	+
K9	0.05	1.30	26.33	+
L1	0.78	ND	ND	+
L2	0.78	ND	ND	+

注: “+”表示空白组细菌生长良好, 为阳性; “ND”表示未检出活性。“J”为金黄色葡萄球菌的缩写; “K”为卡他莫拉菌的缩写; “L”为绿脓杆菌的缩写。

**3.2 模型动物中耳腔分泌物培养** 80 只豚鼠实验耳的中耳分泌物培养结果均为阳性, 菌落密集, 量多; 鼓膜周围充血明显, 有明显分泌物, 炎症症状明显, 模型十分成功, 造模成功率 100%。

**3.3 对 MRSA 致中耳炎模型豚鼠中耳腔内 MRSA 含量的影响** 给药后, 各给药组菌落数明显下降, 疗效明显。给药 1 次后, 阳性药物氧氟沙星和万古霉素组就分别从  $5253 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4874 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  降至  $214 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $381 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与模型组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其余各给药组虽有所降低, 但与模型组比较没有统计学意义; 广藿香油高剂量组随着给药时间的延长, 菌落数目急速下降, 给药 3 次后已从  $5642 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  降至  $168 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与模型组比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 给药 5 次后, 广藿香油中、低剂量组分别降低至  $116 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $195 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与模型组比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。且广藿香油各剂量组之间呈现出明显的量效关系。见表 2。

表 2 广藿香油对 MRSA 致中耳炎模型豚鼠中耳腔内 MRSA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effects of patchouli essential oil on contents of MRSA in acute otitis media model's middle ear cavity ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /mg·d <sup>-1</sup>	菌落数/×10 <sup>3</sup> CFU·mL <sup>-1</sup>				
		给药前	给药 1 次	给药 3 次	给药 5 次	给药 7 次
模型	-	5 042.50 ± 262.54	4 000.00 ± 200.61	3 812.50 ± 229.53	2 123.75 ± 80.86	3 428.75 ± 430.52
广藿香油	8	5 642.50 ± 573.39	1 205.83 ± 174.91	167.58 ± 22.21 <sup>1)</sup>	62.44 ± 6.17 <sup>1)</sup>	35.48 ± 5.90 <sup>1)</sup>
	4	4 657.50 ± 418.03	1 922.50 ± 186.92	534.08 ± 61.05	116.45 ± 15.83 <sup>1)</sup>	40.02 ± 4.83 <sup>1)</sup>
	2	9 940.00 ± 833.39	3 583.64 ± 387.46	1 191.45 ± 166.03	194.65 ± 23.23 <sup>1)</sup>	26.79 ± 2.02 <sup>1)</sup>
氧氟沙星	0.4	5 253.64 ± 573.07	213.90 ± 18.74 <sup>1)</sup>	37.09 ± 3.48 <sup>1)</sup>	51.64 ± 7.85 <sup>1)</sup>	9.27 ± 1.21 <sup>1)</sup>
万古霉素	8	4 874.17 ± 387.15	380.83 ± 30.60 <sup>1)</sup>	113.01 ± 17.88 <sup>1)</sup>	33.72 ± 4.17 <sup>1)</sup>	20.11 ± 2.64 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.4 对豚鼠中耳黏膜炎性细胞浸润的影响** 模型组炎性细胞浸润严重,量多,表明模型十分成功;与模型组比较广藿香油组与阳性药物组炎性细胞显著减少,疗效显著,且广藿香油高、中、低剂量组呈现明显的量效关系。见图 1。广藿香油对模型豚鼠进行治疗后,中耳黏膜所含炎性细胞数量明显减少( $P < 0.01$ ),且呈现出量效关系。广藿香油高、中、低剂量组在高倍显微镜下一个视野内炎性细胞计数结果分别是 15.08, 21.25, 22.50 个。同时,广藿香油高剂量组与阳性药物组(氧氟沙星和万古霉素)比较没有统计学差异,且高剂量组对炎性细胞影响更大,可能是由其抗炎作用引起。见表 3。

表 3 广藿香油对豚鼠中耳黏膜炎性细胞计数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

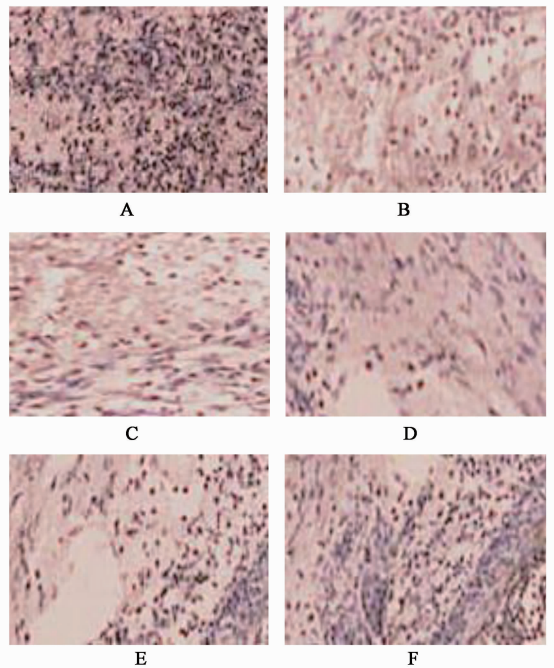
Table 3 Effects of patchouli essential oil on inflammatory cell count of middle ear mucosa in guinea pigs ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·d <sup>-1</sup>	炎性细胞计数/个
模型	-	35.83 ± 2.29
广藿香油	8	15.08 ± 1.08 <sup>1)</sup>
	4	18.83 ± 2.04 <sup>1,2,3)</sup>
	2	22.50 ± 1.57 <sup>1,2,3)</sup>
氧氟沙星	8	16.25 ± 0.87 <sup>1)</sup>
万古霉素	0.4	16.17 ± 0.83 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与氧氟沙星组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与万古霉素组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

文献中用于制备中耳炎模型的动物主要有:栗鼠、沙鼠、小鼠、大鼠、豚鼠甚至猴等<sup>[8-9]</sup>,其中应用最多的是栗鼠。因为栗鼠中耳听泡向骨性外耳道后方突起,使得听泡容积及中耳腔面积明显增加,有利于中耳标本的采集,且听泡上方骨质薄弱,特别适合于经皮穿刺造孔注药,而不需要手术暴露听泡,此外,它还具有中耳炎自然易感率低、病死率低等优



A. 模型组; B. 万古霉素组; C. 氧氟沙星组; D. 广藿香油高剂量组; E. 广藿香油中剂量组; F. 广藿香油低剂量组

图 1 广藿香油对豚鼠中耳黏膜炎性细胞浸润的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effects of patchouli essential oil on inflammatory cell infiltration of middle ear mucosa in guinea pigs (HE, ×400)

点<sup>[10]</sup>。但是,其来源有限,价格昂贵,不利于大规模实验。豚鼠耳壳大,耳道宽,耳蜗和血管延伸至中耳腔,便于进行手术操作内耳微循环观察,且耳蜗管对声波敏感,亦是良好的中耳炎模型载体<sup>[11]</sup>;且来源广泛,品种多,价格相对低廉,能满足实验研究需求,因此,笔者选择豚鼠作为造模对象。本研究发现,豚鼠造模,操作简单方便,鼓膜清晰可见,模型成功率高,且易于观察统计。

由表 2 可以看到,各药物组给药后细菌数目急剧下降,但当细菌数量降低至一定程度后,持续给药,但细菌数量变化不明显,说明细菌产生了耐药。

原因可能有二:一是细菌本身对药物耐受,对药物不如以前敏感,从而导致细菌数量不降;二是细菌在中耳腔内形成了生物被膜,阻碍药物作用,并保护细菌,从而使药物的作用显著降低,细菌数量不降。而广藿香油是否能抑制细菌在机体内形成生物被膜或消除已经形成的生物被膜还待进一步研究。

广藿香油滴耳给药能显著降低中耳黏膜内炎性细胞数量,减缓其炎性症状,对中耳炎治疗有积极的作用,且其对金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌有良好的抑制效果,是中耳炎治疗药物组中不可缺少的一类组成部分。然而,体外实验证实广藿香油对绿脓杆菌基本无效,故不能单独用于中耳炎的治疗,必须和其他抗绿脓杆菌的药物共同作用,以期达到良好的效果。综上所述,广藿香油对急性中耳炎有良好的治疗作用。

[参考文献]

[1] Rovers M M, Schilder A G, Zielhuis G A, et al. Ttitis media[J]. Lancet, 2004, 363(9407):465-473.  
[2] 张淑娟,严军虎. 藿胆丸治疗慢性鼻窦炎 120 例临床观察[J]. 吉林医学, 2014, 35(27):6012-6013.  
[3] Wu X L, Ju D H, Chen J, et al. Immunologic mechanism of Patchouli alcohol anti-H1N1 influenza virus may through regulation of the RLH signal pathway *in vitro*[J]. Curr Microbiol, 2013, 67(4):431-436.  
[4] Jeong J B, Shin Y K, Lee S H. Anti-inflammatory

activity of Patchouli alcohol in RAW264.7 and HT-29 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 55:229-233.

[5] Li Y C, Peng S Z, Chen H M, et al. Oral administration of Patchouli alcohol isolated from *Pogostemonts herba* augments protection against influenza viral infection in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(1):294-301.  
[6] Hoa M, Syamal M, Sachdeva L, et al. Demonstration of nasopharyngeal and middle ear mucosal biofilms in an animal model of acute otitis media[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2009, 118(4):292-298.  
[7] 王蓬勃,彭成,唐正伟,等. 广藿香油对小鼠白色念珠菌阴道炎治疗作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(3):592-594.  
[8] Apicella M A. Bacterial otitis media, the chinchilla middle ear, and biofilms[J]. J Infect Dis, 2009, 199(6):774-775.  
[9] Tonnaer E L, Sanders E A, Curfs J H. Bacterial otitis media: a new non-invasive rat mode [J]. Vaccine, 2003, 21(31):4539-4544.  
[10] Von Unge M, Decraemer W F, Buytaert J N, et al. Evaluation of a model for studies on sequelae after acute otitis media in the mongolian gerbil [J]. Acta Otolaryngol, 2009, 129(3):261-267.  
[11] 彭成. 中医药动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:38.

[责任编辑 周冰冰]