

4 种中药复方对大肠杆菌、沙门氏菌 R 质粒的消除作用

舒 刚, 马 驰, 黄 春, 黄 玲, 钟青卿, 林居纯*

(四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 为研究不同中药复方对大肠杆菌、沙门氏菌 2 种临床耐药菌株 R 质粒的消除作用, 以三黄汤等 4 种中药复方水煎剂为质粒消除剂, 以临床分离的多重耐药大肠杆菌及沙门氏菌为靶细菌, 采用肉汤二倍稀释法和影印培养法进行质粒消除试验。结果显示, 4 种中药复方对 2 种临床耐药菌 R 质粒均有消除作用(消除率 0.7%~9.3%), 不同中药复方耐药性消除子均丢失 2~3 个质粒条带(2 000~21 000 bp), 并丢失耐药表型。表明 4 种中药复方对耐药大肠杆菌和沙门氏菌 R 质粒均有消除作用。

关键词: 中药复方; 大肠杆菌; 沙门氏菌; R 质粒; 消除

中图分类号: S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)11-0149-05

The R Plasmid Curing Effects of Four Different Traditional Chinese Medical Compounds to *Escherichia coli* and *Salmonella*

SHU Gang, MA Chi, HUANG Chun, HUANG Ling, ZHONG Qing-qing, LIN Ju-chun*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: To study the plasmid curing in *Escherichia coli* and *Salmonella* by different traditional Chinese medical (TCM) compounds, the R plasmid curing experiment was performed using 4 different Chinese medical decoctions. The multi-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates were used as target bacteria. The influence on R plasmid curing was observed by broth doubling dilution and replica plating method. The results showed that the 4 decoctions exhibited resistance curing effects against *Escherichia coli* and *Salmonella*, the curing rates ranging from 0.7%—9.3% and 2 or 3 plasmids, 2 000—21 000 bp-long, were lost in different curing strains. The missing patterns of R plasmid occurred as the disappearance of different resistant phenotypes. This indicates that the 4 different Chinese medical compounds have R plasmid curing effects against *Escherichia coli* and *Salmonella*.

Key words: traditional Chinese medical compound; *Escherichia coli*; *Salmonella*; R plasmid; curing

细菌多重耐药性研究表明^[1-2], R 质粒在菌群间相互传播是导致多重耐药菌株广泛流行的重要机制, 由质粒介导的耐药性能伴随耐药质粒的消除而逆转。如果能有效地清除耐药质粒, 细菌可恢复对抗生素的敏感性, 细菌性感染将会得到有效控制^[3]。研究发现^[4-5], SDS、嵌合染料、高温、高热等理化作

用可以消除耐药质粒, 但因其有较强的毒副作用而不能应用于临床。近年来, 从天然药物中寻找质粒消除剂成为研究热点, 鞠洪涛等^[6]用中草药提取物消除了大肠杆菌耐药性及耐药质粒; 关玛丽等^[7]证实, 姜仁对大肠杆菌耐药性质粒有消除作用。大量研究^[8-9]表明, 中药具有消除耐药质粒的作用, 多以

收稿日期: 2013-06-12

基金项目: 四川优势产业发展急需紧缺专业博士后项目与教育厅科研项目(20100301); 四川农业大学双支计划项目(201303)

作者简介: 舒 刚(1978-), 男, 重庆铜梁人, 讲师, 硕士, 主要从事中药药理学研究。E-mail: cnds@qq.com

* 通讯作者: 林居纯(1968-), 女, 四川隆昌人, 副教授, 博士, 主要从事细菌耐药性研究。E-mail: juchunlin@126.com

清热类中药为主。目前,关于中药复方对细菌耐药质粒的消除研究较少。本研究选取大黄汤等中药复方为质粒消除剂,探讨其对大肠杆菌和沙门氏菌耐药 R 质粒的消除作用,为中药复方逆转细菌耐药性研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 多重耐药菌株大肠杆菌(E)和沙门氏菌(S)由四川农业大学动物医学院药学系实验室保存提供。

1.1.2 药品及试剂 黄芩、黄连、黄柏、大黄、栀子、甘草等中药购于雅安市惠民堂中药房,经四川农业大学药学系实验室鉴定后使用;氨苄西林(AMP)、阿莫西林(AMO)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、头孢曲松(CRO)、链霉素(STR)、庆大霉素(GEN)、四环素(TET)、强力霉素(DOX)、氟苯尼考(FLO)、氧氟沙星(OFL)、恩诺沙星(ENR)、磺胺异噁唑(SIA)、复方新诺明(SXT)由中国农业大学药理学实验室提供;十二烷基磺酸钠(SDS)购于成都科龙化工试剂厂;MH 肉汤、LB 肉汤及 LB 琼脂购于杭州微生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 中药复方制备 三黄汤:大黄 9 g,黄芩 6 g,甘草 3 g,栀子 27 枚;泻心汤:大黄 10 g,黄连、黄芩各 5 g;黄连解毒汤:黄连 9 g,黄芩 6 g,黄柏 6 g,栀子 9 g;黄芩汤:黄芩 9 g,甘草(炙)6 g,芍药 6 g,大枣 12 枚。按配方称取各味中药,用水煎煮 2 次后,合并过滤,滤液分别使用 70%、80%的乙醇进行沉淀,回收乙醇,得到含生药材 1 g/mL 的药液,置 4 °C 冰箱保存备用^[7]。

1.2.2 质粒消除试验 采用肉汤二倍稀释法倍比稀释药液,分别测定 4 种中药复方对培养 12 h 的大肠杆菌及 24 h 的沙门氏菌的亚抑菌浓度^[10]。分别取其亚抑菌浓度肉汤涂布于 LB 平板,每组分别挑

取 1 000 个菌落,按影印培养法依次转接于含 AMP (20 μg/mL)、TET(20 μg/mL)及不含药的 LB 平板上,于 37 °C 培养 24 h,同时以含 SDS(100 mg/L)有菌 LB 肉汤为阳性对照、不含药物有菌肉汤为空白对照。选择在 LB 琼脂平板上生长而在药物平板上不生长的菌落为耐药性消除子,计算耐药性消除率^[11],耐药性消除率=耐药性消除菌落数/被检测菌落总数×100%。

1.2.3 碱裂解法及电泳观察菌株消除前后质粒的变化 将消除子与原菌液参照文献^[12]改进的碱裂解法进行快速质粒 DNA 抽提,然后进行琼脂糖凝胶电泳,检测质粒带的消失情况。

1.2.4 耐药消除子药敏试验 采用肉汤二倍稀释法进行质粒消除前后菌株药敏试验,观察其耐药表型变化^[13]。

1.2.5 消除子稳定性试验 随机选取质粒消除子在 LB 平板上划线传代 30 次,每间隔 10 代测定其对抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),检测消除子稳定性。

2 结果与分析

2.1 中药复方对 2 种细菌的耐药性消除作用

由表 1 可见,大肠杆菌菌株本身不能自发丢失耐药性,黄芩汤对该菌株的耐药性消除率极显著低于 SDS($P<0.01$),黄连解毒汤消除率最高,极显著高于 SDS($P<0.01$),泻心汤、三黄汤消除率与 SDS 差异不显著($P>0.05$),但显著低于黄连解毒汤($P<0.05$),黄芩汤效果较差,极显著低于其他组($P<0.01$)。沙门氏菌菌株未能自发丢失耐药性,中药复方处理后, TET 耐药性易于被消除。各中药复方对其均有不同程度的消除作用,消除率均极显著高于 SDS 对照组($P<0.01$),具有较强的消除效果,但黄连解毒汤效果极显著低于三黄汤和泻心汤($P<0.01$),而与黄芩汤差异不显著($P>0.05$)。

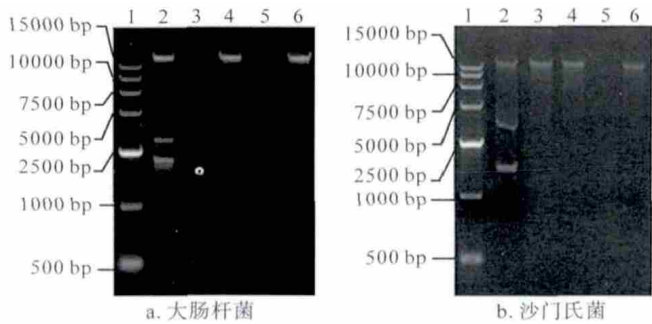
表 1 4 种中药复方对大肠杆菌、沙门氏菌的耐药性消除作用

药物	质量浓度/(mg/mL)		消除耐药性的菌落数/个						总消除率/%	
	E	S	AMP		TET		AMP+TET		E	S
			E	S	E	S	E	S		
三黄汤	125	62.5	9	14	26	61	2	18	3.7±0.54bAB	9.3±1.08aA
泻心汤	125	62.5	6	8	29	58	8	22	4.3±0.33bAB	8.8±1.11aA
黄连解毒汤	125	62.5	15	2	38	42	11	3	6.4±0.54aA	4.7±0.21bB
黄芩汤	62.5	31.25	0	13	7	40	0	7	0.7±0.11cC	6.0±0.33bAB
SDS	0.1	0.1	5	7	23	15	0	0	2.8±0.21bB	2.2±0.32cC
阴性对照组	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 质粒消除前后质粒图谱变化

由图 1 可知,大肠杆菌具有 3 个质粒条带,大小依次为 2 300、3 200、21 000 bp,经不同消除剂作用后,消除子均表现 2~3 个质粒条带的丢失,丢失的质粒条带范围为 2 300~21 000 bp;沙门氏菌具有大小依次约为 2 000、4 000、21 000 bp 的 3 个质粒条带,经不同消除剂作用后,消除子均表现 2~3 个质粒条带的丢失,丢失的质粒条带范围为 2 000~21 000 bp。



1. Marker DL15000; 2. 菌株; 3—6. 菌株消除子
图 1 大肠杆菌、沙门氏菌 R 质粒消除前后质粒图谱

2.3 质粒消除前后菌株的耐药表型变化

2.3.1 大肠杆菌 由表 2 可以看出,在对 13 种常用抗菌药物耐药情况监测中,大肠杆菌对其中的 12 种药物耐药,其耐药谱为 AMP/AMO/AMC/STR/GEN/TET/DOX/FLO/OFL/ENR/SIA/SXT,其耐药性消除前后的 MIC 发生显著变化。AMP 耐药表型丢失的消除子,均不同程度恢复其对 13 种抗菌药物

的敏感性,由 12 种耐药表型变为 2 种,耐药谱为 TET/FLO;TET 耐药表型丢失的消除子,恢复了对药物的敏感性,由 12 种耐药表型变为 10 种,耐药谱为 AMP/AMO/AMC/STR/GEN/FLO/OFL/ENR/SIA/SXT;AMP、TET 2 种耐药表型同时丢失的消除子,对所选的 13 种抗菌药物的 MIC 均呈现出减小趋势,由 12 种耐药表型变为 1 种,耐药谱为 FLO,且对耐药性的消除程度优于单一耐药表型丢失的菌株。

2.3.2 沙门氏菌 由表 3 可以看出,在对 13 种常用抗菌药物耐药情况监测中,沙门氏菌对 12 种抗菌药物高度耐药,其耐药谱为 AMP/AMO/AMC/STR/GEN/TET/DOX/FLO/OFL/ENR/SIA/SXT。经消除剂作用后,消除子的 MIC 发生显著变化。AMP 耐药表型丢失的消除子,对 β -内酰胺类、氨基糖苷类药物及氯霉素类药物的 MIC 均降低(MIC 1~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$),由 12 种耐药表型变为 6 种,其耐药谱为 TET/DOX/OFL/ENR/SIA/SXT;TET 耐药表型丢失的消除子,恢复了对药物的敏感性,由 12 种耐药表型变为 10 种,耐药谱为 AMP/AMO/AMC/STR/GEN/FLO/OFL/ENR/SIA/SXT;AMP、TET 2 种耐药表型同时丢失的消除子,对所选的 13 种抗菌药物的 MIC 值均减小,由 12 种耐药表型变为 1 种,耐药谱为 ENR,且对耐药性的消除程度优于单一耐药表型丢失的菌株。

表 2 大肠杆菌耐药性消除前后的耐药表型变化

药物	原始菌株		AMP 消除后		TET 消除后		AMP+TET 消除后	
	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	敏感性	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	敏感性	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	敏感性	MIC/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	敏感性
AMP	>128	R	<1	S	>128	R	<1	S
AMO	>128	R	2	S	>128	R	2	S
AMC	>128	R	8	S	>128	R	4	S
CRO	2	S	<0.5	S	2	S	<0.5	S
STR	>128	R	8	I	>128	R	8	I
GEN	64	R	2	S	64	R	4	S
TET	64	R	32	R	2	S	<1	S
DOX	32	R	4	S	2	S	<1	S
FLO	16	R	8	R	16	R	8	R
OFL	128	R	<0.25	S	32	R	<0.25	S
ENR	>32	R	<0.25	S	32	R	<0.25	S
SIA	>512	R	256	S	>512	R	256	S
SXT	>512	R	32	S	512	R	32	S

注:S 表示敏感;I 表示中度敏感;R 表示耐药,下同。

表 3 沙门氏菌耐药性消除前后的耐药表型变化

药物	原始菌株		AMP 消除后		TET 消除后		AMP+TET 消除后	
	MIC/($\mu\text{g/mL}$)	敏感性	MIC/($\mu\text{g/mL}$)	敏感性	MIC/($\mu\text{g/mL}$)	敏感性	MIC/($\mu\text{g/mL}$)	敏感性
AMP	>128	R	<1	S	>128	R	<1	S
AMO	>128	R	<1	S	>128	R	<1	S
AMC	>128	R	2	S	>128	R	2	S
CRO	8	S	4	S	8	S	4	S
STR	>128	R	16	S	>128	R	16	S
GEN	32	R	<1	S	16	R	<1	S
TET	32	R	32	R	<1	S	<1	S
DOX	>128	R	>128	R	2	S	2	S
FLO	>128	R	8	I	>128	R	8	I
OFL	32	R	32	R	32	R	4	I
ENR	>32	R	32	R	>32	R	4	R
SIA	>512	R	>512	R	>512	R	128	S
SXT	>512	R	>512	R	>512	R	2	S

2.4 不同菌株耐药消除的稳定性测试结果

在无抗菌药物的选择性压力作用下,大肠杆菌、沙门氏菌的耐药性消除子分别经过 10 次、20 次、30 次传代后,耐药性消除子的 MIC 无显著变化,表明丢失耐药质粒后的消除子对抗菌药物的敏感性保持稳定。

3 讨论

近年来,国内学者常依据中药抑菌效果选择中药消除剂,已有研究^[14-17]探讨了中药对大肠杆菌、痢疾杆菌、铜绿假单胞菌、志贺氏菌等耐药质粒的消除作用。本研究结果表明,4 种中药复方对大肠杆菌和沙门氏菌耐药性均有消除作用,三黄汤等 4 种中药复方在相同作用时间,其质粒消除率要高于千里光^[11]、苍术^[18]对大肠杆菌、白头翁对铜绿假单胞菌^[19]及鱼腥草对沙门氏菌耐药质粒的消除作用^[20],但低于薄荷精油对大肠杆菌^[21]及大高良姜单体对伤寒沙门氏菌、大肠杆菌、粪肠球菌耐药质粒的消除作用^[22]。这表明不同药物对不同细菌耐药质粒消除作用存在较大差异。

菌株消除前后耐药表型表明,受试菌在消除前呈多重耐药性的状态,耐药谱为 AMP/AMO/STR/GEN/TET/DOX/FLO/OFL/ENR/SIZ/SXT,经中药复方消除作用后,其多重耐药性得到改善。可见,经不同中药复方消除作用后,大肠杆菌和沙门氏菌均表现为多重耐药性的丢失,能恢复对兽医临床常

用抗菌药物的敏感性。消除前后菌株质粒图谱显示,受试菌经中药作用后形成的消除子均丢失 2~3 个质粒条带,表明受试菌的耐药性与质粒基因的表达有关,在中药复方作用下 R 质粒可被消除,同时也说明了黄连解毒汤、三黄汤等具有消除细菌耐药性的临床使用价值。

中药的应用要以中医辨证论治作理论指导,并结合中药四性、五味,通过合理配伍组方筛选耐药性抑制剂,从而协同增效,取得更好的效果。用中药复方进行质粒消除,将成为今后研究中药对 R 质粒消除作用的一个重要方向。

参考文献:

- [1] Bennett P M. Plasmid encoded antibiotic resistance; acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria[J]. British Journal of Pharmacology, 2008, 153 (1): 347-357.
- [2] 肖方,李新生,张素梅,等. 质粒介导的喹诺酮类耐药基因在鸡源大肠杆菌中的流行[J]. 华北农学报, 2010, 25 (1): 222-225.
- [3] Denap J C, Thomas J R, Musk D J, *et al.* Combating drug-resistant bacteria: small molecule mimics of plasmid incompatibility as antiplasmid compounds [J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126 (47): 15402-15404.
- [4] 阳艳林,刘雅红,薛国聪. 大肠埃希菌耐药质粒消除剂研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(1): 89-92.
- [5] 徐秀华,李顺强. 不动杆菌感染及耐药性的研究[J]. 华

- 中医学杂志,2000,24(3):116-118.
- [6] 鞠洪涛,韩文瑜,王世若,等. 大肠杆菌耐药基因定位及耐药质粒消除[J]. 中国兽医学报,2000,20(6):561.
- [7] 关玛丽,林滢,李泽芬,等. 中药菱仁对大肠杆菌(HB101/PBR322)质粒的消除作用简报[J]. 中国人兽共患病杂志,1995,11(1):25.
- [8] Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils [J]. Fitoterapia, 2006,77(4):279-285.
- [9] 杨明炜,陆付耳,徐丽军,等. 紫花地丁对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药质粒的消除作用[J]. 中西医结合研究,2009,1(1):27-28.
- [10] 黄金珠,雍刚,廖菁,等. 土茯苓加减方对淋病奈瑟菌耐药质粒的消除作用[J]. 实用医院临床杂志,2010,7(6):35-37.
- [11] 张文平,曹锦禄,张文书. 千里光水浸液对大肠埃希菌 R 质粒的消除作用[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):2929-2930.
- [12] 赵春燕,龚云伟,易世红,等. 金黄色葡萄球菌耐药性质粒提取方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(2):147-148.
- [13] 卢亚君,程宁. 3 种中药方剂逆转大肠杆菌耐药性的实验观察[J]. 西北药学杂志,2007,22(6):309-311.
- [14] 陈群,王胜春. 黄芩和黄连对大肠埃希菌 R 质粒消除作用的实验研究[J]. 广东医学院学报,1998,16(1/2):1-3.
- [15] 陈群,关显智,朱毓兰. 止痢灵在去污染小鼠体内不同时间对痢疾杆菌 F13 株 R 质粒消除作用的影响[J]. 广东医学院学报,1994,12(3):196-198.
- [16] 于军,于红,肖洋,等. 射干提取液对铜绿假单胞菌 PA11 株 R 质粒体内外消除作用[J]. 吉林大学学报:医学版,2003,29(2):170-171.
- [17] 陈世彪. 3 种中药对产 β -内酰胺酶金黄色葡萄球菌 R 质粒的消除作用[J]. 畜牧与兽医,2010(1):81-83.
- [18] 王兴旺,胡勇,宋伟舟,等. 苍术对鸡大肠杆菌耐药质粒消除作用的研究[J]. 重庆工学院学报,2006,20(2):123-124.
- [19] 苗强,肖洋,何中勤. 白头翁提取液对铜绿假单胞菌 R 质粒的消除作用[J]. 中药新药与临床药理,2006,17(4):258-259.
- [20] 牛艺儒,刘雁军,宋燕. 鱼腥草对仔猪副伤寒沙门氏菌耐药质粒消除作用的研究[J]. 饲料广角,2010(15):37-38.
- [21] Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils [J]. Fitoterapia, 2006,77(4):279-285.
- [22] Latha C, Shriram V D, Jahagirdar S S, et al. Antiplasmid activity of 1'-acetoxychavicol acetate from *Alpinia galanga* against multi-drug resistant bacteria [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 123 (3): 522-525.