

千里光消除大肠埃希菌 R 质粒的实验研究

沈红仙

桐庐县第一人民医院中药房, 浙江 桐庐 311500

[摘要] 目的: 评价千里光消除大肠埃希菌 R 质粒的效果。方法: 对从本院尿路感染患者尿液中分离出的大肠埃希菌 R 质粒进行检测, 随机选取 60 只小鼠, 采用随机数字表法分为 2 组, 对照组采取空白对照, 小鼠经口感染大肠埃希菌, 实验组小鼠经口感染大肠埃希菌后口服千里光浓缩液, 观察并比较从 2 组小鼠大肠分离出的大肠埃希菌对抗生素的耐药性情况, 与大肠埃希菌 R 质粒消除率。结果: 实验组在含有四环素、氨苄青霉素、链霉素的药物平板上的消除大肠埃希菌 R 质粒菌落数均多于对照组 ($P < 0.05$)。实验组大肠埃希菌 R 质粒消除率高于对照组 ($P < 0.01$)。结论: 中药千里光在消除大肠埃希菌 R 质粒方面具有良好的效果, 在含有四环素、链霉素、氨苄青霉素的抗生素药物平板上仍可有效清除大肠埃希菌 R 质粒, 安全、有效。

[关键词] 大肠埃希菌; R 质粒; 尿路感染; 千里光; 动物实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 05-0276-02

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.05.130

大肠埃希菌是医院感染的主要致病菌群之一^[1]。过去临床上通常采用高温培养、紫外线照射和溴化乙锭消除大肠埃希菌 R 质粒, 但是大量临床资料显示这些方法存在毒副作用, 对机体伤害较大^[2]。近几年来, 临床学者不断寻求更加安全、有效的方法消除大肠埃希菌 R 质粒。中药具有纯天然、无刺激的优点, 适合临床应用于消除大肠埃希菌 R 质粒^[3]。为进一步评价中药消除大肠埃希菌 R 质粒的临床效果, 笔者对尿路感染患者尿液中分离出的大肠埃希菌 R 质粒进行检测, 对其进行分析后报道如下。

1 材料

1.1 菌株 所选取的菌株为大肠埃希菌, 均从本院尿路感染患者的尿液中分离所得, 并经鉴定确定为大肠埃希菌。

1.2 实验动物 60 只清洁级 ICR 健康小鼠, 均由本院动物实验中心提供, 常规实验室饲养, 自然昼夜, 实验均于白天进行。雌性小鼠 30 只, 雄性小鼠 30 只, 6~8 周龄, 体重 18~20 g。采用随机数字表法将小鼠分成实验组和对照组各 30 只。实验组雌性小鼠 15 只, 雄性小鼠 15 只; 6~8 周龄, 平均(7.31±2.38)周; 体重 18~20 g, 平均(19.02±6.12)g。对照组雌性小鼠 15 只, 雄性小鼠 15 只; 6~8 周龄, 平均(7.45±2.29)周; 体重 18~20 g, 平均(18.98±6.54)g。2 组实验动物一般资料比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

1.3 药材 千里光购于桐庐县某药房, 培养基以及四环素、链霉素和氨苄青霉素均属于国产的标准品。

2 实验方法

2.1 对照组 空白对照, 小鼠经口感染大肠埃希菌, 每天给予 2 mL 生理盐水后不采取任何措施。

2.2 实验组 采用中药消除大肠埃希菌 R 质粒, 具体方法如下: 对小鼠进行灌肠, 以达到肠道清洁的目的, 经口感染大肠埃希菌, 然后给予中药溶液。取干燥千里光 50 g, 用适量水煮沸后过滤, 将过滤药渣再用适量水煮沸, 过滤, 将 2 次千里光滤液合并后, 浓缩为 50 mL 浸液, 储存备用。每只小鼠每天给予 2 mL 中药溶液, 连续给药 3 天。

3 观察指标与统计学方法

3.1 观察指标 3 天后处死小鼠, 分离培养细菌, 计算消除大肠埃希菌 R 质粒的数量, 通过抽提琼脂糖凝胶电泳进行测算。挑选在无药平板上生长的菌落, 而在有药平板上不生长的菌落, 即初步确定为 R 质粒消除子。将消除子与原菌液同时快速抽离质粒 DNA, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 以监测 R 质粒带的消失情况。将小鼠大肠分离液接种于 10 块 4% 琼脂培养基上, 在 37℃ 培养 1 天, 直至琼脂板长出菌落, 挑选 1000 个菌落, 采用影印培养法, 依次转接到含有四环素、链霉素、氨苄青霉素的药物平板上, 在相同温度环境下继续培养 1 天, 观察并记录实验结果。比较 2 组大肠埃希菌对抗生素的耐药情况, 应用的抗生素主要有四环素、链霉素、氨苄青霉素, 比较四环素、链霉素、氨苄青霉素药物平板上消除大肠埃希菌 R 质粒的菌落数, 菌落数越少, 说明清除效果越好。

[收稿日期] 2015-01-15

[基金项目] 浙江省杭州市卫生发展基金项目 (hz2917223)

[作者简介] 沈红仙 (1971-), 女, 副主任中药师, 主要从事中医药的临床研究。

比较2组大肠埃希菌R质粒消除率,消除率=有药平板上不生长的菌落数/无药平板上生长的菌落数 $\times 100\%$ 。

3.2 统计学方法 采用SPSS17.0软件分析数据。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。

4 实验结果

4.1 2组消除大肠埃希菌R质粒菌落数情况 见表1。实验组在含有四环素、氨苄青霉素、链霉素的药物平板上的消除大肠埃希菌R质粒菌落数均多于对照组($P < 0.05$)。

表1 2组消除大肠埃希菌R质粒菌落数情况 个(%)

组别	挑选菌落数(个)	四环素	链霉素	氨苄青霉素
实验组	1000	15(1.50) ^①	8(0.80) ^①	6(0.60) ^①
对照组	1000	1(0.10)	0	0

与对照组比较,① $P < 0.05$

4.2 2组大肠埃希菌R质粒消除率比较 见表2。实验组大肠埃希菌R质粒消除率高于对照组($P < 0.01$)。

表2 2组大肠埃希菌R质粒消除率比较 个

组别	挑选菌落数	消除[个(%)]
实验组	1000	280(28.00) ^①
对照组	1000	1(0.10)

与对照组比较,① $P < 0.01$

5 讨论

大肠埃希菌俗称大肠杆菌,是哺乳动物大肠内的正常菌群之一,不仅能够合成维生素B和维生素K供机体利用,还能有效控制腐败菌、病原菌、真菌的过度繁殖,但是大肠埃希菌过度繁殖时会引起感染、急性肠炎等疾病^[4]。近几年来,这种由R质粒介导耐药性的严重性,在临床和流行病学上引起极大重视。抗生素的应用,促使携带R质粒的菌株出现与迅速播散。这种质粒介导的多重耐药性菌株不但治疗困难,亦难控制其流行,常常引起医院内感染的早发流行^[5]。大量临床资料显示,医院感染中R质粒的检出率高达50%以上,严重危及住院患者的健康^[6]。大肠埃希菌的耐药性主要由染色体或耐药质粒,即R质粒介导,随着大肠埃希菌R质粒的传播和耐药性的逐渐增强,大肠埃希菌对抗菌药物的敏感性明显降低,给临床治疗带来了很大的困难。

R质粒被消除后,细菌的耐药性也消失了。临床上所应用的部分抗生素对机体存在一定的毒副作用,不便于临床的广泛应用,长期使用,效果明显降低^[7]。因此在消除R质粒方面,医疗界一直在寻找安全、有效的措施。中医方法温和,毒副作用较少,对抗药物耐药性具有良好的应用价值^[8]。本研究选用的中药千里光,性寒、味苦,具有清热解毒、明目、止痒等功效,还具有抗菌作用,多用于治疗风热感冒、目赤肿痛、泄泻痢疾、皮肤湿疹疮疖。大量资料显示千里光消除大肠埃希菌R质粒具有良好的效果^[9],作用机制主要是该中药激发和增强了机体抵抗力和防御功能,消除肠道菌群耐药质粒,其中主要为

质粒R清除,提高菌群对药物的敏感性,降低菌群的耐药性^[10]。虽然千里光在消除大肠埃希菌R质粒的能力不如十二烷基硫酸钠,但是大量实验已经充分证明了千里光的有效性,为深入研究千里光抗耐药菌株的作用提供了强有力的支持。在检测大肠埃希菌R质粒清除率中,采用抽提琼脂糖凝胶电泳,该方法能够有效反映中药及其代谢产物的药理作用,避免中药直接体外用药的一些误差,能够使大肠埃希菌R质粒清除率更加准确,科学地反映千里光的效果^[11]。

本研究结果显示,千里光在消除大肠埃希菌R质粒方面具有良好的应用效果,在含有四环素、链霉素、氨苄青霉素的药物平板上仍可有效清除大肠埃希菌R质粒,安全、有效,可在临床上广泛应用。

[参考文献]

- [1] 李延鸿,朱怀军. 中药单方或复方对大肠埃希菌R质粒消除作用的研究[J]. 实用药物与临床, 2013, 16(12): 1147-1150.
- [2] 黄依玲,冯洁,杨秋燕. 抗大肠埃希菌的药物研究进展[J]. 广西医学, 2013, 35(10): 1394-1397.
- [3] 杨帆,杨玉荣,赵振升,等. 中草药消除细菌耐药性质粒研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(12): 160-164.
- [4] 何明,吴峥嵘,李渊,等. 双黄连、清开灵对耐药大肠埃希菌R质粒及 β -内酰胺酶的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(2): 105-108.
- [5] 杭永付,薛晓燕,方芸,等. 中药抗菌和逆转耐药作用机制研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(47): 4504-4507.
- [6] 舒刚,马驰,黄春,等. 4种中药复方对大肠杆菌、沙门氏菌R质粒的消除作用[J]. 河南农业科学, 2013, 42(11): 149-153.
- [7] 云云,汪长中. 中药抗耐药大肠埃希菌研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(2): 238-241.
- [8] 桂勇,黄俐华,胡小洋,等. 10种中药对产ESBLs大肠埃希菌的体外抑菌活性[J]. 中国现代医生, 2013, 51(31): 65-67.
- [9] 许伟,邵志伟,李小东,等. 黄芩等10种中药对大肠埃希菌的体外抑菌试验观察[J]. 安徽医药, 2013, 17(5): 846-848.
- [10] 李娟,李晓东,杨丽霞,等. 单味中药体外抑菌活性的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 283-286.
- [11] 李延鸿,张慧华. 痰热清逆转大肠埃希菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的研究[J]. 抗感染药学, 2013, 10(1): 40-42.

(责任编辑:刘淑婷,吴凌)