

大黄素等中药提取物对幽门螺杆菌克拉霉素耐药基因的作用

黄衍强, 黄小凤, 赵丽娟, 黄干荣, 韦连登, 韦红玉, 陈源红, 唐华英

黄衍强, 黄小凤, 赵丽娟, 黄干荣, 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

黄衍强, 副教授, 主要从事消化疾病防治的研究。

广西教育厅科研立项基金资助项目, No. 桂教科研[2010]10号
广西高校优秀人才资助计划基金资助项目, No. 桂教人[2011]40号

广西自然科学基金资助项目, No. 桂财教[2012]53号, 2012GXNSFAA053172

作者贡献分布: 黄衍强与赵丽娟对此文贡献均等, 负责课题的设计、数据分析、论文的撰写及研究资金的提供; 黄小凤与黄干荣负责收集标本和抑菌实验; 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: 赵丽娟, 533000, 广西百色市城东路98号, 右江民族医学院微生物学与免疫学教研室. zhaolijuanxk@163.com

收稿日期: 2013-10-27 修回日期: 2013-11-15

接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-28

Effects of emodin and other herbal extracts on resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin

Yan-Qiang Huang, Xiao-Feng Huang, Li-Juan Zhao, Gan-Rong Huang, Lian-Deng Wei, Hong-Yu Wei, Yuan-Hong Chen, Hua-Ying Tang

Yan-Qiang Huang, Xiao-Feng Huang, Li-Juan Zhao, Gan-Rong Huang, Lian-Deng Wei, Hong-Yu Wei, Yuan-Hong Chen and Hua-Ying Tang, Department of Medical Microbiology and Immunology, You Jiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: Guangxi Department of Education research project funded projects, No. Gui teaching and research [2010]10; Talents subsidy scheme funded projects in Guangxi university, No. Gui teach people [2011]40; Guangxi Natural Science Foundation, No. Gui fiscal teach [2012]53, 2012GXNSFAA053172

Correspondence to: Li-Juan Zhao, Department of Medical Microbiology and Immunology, You Jiang Medical College for Nationalities, 98 Chengxiang Road, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zhaolijuanxk@163.com

Received: 2013-10-27 Revised: 2013-11-15

Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-28

Abstract

AIM: To evaluate the effects of emodin and other herbal extracts on resistance of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) to clarithromycin, and to explore the

methods for effectively inhibiting *H. pylori* antibiotic resistance.

METHODS: The MIC of herbal extracts against clarithromycin resistance of *H. pylori* was detected by double dilution method. Clarithromycin resistant *H. pylori* was cultured in medium containing herbal extracts at a concentration of half MIC and passaged once every 5 d for 6 times. The MIC of clarithromycin against antibiotic resistance of *H. pylori* was assessed before and after stress culture. The DNA of *H. pylori* was extracted to detect drug resistant-related gene mutations.

RESULTS: The MIC of clarithromycin against *H. pylori* was reduced by herbal extracts. The gene mutations of 23s rRNA A2143G and A2144G were detected in clarithromycin-resistant *H. pylori*. No back mutations were discovered after treatment with herbal extracts for 30 d.

CONCLUSION: Herbal extracts have a synergistic effect in inhibiting the clarithromycin resistance of *H. pylori*. The synergistic action is not associated with the back mutations of 23s rRNA gene mutations related to clarithromycin resistance of *H. pylori*.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Herbal extracts; *Helicobacter pylori*; Drug resistance-related gene; Clarithromycin

Huang YQ, Huang XF, Zhao LJ, Huang GR, Wei LD, Wei HY, Chen YH, Tang HY. Effects of emodin and other herbal extracts on resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(6): 825-830 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/825.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i6.825>

摘要

目的: 了解大黄素等中药提取物对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)克拉霉素耐

■背景资料

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)耐药菌株的出现是导致治疗胃溃疡、胃炎等疾病失败的主要原因, 克拉霉素作为新一代大环内酯类药物使用, 目前也出现了一定的耐药性。研制新药拮抗耐药性菌株要耗费很多的人力、物力, 而且研制过程很长, 因此必须寻找有效方法解决耐药性问题。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■ 研发前沿

大黄素等中药成分在抗菌作用方面有很好的效果,但其作用机制,特别是分子作用机制尚未清楚,是否与耐药基因的回复突变有关未见报道。因此现在很多学者都从基因层面作研究,探讨中药逆转耐药性的分子机制。

药基因的作用,探索可以有效抑制耐药性*H. pylori*的方法。

方法:采用对倍稀释法检测大黄素等对克拉霉素耐药的*H. pylori*最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),在中草药提取物1/2MIC环境下胁迫培养耐药性*H. pylori*,5 d传代1次,续传6次;E-test药敏实验检测胁迫培养前后克拉霉素对耐药性*H. pylori*的MIC提取*H. pylori* DNA, DNA测序法检测耐药基因,对比前后突变。

结果:大黄素等中药提取物能降低克拉霉素对耐药*H. pylori*的MIC,对克拉霉素耐药的*H. pylori*均出现23s rRNA基因的A2143G、A2144G点突变;黄连素等中药提取物作用30 d后未发现基因有回复突变。

结论:大黄素等中药提取物对克拉霉素耐药的*H. pylori*有一定的协同抑制作用,协同作用与*H. pylori* 23s rRNA耐药基因回复突变无关。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 中药提取物; 幽门螺杆菌; 耐药基因; 克拉霉素

核心提示: 本文采用大黄素等中药提取物胁迫细菌生长的方法和分子生物学技术,观察大黄素等对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)克拉霉素耐药基因的回复突变作用,探讨逆转*H. pylori*耐药性方法。

黄衍强, 黄小凤, 赵丽娟, 黄干荣, 韦连登, 韦红玉, 陈源红, 唐华英. 大黄素等中药提取物对幽门螺杆菌克拉霉素耐药基因的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(6): 825-830 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/825.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i6.825>

0 引言

随着抗生素在根除幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)治疗中的广泛应用, *H. pylori*耐药株的发生率不断上升,而*H. pylori*耐药菌株的出现是导致治疗失败的主要原因。克拉霉素为新一代大环内酯类药物,对酸稳定,能溶解于低pH的胃液,口服生物利用度好,在胃黏膜中浓度高,不良反应小,单一用药的根除率为42%-54%,是目前已知抗生素中对*H. pylori*作用最强的药物之一。含克拉霉素的三联疗法与不含克拉霉素的三联疗法相比, *H. pylori*根除率可提高10%-20%,因而在抗*H. pylori*方案中将其作

为主要药物。但是目前*H. pylori*对克拉霉素已有一定的耐药率,尤其是初治失败后,克拉霉素的耐药率大幅度上升^[1]。因此,寻找有效的基因修复突变的方法或避免突变的方法,降低*H. pylori*对克拉霉素的耐药率,提高防治的效果,是很多学者正在研究的课题。我国的中草药资源丰富,中药在抗菌作用方面效果显著,这提示我们可以通过中草药来抑制耐药性*H. pylori*生长,但是很多中药的有效成分和作用机制却有待确定。本研究从中药提取物协助*H. pylori*耐药基因发生回复突变的角度探索提高菌株敏感性的方法,从而了解中药提取物的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 耐药性*H. pylori*由右江民族医学院病原学实验室分离、鉴定、保存,均经过AUTO-READER快速细菌自动鉴定仪鉴定。采用*H. pylori*敏感菌株J99由广东省微生物菌种保藏中心提供。98%大黄素(批号: 120908)、98%五味子(批号: 120908)、90%黄芩苷(批号: 120908)、97%黄连素(批号: 120810)购自陕西昂盛生物科技有限公司。克拉霉素E-test纸条购自瑞典AB-BIODISK公司,营养琼脂(批号: 12099)、营养肉汤(批号: 12099)、蛋白胨(批号: 120326)、哥伦比亚琼脂液(批号: 120848)均购自杭州天和微生物有限公司。SPX-150-Z型恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);低温冰箱(日本SANYO公司);SW-CJ-2FD型超净工作台(苏净集团安泰空气技术有限公司);电子天平(Sartorius公司, BP221S型);721紫外分光光度计(BIO-RAD);ZD-85振荡器培养箱(江苏金坛市环宇科学仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 制备对倍稀释的中药提取物哥伦比亚琼脂平板和肉汤液: 分别把98%大黄素、97%黄连素、98%五味子、90%黄芩苷与哥伦比亚琼脂液和肉汤液对倍稀释,把药物浓度分别调整为1、2、4、8、16、32、64、128、256 $\mu\text{g/mL}$,备用,同时用10 mg/mL泮托拉唑作为阳性对照,用纯培养液作为阴性对照。

1.2.2 检测中药提取物对耐药性*H. pylori*的MIC: 采用标准琼脂平板对倍稀释法检测MIC^[2]。将营养肉汤培养基过夜培养的*H. pylori*稀释至0.5麦氏单位(相当于 1.0×10^8 CFU/mL),用移液器接种约2 μL 菌液到已经制备好的含不同浓度药物的哥伦比亚琼脂平板上,每孔约 10^5 CFU, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 h后判断结果。以能完全抑制*H. pylori*生

表 1 中药提取物对克拉霉素耐药 *H. pylori* 的 MIC 浓度 (μg/mL)

药物种类	药物浓度								
	1	2	4	8	16	32	64	128	256
大黄素	R	R	R	R	I	I	S	S	S
黄连素	R	R	R	R	I	I	S	S	S
五味子	R	R	R	R	R	R	I	S	S
黄芩苷	R	R	R	R	R	R	R	S	S

R: 耐药; I: 中介敏感; S: 敏感.

表 2 中药提取物对 *H. pylori* 敏感菌株 J99 的 MIC 浓度 (μg/mL)

药物种类	药物浓度								
	1	2	4	8	16	32	64	128	256
大黄素	R	R	R	R	R	S	S	S	S
黄连素	R	R	R	R	R	S	S	S	S
五味子	R	R	R	R	R	R	S	S	S
黄芩苷	R	R	R	R	R	R	S	S	S

J99 菌株为敏感菌株; R: 耐药; I: 中介敏感; S: 敏感.

■ 相关报道

周汎等研究发现黄连等 10 种中药对金黄色葡萄球菌等细菌有比较强的体外抗菌活性; 姜晓峰等研究发现大黄素逆转抗药性的作用与抑制核苷转运、降低糖蛋白的功能和表达相关, 这提示大黄素等有可能逆转 *H. pylori* 的耐药性, 其机制可能与一些基因的表达有密切的关系.

长的药物最低浓度为 MIC. 敏感性判断按照 2012 CLIS 临床微生物标准. *H. pylori* 菌株 J99 作为敏感菌株对照.

1.2.3 中药提取物胁迫耐药性 *H. pylori* 生长: 哥伦比亚平板转耐药性 *H. pylori* 过夜, 分别挑单菌落于 10 mL 哥伦比亚培养基, 摇菌约 18-20 h, 将菌液稀释至 0.5 麦氏单位后取 2 μL 加到含 5 mL 1/2 MIC 中药提取物的哥伦比亚琼脂液体肉汤液中, 37 °C 振荡器培养 5 d 后传代 1 次, 连续传 6 次, 共 30 d.

1.2.4 克拉霉素药敏实验: 用上述方法调整菌液稀释至 0.5 麦氏单位后取 2 μL 均匀涂布于 *H. pylori* 培养基平板上放置 2-3 min, 待平板表面凉干后用无菌镊子贴上克拉霉素 E-test 纸条, 37 °C 培养 5 d. 克拉霉素 E-test 药敏实验结果判断: 读取 MIC, 敏感 ≤ 2.5 μg/mL, 耐药 ≥ 5 μg/mL.

1.2.5 克拉霉素耐药菌株耐药基因检测: (1) *H. pylori* DNA 提取: 试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司, 按照使用说明提取; (2) PCR 扩增: 根据文献 [2] 提供的含有 A2144G 和 A2143G 位点的基因设计并合成引物: 上游引物 5'-CCA CAG CGA TGT GGT CTCAG-3'; 下游引物: 5'-CTC CAT AAG AGC CAA AGCCC-3'. PCR 循环体系共 50 μL, 其中包括: ddH₂O 29.5 μL; 10×PCR Buffer 6.3 μL; dNTPs 25 mmol/L 5.0 μL; Taq 酶 (5 kU/L) 0.5 μL; 上游引物 (10 μmol/L) 3.7 μL; 下

游引物 (10 μmol/L) 3.7 μL; DNA sample 1.3 μL; 反应条件: 94.0 °C 预变性 4 min, 94.0 °C 变性 40 s, 61.5 °C 退火 1 min, 32 个循环, 72.0 °C 延伸 1 min 72 °C, 末端延伸 7 min. PCR 产物的检测: 扩增反应完毕后取 5 μL PCR 产物与 1 μL 的 6× 溴酚兰载样缓冲液混合, 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 电压 4 V/cm, 80 min, 用 100 bp DNA Ladder 作分子量标准. 电泳缓冲液微 1×TBE (Tris-硼酸 90 mmol/L, EDTA 2 mol/L). 电泳结束后在紫外灯下观察结果, 425 bp 左右有一条带者为含有 A2143G 或 A2144G 点的基因片段; (3) DNA 测序: 选取中药提取物作用前后克拉霉素耐药菌株的 PCR 产物, 由上海捷瑞工程有限公司纯化后测序. 采用 DNATool 6.0 分子生物学软件分析耐药菌株 23s rRNA 基因的核苷酸序列, 并与基因组数据库 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 *H. pylori* J99 株 (NC-000921) 23s rRNA 基因序列进行比较.

2 结果

2.1 中药提取物对耐药性 *H. pylori* 的 MIC 测定 大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷对克拉霉素耐药 *H. pylori* 的 MIC 分别是 64、64、128、128 μg/μL (表 1), 对 *H. pylori* 敏感菌株 J99 的 MIC 分别是 32、32、64、64 μg/μL (表 2), 对敏感菌株的抑

■创新盘点

本研究探讨大黄素等中药提取物对克拉霉素耐药的*H. pylori*的抑制作用,并从耐药基因回复突变角度探讨其逆转耐药的机制,发现大黄素等对耐药*H. pylori*有抑制作用,并能提高药物的敏感性,但其机制尚未发现与耐药基因回复突变有关。

表 3 中药提取物对耐药*H. pylori*作用前后克拉霉素的MIC($\mu\text{g/mL}$)

	大黄素	黄连素	五味子	黄芩苷	泮托拉唑	阴性对照
菌株被胁迫前	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
菌株被胁迫后	2.2	2.4	2.6	2.8	2.5	5.0

敏感对照菌株J99MIC < 2.5 $\mu\text{g/mL}$; 敏感 ≤ 2.5 $\mu\text{g/mL}$; 耐药 ≥ 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

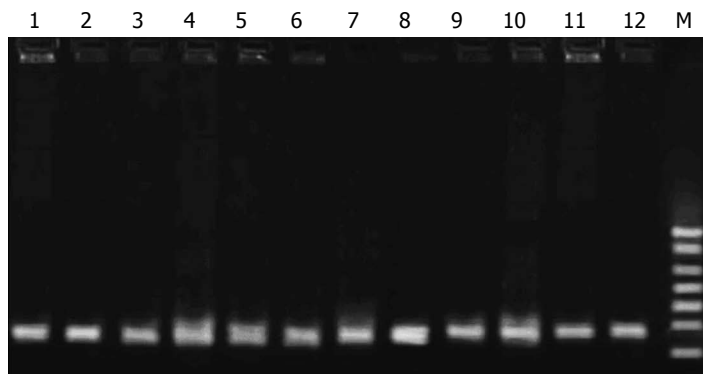


图 1 *H. pylori*的23S rRNA基因PCR产物电泳图。1-5: 大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷、泮托拉唑胁迫生长前的菌株; 6-10: 大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷、泮托拉唑胁迫生长后的菌株; 11, 12: 阴性对照前后菌株, 经扩增后均在425 bp处出现条带。

```

1      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
2      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
3      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
4      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
5      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
6      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
7      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
8      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
9      1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
10     1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
11     1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg
12     1      ccaaaaacacagcactttgccaactcgtaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccg

```

```

1      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
2      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
3      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
4      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
5      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
6      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
7      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
8      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
9      81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
10     81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
11     81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg
12     81      gacctgcatgaatggcgtaacgagatggagctgtctcaaccagagattcagtgaattg

```

A2143G, A2144G

```

1      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
2      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
3      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
4      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
5      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
6      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
7      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
8      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
9      241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
10     241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
11     241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac
12     241     tagtggaggtgaaaattcctctaccgcggcaagacggaggacccgtggacctttac

```


1	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
2	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
3	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
4	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
5	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
6	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
7	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
8	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
9	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
10	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
11	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
12	301	tacaacttagcactgctaattggaatatcatgcgcaggataggtgggaggctttgaagta
1	361	agggcttggctcttatggag
2	361	agggcttggctcttatggag
3	361	agggcttggctcttatggag
4	361	agggcttggctcttatggag
5	361	agggcttggctcttatggag
6	361	agggcttggctcttatggag
7	361	agggcttggctcttatggag
8	361	agggcttggctcttatggag
9	361	agggcttggctcttatggag
10	361	agggcttggctcttatggag
11	361	agggcttggctcttatggag
12	361	agggcttggctcttatggag

图2 中药提取物胁迫生长前后*H. pylori*菌株23s rRNA相关片段的碱基序列。1-5: 大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷、泮托拉唑胁迫生长前的菌株; 6-10: 大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷、泮托拉唑胁迫生长后的菌株; 11, 12: 阴性对照菌株, 提示V功能区第2144位、第2143位有A-G突变。

■应用要点

探讨有效治疗耐药性*H. pylori*的方法是热点, 本文从我国中草药资源丰富, 有一定的抑菌作用, 并不易产生耐药性的角度寻找能逆转耐药性*H. pylori*的方法, 发现大黄素等能提高耐药性*H. pylori*的敏感性, 为探讨抑制耐药性*H. pylori*的方法提供了重要依据。

菌效果优于对耐药菌株。

2.2 中药提取物胁迫*H. pylori*生长前后克拉霉素MIC 大黄素等中药提取物胁迫生长30 d后, 克拉霉素对耐药性*H. pylori*的MIC明显降低, 特别是大黄素和黄连素作用后MIC降低1倍, 耐药性*H. pylori*已经变成敏感菌株, 效果比阳性对照泮托拉唑略好(表3)。

2.3 中药提取物胁迫耐药*H. pylori*生长前后耐药基因对比

2.3.1 *H. pylori* 23s rRNA耐药基因PCR扩增: 对大黄素等中药提取物作用前后*H. pylori*进行PCR扩增, 扩增出包含23s rRNA基因v功能区的425 bp片段。敏感与耐药菌株基因扩增片段于2.0%琼脂糖凝胶电泳中均显示单一的约425 bp大小的清晰条带, 位置相同(图1)。

2.3.2 DNA测序: 把胁迫生长前后菌株的PCR产物送上海捷瑞工程有限公司纯化后测序, 发现耐药性*H. pylori*菌株均存在23s rRNA基因v功能区第2144位、第2143位有A-G突变; 而中药提取物胁迫生长菌株没有发现回复突变。基因比对如图2。

3 讨论

在对*H. pylori*感染患者治疗过程中, 抗生素的耐药性问题是影响治疗效果的主要原因, 尤

其*H. pylori*对克拉霉素和甲硝唑耐药率的逐年增加, 导致同样的治疗方案随着时间的推移, 其*H. pylori*根除率越来越低, 很难达到理想的根除效果^[3,4]。*H. pylori*的耐药率在不同国家或不同地区有明显差异, 并呈上升趋势^[5,6]。目前, 医学界一直致力于寻找安全有效的抗菌药物。中草药是我国医学宝库中最珍贵财富之一, 现在比较多的中草药抑菌效果已经很明确, 大黄、黄连、黄芩的体外抑菌效果也有报道^[7-11]。本研究实验结果证明了大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷对克拉霉素耐药或敏感的*H. pylori*均有较明显的抑制作用, 对敏感菌株的抑菌作用优于耐药菌株。在1/2MIC胁迫克拉霉素耐药*H. pylori*生长后, 能明显提高*H. pylori*对克拉霉素的敏感性, 大黄素和黄连素作用比较明显, 略高于阳性对照的泮托拉唑。因此大黄素和黄连素用来治疗克拉霉素耐药*H. pylori*引起的疾病效果会比较好。

关于*H. pylori*对克拉霉素的耐药机制, 比较一致地观点是*H. pylori* 23s rRNA V区点突变引起克拉霉素与核糖体结合力下降。已经发现的基因突变多为腺苷酸(A)转换为鸟苷酸(G), 已知的突变位点有A2144G、A2143G、A2142G、A2142C、G2115A、G2141A、A2142T和

■同行评价

本文有比较大的实用价值, 为寻找有效药物逆转*H. pylori*耐药提供参考依据。

A2143C^[12-14]。桂西地区人群*H. pylori*的23s rRNA基因A2143G、A2144G点突变与克拉霉素的耐药有明显相关^[15]。另外, 有学者研究发现部分抑菌中药提取物有抗突变作用^[16], 大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷对克拉霉素耐药和敏感*H. pylori*均有较明显的抑制作用, 但是其作用原理是否与23s rRNA耐药基因回复突变或抗耐药突变有关, 对此尚无见报道。我们在1/2MIC中药提取物浓度下压迫耐药菌株生长, 提取压迫前后克拉霉素MIC有变化的*H. pylori*菌株DNA, 扩增耐药基因, 检测基因序列, 对比突变, 在23s rRNA基因未发现A2143G、A2144G回复突变。因此, 研究结果表明大黄素、黄连素、五味子、黄芩苷在30 d内尚未能压迫克拉霉素耐药*H. pylori*的耐药基因发生回复突变, 其降低耐药性*H. pylori*的MIC和提高敏感性的原因可能与耐药性*H. pylori*外排泵等基因有关, 但需要进一步探索。

4 参考文献

- 1 Giorgio F, Principi M, De Francesco V, Zullo A, Losurdo G, Di Leo A, Ierardi E. Primary clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*: Is this the main reason for triple therapy failure? *World J Gastrointest Pathophysiol* 2013; 4: 43-46 [PMID: 23946886 DOI: 10.4291/wjgp.v4.i3.43]
- 2 Abdollahi H, Savari M, Zahedi MJ, Moghadam SD, Hayatbakhsh Abasi M. Detection of A2142C, A2142G, and A2143G Mutations in 23s rRNA Gene Conferring Resistance to Clarithromycin among *Helicobacter pylori* Isolates in Kerman, Iran. *Iran J Med Sci* 2011; 36: 104-110 [PMID: 23359224 DOI: 10.1002/dta.162]
- 3 Wang J, Xu L, Shi R, Huang X, Li SW, Huang Z, Zhang G. Gastric atrophy and intestinal metaplasia before and after *Helicobacter pylori* eradication: a meta-analysis. *Digestion* 2011; 83: 253-260 [PMID: 21282951 DOI: 10.1159/000280318]
- 4 Kang JM, Kim N, Shin CM, Lee HS, Lee DH, Jung HC, Song IS. Predictive factors for improvement of atrophic gastritis and intestinal metaplasia after *Helicobacter pylori* eradication: a three-year follow-up study in Korea. *Helicobacter* 2012; 17: 86-95 [PMID: 22404438 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00918.x]
- 5 Kim MS, Kim N, Kim SE, Jo HJ, Shin CM, Park YS, Lee DH. Long-term follow up *Helicobacter Pylori* reinfection rate after second-line treatment: bismuth-containing quadruple therapy versus moxifloxacin-based triple therapy. *BMC Gastroenterol* 2013; 13: 138 [PMID: 24050512 DOI: 10.1186/1471-230X-13-104]
- 6 Molina-Infante J, Gisbert JP. [Update on the efficacy of triple therapy for *Helicobacter pylori* infection and clarithromycin resistance rates in Spain (2007-2012)]. *Gastroenterol Hepatol* 2013; 36: 375-381 [PMID: 23623461 DOI: 10.1016/j.j.]
- 7 周汛, 李桂明. 10种中药的不同制剂对常见致病菌体外抗菌活性研究. *中华中医药杂志* 2009; 24: 237-239
- 8 彭懿. 加味痛泻要方合黄连素治疗腹泻型肠易激综合征的临床观察. *中医药导报* 2010; 16: 30-32
- 9 孙秋雁, 宫立孟. 高效液相色谱法测定消炎止痛剂中黄芩苷的含量. *医药导报* 2012; 31: 512-513
- 10 刘华一, 张滨, 姜立根. 蒲地蓝消炎口服液联合三联药物根除幽门螺杆菌63例. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 1780-1784
- 11 盛颖明, 邹晓平, 于成功, 吕瑛, 张丽莉. 中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的系统评价. *世界华人消化杂志* 2010; (7): 730-735
- 12 Ho SL, Tan EL, Sam CK, Goh KL. Clarithromycin resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia. *J Dig Dis* 2010; 11: 101-105 [PMID: 20402836]
- 13 Lee HJ, Kim JI, Cheung DY, Kim TH, Jun EJ, Oh JH, Chung WC, Kim BW, Kim SS, Park SH, Kim JK. Eradication of *Helicobacter pylori* according to 23S ribosomal RNA point mutations associated with clarithromycin resistance. *J Infect Dis* 2013; 208: 1123-1130 [PMID: 23801607 DOI: 10.1093/infdis/jit287]
- 14 Zhen-Hua Z, De-Qiang H, Yong X, Lin-Lin L, Nong-Hua L. Characterization of 23S rRNA gene mutation in primary and secondary clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains from East China. *Turk J Gastroenterol* 2013; 24: 5-9 [PMID: 23794337 DOI: 10.1063/1.4792202]
- 15 黄衍强, 赵丽娟, 黄赞松, 李晓华, 周喜汉, 岑朝. 桂西地区幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药性分析. *中华微生物学与免疫学杂志* 2009; 29: 37-39
- 16 仲浩. 薰衣草精油在细菌回复突变实验中的抗突变作用. *国外医药(植物药分册)* 2006; 5: 217-220

编辑 田滢 电编 鲁亚静

