

黄连对大肠杆菌 R 质粒消除作用的实验研究*

陈 群 陈南菊 王胜春

内容提要 本研究以中药黄连的提取物为质粒消除剂, 用携带 R 质粒的多重耐药性大肠杆菌 E. 102 株为靶细菌, 进行了体外 R 质粒消除作用的实验研究。同时观察了黄连作用不同时间, 对大肠杆菌 R 质粒消除作用的影响。实验结果表明: 黄连具有消除 R 质粒的作用。经黄连作用 24 h, 消除率为 2.42%, 延长作用时间至 48 h, 其消除率提高为 22.57%。细菌丢失的耐药性可以表现为单一或两种耐药性的丧失。

关键词 黄连 大肠杆菌 R 质粒 消除

Experimental Study of R Plasmid Eliminating Action of *Coptis Chinensis* on E. Coli CHEN Qun, CHEN Nan-ju, WANG Sheng-chun *Department of Microbiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang (524023)*

The R plasmid curing experiment was performed in vitro with E.coli strain E. 102 bearing R plasmid as target bacteria and *Coptis chinensis* as elimination agent. The influence of different time on R plasmid elimination was also observed. Results showed that when the acting time was 24 hours, the cure rate of R plasmid was 2.42% and when the acting time increased to 48 hours, the cure rate elevated to 22.57%. The Missing patterns of R plasmid might be occurred in disappearance of either multiple or single resistance.

Key words *Coptis chinensis*, E.coli, R plasmid, elimination

近年来, 由多重耐药性大肠杆菌引起的婴幼儿腹泻不断增多。这些细菌常常携带耐药性质粒(R 质粒), 在抗生素选择性压力下, R 质粒很容易在肠道细菌间传递^[1]。使耐药性菌株越来越多, 给临床治疗增加了困难。80 年代以来, 有些学者发现一些广谱抗菌药物如黄连素和氟喹诺酮类药物对某些细菌携带的 R 质粒具有消除作用^[2]。黄连在中药中属于清热解毒类药, 常用于治疗腹泻和细菌性痢疾。但对致腹泻的大肠杆菌的 R 质粒是否有消除作用? 本研究以中药黄连为质粒消除剂, 以多重耐药的大肠杆菌 E. 102 株为靶细菌, 研究了黄连对大肠杆菌 R 质粒的消除作用, 现将结果报告如下。

材料和方法

1 菌株 致婴儿腹泻大肠杆菌 E. 102 株, 为我室保存菌株。已知对四环素(TC)、链霉素(SM), 氨苄青霉素(AP)耐药。其耐药性均由质粒介导。

2 培养基 (1)营养琼脂及 S. S 琼脂: 上海医学化验所产品。(2)LB 培养基: 含牛肉膏 5 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L 及酵母浸膏 5 g/L, 煮沸, 滤过即为液体培养基。

3 药物 (1)抗生素: 四环素由上海第八制药厂生产; 链霉素由上海第四制药厂生产; 氨苄青霉素由石家庄市第二制药厂生产。(2)黄连(*Coptis chinensis*)产地四川, 经多次蒸馏提取的水溶性粉剂。主要成分为小檗碱(Berberine)含量为 7.69%和黄连生物碱 1%, 由吉林省中医中药研究院药物研究室提供。

4 实验方法 将大肠杆菌 E. 102 株接种于 LB 培养基中, 37°C 过夜培养, 再经 4 h 活化后调菌浓度为 9×10^8 /ml, 取 5 μ l 分别加入含不同浓度黄连的 LB 肉汤中。LB 肉汤管中黄连浓度自 76.8 mg/ml 始依次二倍稀释至第 7 管。第 8 管不加黄连, 只加 E. 102 株作为对照。每管液体培养基总量 1 ml。37°C 震荡培养 48 h 后取出, 观察细菌生长现象, 并判定黄连的亚抑菌浓度(1.2 mg/ml)。从亚抑菌浓度管中取 50 μ l 菌液, 分别划种于 10~12 块 S. S 琼脂平板

*本课题由广东省高教厅资助

广东医学院微生物学教研室(广东湛江 524023)

培养基上。37℃ 培养 24 h, 待长出单个菌落后, 分别挑取 500~1000 个菌落, 影印培养法, 依次转接于含 TC(20 μg/ml)、SM(40 μg/ml)或 AP(20 μg/ml)的药物平板上以及不含药物的普通平板培养基上。37℃ 培养 24~48 h, 观察并记录结果。对照组中, 细菌不经黄连作用, 其他同上。

5 消除子的筛选与鉴定 选择在含抗生素的选择平板上不生长, 而在不含抗生素的普通平板上生长的菌落, 再经用抗生素选择平板复试, 即为 R 质粒消除子。将此消除子再于另外两种抗生素药物平板上测试, 以确定其 R 质粒的消除范围。

搜集各种消除子, 经 Kado 法⁽³⁾快速抽提质粒 DNA, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 以检测质粒带的消失情况。

结 果

1 黄连对大肠杆菌 E. 102 株 R 质粒的消除作用 见表 1。黄连(1.20 mg/ml)对大肠杆菌的 R 质粒具有消除作用, 作用 24 h 其消除率为 2.42%, 延长作用时间至 48 h, 消除率达到 22.57%。经卡方检验, 两个时间的差异有显著性意义($P < 0.01$)。

表 1 黄连作用不同时间对 R 质粒消除的影响

组别	作用时间(h)	挑选菌落(个)	R 质粒消除(菌落数(%))			
			TC	SM	AP	合计
黄连	24	700	13(1.86)	0	4(0.57)	17(2.42)
	48	700	129(18.43)	4(0.57)	25(3.57)	158(22.57)
对照	24	700	0	0	0	0
	48	700	2(0.28)	0	0	2(0.28)

从黄连对大肠杆菌 R 质粒的消除表型来看, 经黄连作用 24 h, 消除的 17 个菌落, 均表现为单一耐药性的丢失, 而经黄连作用 48 h, 多数菌落表现为单一耐药性的丢失, 少数菌株表现为两种耐药性的丢失, 结果见表 2。

表 2 黄连作用不同时间消除 R 质粒表型

组别	24 h 消除 R 质粒表型			48 h 消除 R 质粒表型				
	TC	SM	AP	TC	SM	AP	TC+SM	TC+AP
黄连	13	0	4	123	3	20	1	5
对照	0	0	0	2	0	0	0	0

注: 表中数据为消除菌落个数

2 消除子的质粒抽提, 琼脂糖凝胶电泳结果 原菌株 E.102 株大肠杆菌染色体及 3 条质粒带清晰可

见, 而消除子都缺少了相应的质粒带。证明细菌耐药性的丢失是由于编码此种耐药性的质粒受黄连的作用而消除。

讨 论

关于质粒消除, 以往所使用的消除剂多属诱变剂。随着 R 质粒的传播造成耐药菌株的不断增多, 许多抗生素全然失效。于是, 人们开始试图寻找在体内能够安全使用的药物作为 R 质粒的消除剂, 使抗生素能够重新发挥其杀菌威力。本实验应用中药黄连的提取物作为消除剂, 对致婴儿腹泻的大肠杆菌 E. 102 株的 R 质粒进行了消除作用的研究, 结果表明: 黄连对大肠杆菌 R 质粒具有消除作用。随着黄连处理时间延长至 48 h, 其消除率可明显提高至 22.57%。我们的实验结果与文献^(4, 5)报告的黄连素、黄芩对痢疾杆菌的 R 质粒消除率略高。这可能与所用细菌和其携带的质粒的不同有关。从 R 质粒的消除表型来看, 经黄连作用后, 大多数菌株表现为单一耐药性的丢失, 少数菌株则表现为对 TC 和 SM 或 TC 和 AP 二重耐药性的丢失。虽然本实验证明了中药黄连对大肠杆菌的 R 质粒有消除作用, 但其对 R 质粒的消除机制, 还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

1. Mitsuhashi S. Drug resistance plasmids. Molecular and Cellular Biochemistry 1979; 26: 135-138.
2. Habn FE, Ciak J, Berberine, et al. Antibiotics: Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg. 1975: 557-567.
3. Kado and Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bact 1980; 145(3): 1365-1373.
4. 徐建国. 黄连素、利福平对福氏 II a 痢疾菌 R 因子的作用. 中华微生物学和免疫学杂志 1983; 3(6): 387-390.
5. 陈 群. 痢疾杆菌 R 质粒体外消除实验研究. 中华流行病学杂志 1993; 14(特 16): 167-169.

(收稿: 1995-07-12 修回: 1995-09-28)