

黄连素等中草药提取物对多重耐药性大肠杆菌 $gyrA$ 基因的作用

黄衍强, 刘坤友, 莫小强, 黄小凤, 韦连登, 韦红玉, 陈源红, 唐华英

黄衍强, 莫小强, 黄小凤, 韦连登, 韦红玉, 陈源红, 唐华英, 右江民族医学院微生物学与免疫学教研室 广西壮族自治区百色市 533000

刘坤友, 柳江县人民医院检验科 广西壮族自治区柳州市柳江县 545100

黄衍强, 副教授, 主要从事病原生物致病性和耐药性的研究。

广西教育厅科研立项基金资助项目, No. 桂教科研[2008]27号
2013年校地校企共建创新平台基金资助项目, No. 桂教科研[2013]8号

作者贡献分布: 黄衍强与刘坤友对此论文的贡献均等, 负责课题的设计、数据分析、论文的撰写及研究资金的提供; 莫小强与黄小凤负责收集标本与抑菌实验; 韦连登与韦红玉负责耐药基因的检测; 陈源红与唐华英负责耐药菌的培养。

通讯作者: 刘坤友, 545100, 广西壮族自治区柳州市柳江县, 柳江县人民医院检验科. ljrylky@163.com

收稿日期: 2014-04-20 修回日期: 2013-05-31

接受日期: 2014-06-08 在线出版日期: 2014-06-18

Effect of berberine and other herbal extracts on $gyrA$ gene mutations in multidrug resistant *Escherichia coli*

Yan-Qiang Huang, Kun-You Liu, Xiao-Qiang Mo, Xiao-Feng Huang, Lian-Deng Wei, Hong-Yu Wei, Yuan-Hong Chen, Hua-Ying Tang

Yan-Qiang Huang, Xiao-Qiang Mo, Xiao-Feng Huang, Lian-Deng Wei, Hong-Yu Wei, Yuan-Hong Chen, Hua-Ying Tang, Department of Medical Microbiology and Immunology, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Kun-You Liu, Clinical Laboratory, Liuzhou River County People's Hospital, Liuzhou 545100, the Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: Research Foundation of Guangxi Department of Education, No. [2008]27; 2013 College and Enterprise Innovation Platform Construction Foundation, No. [2013]8

Correspondence to: Kun-You Liu, Clinical Laboratory, Liuzhou River County People's Hospital, Liuzhou 545100, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ljrylky@163.com

Received: 2014-04-20 Revised: 2014-05-31

Accepted: 2014-06-08 Published online: 2014-06-18

Abstract

AIM: To investigate if berberine and other herbal extracts have an effect on $gyrA$ gene mutations in multidrug resistant *Escherichia coli* (*E. coli*).

METHODS: The multidrug resistance of *E. coli* to ofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin was

determined by K-B method. Multidrug resistant *E. coli* was cultured in the presence of berberine or other herbal extracts and passaged once every 2 d for a total of 15 times. *E. coli* DNA was extracted to amplify the $gyrA$ gene by PCR, and $gyrA$ gene sequence was analyzed to check the mutation status before and after treatment.

RESULTS: The multidrug resistant *E. coli* had $gyrA$ gene mutations, mainly C-T mutation at nt83 and G-A mutation at nt87. After treatment with berberine or other herbal extracts for 30 d, no significant changes were found in the $gyrA$ gene mutations.

CONCLUSION: Multidrug resistant *E. coli* to quinolones carry $gyrA$ gene mutations, and berberine and other herbal extracts have no significant impact on these mutations.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Berberine; Multidrug resistance; *Escherichia coli*; $gyrA$ gene; Mutation

Huang YQ, Liu KY, Mo XQ, Huang XF, Wei LD, Wei HY, Chen YH, Tang HY. Effect of berberine and other herbal extracts on $gyrA$ gene mutations in multidrug resistant *Escherichia coli*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(17): 2445-2448 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2445.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i17.2445>

摘要

目的: 探索黄连素等中草药提取物对大肠杆菌耐药基因 $gyrA$ 的回复突变作用。

方法: 用纸片扩散法(K-B)法筛选多重耐药大肠杆菌。在含黄连素等中草药提取物的胁迫环境下培养多重耐药性大肠杆菌, 每2 d传代1次, 共传15次, 提取中药提取物作用前后的耐药性大肠杆菌DNA, PCR扩增 $gyrA$ 基因, 并检测基因序列, 对比前后突变情况。

结果: 对氧氟沙星、环丙沙星和诺氟沙星等

■背景资料

大肠杆菌大多数是正常菌群, 但条件致病菌和致病型的菌株可引起肠道内或肠道外的感染, 严重者可导致死亡, 并且非常容易产生耐药变异, 这给防治带来很大的困难, 因此必须探讨有效方法解决该困难。

■同行评议者

沈涛, 副教授, 云南省第一人民医院临床基础医学研究所

■研究前沿

随着抗生素的广泛使用,微生物耐药日益严重,如何解决微生物耐药问题,是目前微生物领域或药物领域的热点和难点之一。筛选中草药有效成份抑制耐药菌或逆转耐药是解决耐药问题的有效方法之一,但抗耐药的理想中草药及其作用机制有待研究。

耐药的多重耐药性大肠杆菌均出现*gyrA*基因突变,主要是第83和87位点分别出现C-T和G-A的突变;黄连素等中药提取物作用30 d后未发现基因回复突变。

结论:对喹诺酮类药物耐药的大肠杆菌有*gyrA*耐药基因突变,黄连素等中药提取物在30 d内尚未能威迫多重耐药性大肠杆菌*gyrA*耐药基因发生回复突变。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 黄连素; 多重耐药性; 大肠杆菌; *gyrA*基因; 回复突变

核心提示: 本文在含1/2最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration)中草药提取物的肉汤培养基中传代培养多重耐药性大肠杆菌,对比中药提取物作用前后的耐药性大肠杆菌*gyrA*基因突变情况,以期能发现黄连素等中草药提取物对耐药性大肠杆菌的分子作用机制。

黄衍强, 刘坤友, 莫小强, 黄小凤, 韦连登, 韦红玉, 陈源红, 唐华英. 黄连素等中草药提取物对多重耐药性大肠杆菌*gyrA*基因的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(17): 2445-2448 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2445.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i17.2445>

0 引言

大肠杆菌是常见的肠道杆菌,部分菌株可引起腹泻,甚至死亡,而且容易产生耐药性变异,近年来随着喹诺酮类药物的广泛使用,耐药率逐年升高,这对防治耐药性大肠杆菌带来很大的困难^[1-5].因此很多学者都努力寻找理想的防治方法,提高大肠杆菌感染性疾病的治愈率.我们前期研究发现一些中草药提取物对耐药性大肠杆菌有抑制作用,并能降低其他药物的最低抑菌浓度,因此筛选出对多重耐药性大肠杆菌有抑制作用的黄连素等中草药提取物,在小于最低抑菌浓度的环境中威迫耐药菌株生长,观察提取物对耐药基因的作用,探讨中草药提取物的抑菌作用机制.实验报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 于右江民族医学院附属医院腹泻患者分离获得菌株,经AUTOREADER快速细菌自动鉴定仪鉴定是大肠杆菌.标准大肠杆菌敏感菌株ATCC25922购自广东省微生物菌种保藏中心.环氧沙星(批号:120228)、氧氟沙星(批号:

120221)、诺氟沙星(批号:120325)、营养琼脂(批号:12099)、营养肉汤(批号:12099)、M-H培养基(批号:120326)购自杭州天和生物有限公司;97%黄连素(批号:120810)、98%苦参碱(批号:120908)、90%黄芩苷(批号:120908)、98%大黄素(批号:120908)购自陕西鼎盛生物科技有限公司;DNA试剂盒购自广州迪景生物科技有限公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,基因序列检测送上海博雅生物工程公司检测.

1.2 方法

1.2.1 药物敏感试验:采用纸片扩散法(K-B法)^[6],检测菌株耐药性.经K-B法检测出大肠杆菌的抑菌环直径,参照2012年CLSI临床微生物标准“对喹诺酮类药物抑菌环直径 ≥ 16 mm为敏感,抑菌环直径 ≤ 8 mm为耐药”,同时对3种或3种以上抗生素耐药的判断为多重耐药菌株,以此方法筛选出两株多重耐药性大肠杆菌,命名为菌株1和菌株2.

1.2.2 中草药提取物威迫多重耐药菌株生长获得新的菌株:经对倍稀释法检测大黄素、黄连素、苦参碱对耐药性大肠杆菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)分别是32、64、128 $\mu\text{g/mL}$ ^[7],在1/2MIC中草药提取物肉汤培养基中传代培养多重耐药性大肠杆菌菌株1和菌株2,每2 d传代1次,连续培养15次,获得两株新的菌株,即菌株3和菌株4.

1.2.3 提取DNA:分别提取中草药提取物作用前的菌株1、菌株2和作用后的菌株3、菌株4的DNA,提取方法参照说明书.

1.2.4 扩增*gyrA*:使用引物5'-CGATGTCGGT-CATTGTTG-3', 5'-ACTTCGTCAGGTTGTGC-3'.反应体系为50 μL , 10 \times PCR缓冲液5 μL , 2 mmol/L dNTP 5 μL , 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各1 μL , TaqDNA聚合酶0.4 μL , 25 mmol/L MgCl_2 3 μL , 无菌双蒸水补至50 μL .扩增条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min.扩增产物用1.7%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色检测.

1.2.5 *gyrA*基因突变分析:将PCR扩增*gyrA*基因产物送上海博雅生物工程公司检测碱基序列,确定基因突变.*gyrA*基因序列从核苷酸的160位点和438位点位置双向进行测序,所对应的氨基酸序列是54位点到146位点.

2 结果

2.1 多重耐药检测 经K-B法检测获得菌株1和菌

表 1 大肠杆菌药物敏感实验结果

菌株	抑菌环直径(mm)		
	氧氟沙星	环氧沙星	诺氟沙星
菌株1	5.5	4.6	6.5
菌株2	6.0	4.2	5.8
ATCC25922	22.5	24.0	23.0

对喹诺酮类药物抑菌环直径 ≥ 16 mm为敏感, 抑菌环直径 ≤ 8 mm为耐药。

表 2 黄连素作用前后耐药性大肠杆菌gyrA基因序列和敏感性大肠杆菌相同位置序列

菌株	大肠杆菌部分碱基序列									
	83					87				
氨基酸单字符	G	D	S	A	V	Y	D	T	I	
DNA序列数据库	GGT	GAC	TCG	GCG	GTC	TAT	GAC	ACG	ACT	
ATCC25922	GGT	GAC	TCG	GCG	GTC	TAT	GAC	ACG	ACT	
1	GGT	GAC	TTG	GCG	GTC	TAT	AAC	ACG	ACT	
2	GGT	GAC	TTG	GCG	GTC	TAT	AAC	ACG	ACT	
3	GGT	GAC	TTG	GCG	GTC	TAT	AAC	ACG	ACT	
4	GGT	GAC	TTG	GCG	GTC	TAT	AAC	ACG	ACT	

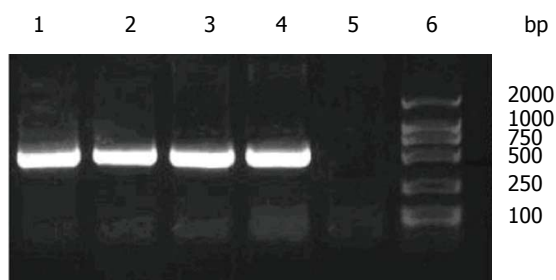


图 1 黄连素作用前后耐药性和敏感性大肠杆菌扩增的gyrA基因。1, 2: 实验室分离获得的中药诱导前的耐药菌株; 3, 4: 1和2用中药诱导后的耐药菌株; 5: 敏感菌株ATCC25922; 6: Marker。

株2, 均对氧氟沙星、环氧沙星、诺氟沙星均产生耐药性, 属于多重耐药菌株, 并以敏感菌株ATCC25922为对照, 确认敏感菌株(表1)。

2.2 gyrA基因PCR产物 对大黄素、黄连素、苦参碱等中草药提取物作用前后的4株多重耐药的大肠杆菌进行扩增, 均获得约500 bp的gyrA基因片段, 而敏感菌株ATCC25922未获得目的基因。黄连素作用前后耐药性和敏感性大肠杆菌gyrA基因扩增如图1, 大黄素、苦参碱作用前后扩增的目的基因结果与黄连素的相同。

2.3 gyrA基因测序 检测大黄素、黄连素、苦参碱等中草药提取物作用前后耐药性大肠杆菌gyrA基因序列, 均发现第83和87位点分别有C-T

和G-A的变化, 作用前后未发现有回复变化, 而标准敏感菌株ATCC25922无突变。黄连素作用前后耐药性和敏感性大肠杆菌gyrA基因序列变化如表2, 大黄素、苦参碱作用前后gyrA基因序列变化结果与黄连素的相同。

3 讨论

国内资料显示, 大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药率达50%-70%以上^[8,9], 如何解决大肠杆菌的耐药性问题已经刻不容缓。目前普遍认为大肠杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制主要是gyrA基因发生突变^[10-12]。gyrA基因是DNA回旋酶的A亚单位, 在DNA的复制过程中回旋酶结合到双链DNA环上造成缺口, 允许另一DNA环由此穿过, 然后连接DNA链, 再生DNA环。喹诺酮类药物主要是通过干扰DNA回旋酶阻止DNA环的重新连接, 抑制DNA的合成起作用从而起到抑菌作用。gyrA末端与喹诺酮耐药决定区域有关, 该区发生氨基酸的替代将影响喹诺酮类药物与酶结合, 使耐药性增加。本研究通过检测对喹诺酮类药物耐药的大肠杆菌, 同样发现有gyrA基因突变, 突变主要是第83、87两个位点分别出现C-T和G-A突变, 使丝氨酸和天冬氨酸分别变为亮氨酸和天冬酰胺。

大黄素、黄连素、苦参碱对耐药性大肠杆

■相关报道

郭美丽等在研究中已经阐明大肠杆菌对喹诺酮类药物的耐药主要是gyrA基因突变, 黄干荣等也证明大黄素等中药提取物对耐药性大肠杆菌有明显的抑制作用, 这启发了作者从逆转耐药基因突变角度考虑中草药的作用。

■同行评价

本文为探讨中草药对耐药菌的作用机制提供了参考,具有一定临床意义。

菌有抑制作用^[7,13-15],其作用原理是否与*gyrA*基因回复突变有关,这一直是我们关注的问题。我们通过在较低的中药提取物浓度下威迫耐药菌株生长,提取作用前和作用后的耐药性大肠杆菌,扩增*gyrA*基因并测序,比对各种中草药提取物作用前后耐药菌株的突变,未发现*gyrA*基因第83和87位点有回复突变。因此,研究结果表明黄连素、大黄素、苦参碱等中药提取物在30天内尚未能威迫多重耐药性大肠杆菌*gyrA*基因发生回复突变,初步判断黄连素、大黄素、苦参碱等对耐药性大肠杆菌抑制作用与*gyrA*基因回复突变无关,可能与耐药性大肠杆菌的生物膜被抑制或外排泵被调控有关,改变了细胞膜、细胞壁的通透性,这需要我们进一步探索。

4 参考文献

- 1 刘洋,任晓峰,吴金花,布日额,薛晓阳. 鹅大肠杆菌性腹泻的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21: 1-5
- 2 朱静,蒋伟,常东,于勇. 北京市某三甲医院病原菌结构及耐药性变迁. 国际检验医学杂志 2011; 32: 763-765
- 3 董懿珍. 我院2009-2010年抗菌药物使用与细菌耐药性分析. 中国药房 2012; 23: 905-907
- 4 张婴元,朱德妹,胡付品,吴淦,汪复. 1990-2004年上海地区临床分离大肠埃希菌耐药性变迁. 中华医学杂志 2006; 86: 12-16
- 5 李景云,马越,张力,胡昌勤,金少鸿. 临床52家医院常见分离菌株的药物敏感性监测. 中华检验医学杂志 2006; 29: 452-457
- 6 赵丽娟,黄衍强. 医学微生物学实验指导与考试指南. 广西科学技术出版社出版, 2008
- 7 黄干荣,李晓华,黄衍强,黄小凤,韦连登,韦红玉,陈源红,唐华英,杨珊,覃艳春. 大黄素等提取物对耐药性大肠杆菌生物膜形成的影响. 中成药杂志 2013; 35: 2602-2605
- 8 吕卫东. 260株大肠埃希菌的耐药分析. 中华医院感染学杂志 2011; 21: 568-569
- 9 Petersen A, Christensen JP, Kuhnert P, Bisgaard M, Olsen JE. Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* within an integrated broiler operation. *Vet Microbiol* 2006; 116: 120-128 [PMID: 16650662 DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.03.015]
- 10 郭美丽,潘孝勇,曾松芳. 大肠埃希菌中质粒介导喹诺酮类耐药基因的检测及其耐药性分析. 中华医院感染学杂志 2012; 22: 1765-1768
- 11 张昭勇,张吉才,杜毅. 尿道感染大肠埃希菌对喹诺酮耐药性及相关因素分析. 临床误诊误治 2013; 26: 90-93
- 12 梁海军,崔艳慧,杨道坤. 产ESBLs大肠埃希菌耐药性分析及*qnr*、*gyrA*、*parC*基因变异的检测. 中华医院感染学杂志 2011; 21: 1068-1071
- 13 常明向,章晶,陈科力. 黄连、赤芍及大黄对大肠杆菌内毒素释放的影响. 中成药 2007; 29: 752-753
- 14 胡文举,宋艳画,吴伶俐. 黄连素和黄芪多糖对鸡源大肠杆菌的体外联合抑菌作用. 中兽医学杂志 2013; 6: 8-10
- 15 沈先荣,李水军,蒋定文,贾福星,周菊珍,储智勇,祝晓辉,郑高利. 前摄宁颗粒对SD大鼠前列腺炎的抗炎作用. 中成药杂志 2008; 30: 808-812

编辑 田滢 电编 鲁亚静

