

• 论 著 •

“黄金洗剂”逆转 ESBLs+E. coli 耐药性的体外实验研究*

衡雪源¹, 左志文¹, 朱德全¹, 刘江涛², 张磊³, 王立坤¹, 彭善鑫¹, 朱晓松¹, 王善超²
(1. 山东省临沂市人民医院多重耐药菌与真菌感染控制研究所, 山东临沂 276000;
2. 山东省临沂市人民医院肛肠科, 山东临沂 276000; 3. 北京航空航天大学医工交叉创新研究院/北航大数据精准医疗高精尖创新中心, 北京 100191)

摘要:目的 探讨中药“黄金洗剂”对产超广谱 β-内酰胺酶的大肠埃希菌(ESBLs+E. coli)的体外抗菌效果及其逆转细菌耐药的部分机制。方法 通过肉汤稀释培养法确定“黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 的最低抑菌浓度(MIC), 然后应用改良 Kirby-Bailer 法分析“黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 耐药性的逆转效果, 最后通过结晶紫染色分析生物膜形成能力和检测 ESBLs 酶活性来探讨“黄金洗剂”逆转细菌耐药的机制。结果 “黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 的 MIC 为 0.6 g/mL, 其最佳抑菌条件是 0.5 g/mL 的药物浓度作用细菌 24 h。此时“黄金洗剂”能够逆转细菌对第四代头孢菌素头孢吡肟的耐药性[(13.9±1.2)%], 而对第三代头孢菌素头孢噻肟和头孢曲松的逆转率很低。进一步研究发现“黄金洗剂”能够逆转细菌耐药是因为该中药能够抑制生物膜形成, 抑制 ESBLs 酶活性。结论 “黄金洗剂”在 0.5 g/mL 条件下作用细菌 24 h 能够明显逆转细菌对头孢吡肟的耐药性, 主要通过抑制细菌生物膜的形成和 ESBLs 的酶活性来实现。

关键词:产超广谱 β-内酰胺酶; 大肠埃希菌; 中药; 耐药性; 生物膜
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.16.009 **中图分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2020)16-1958-04 **文献标识码:**A

Reversal effect of "Huang-Jin Lotion" on drug-resistance of ESBLs-producing E. coli in vitro*

HENG Xueyuan¹, ZUO Zhiwen¹, ZHU Dequan¹, LIU Jiangtao², ZHANG Lei³,
WANG Likun¹, PENG Shanxin¹, ZHU Xiaosong¹, WANG Shanchao²

(1. Institute of Multi-resistant Bacterial and Fungal Infection Control, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China; 2. Department of Anorectum, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China; 3. Interdisciplinary Innovation Institute for Medicine and Engineering, University of Aeronautics and Astronautics Advanced Innovation/Center for Big Data-Based Precision Medicine, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective To investigate antibacterial activity in vitro of traditional Chinese medicine prescription "Huang-Jin Lotion" on Escherichia coli producing extended spectrum β-lactamases (ESBLs-producing E. coli) and partial mechanism of its reversal effect of drug resistance. **Methods** The minimal inhibitory concentrations (MIC) of "Huang-Jin Lotion" against ESBLs-producing E. coli were detected by Broth Dilution Culture method. Then the reversal effect of "Huang-Jin Lotion" on drug-resistance of ESBLs-producing E. coli was measured by modified Kirby-Bailer method. Lastly, the mechanism of the reversal effect was dissected through analyzing the potency to bacterial biofilm formation by crystal violet staining and measuring the enzymatic activity of ESBLs. **Results** The MIC of "Huang-Jin Lotion" against ESBLs-producing E. coli was 0.6 g/mL. The optimum condition was that bacteria were treated with 0.5 g/mL Chinese medicine for 24 h. And the reversal rate of "Huang-Jin Lotion" on the fourth generation cephalosporin cefepime (FEP) was (13.9±1.2)%, while that on the third generation cephalosporin ceftaxime and ceftriaxone were very low. Further study found that the reversal effect of "Huang-Jin Lotion" on the drug-resistance of ESBLs-producing E. coli was partially due to its suppressive effect on bacterial biofilm formation and enzymatic activity of ESBLs. **Conclusion** The FEP-resistance of ESBLs-producing E. coli would be reversed when the bacteria was treated by "Huang-Jin Lotion" at the concentration of 0.5 g/mL for 24 h, mainly through the repressive effect of the Chi-

* 基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2017-461)。
作者简介: 衡雪源, 男, 主任医师, 主要从事神经外科及中枢神经系统感染的研究。
本文引用格式: 衡雪源, 左志文, 朱德全, 等. “黄金洗剂”逆转 ESBLs+E. coli 耐药性的体外实验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(16): 1958-1961.

nese medicine on the bacterial biofilm formation and the activity of ESBLs.

Key words: extended spectrum β -lactamases; *Escherichia coli*; traditional Chinese medicine; drug-resistance; biofilm

肛肠疾病属于临床多发病,其发病率高达 59%,手术治疗是常用方式,而由于肛门位置的特殊性,条件致病菌极易导致创面感染,不仅降低手术成功率,还严重影响患者术后康复效果^[1]。李敏皓等^[2]通过分析 220 例肛肠手术患者切口周围分泌物的菌群变化,发现全部患者检出的细菌包括大肠埃希菌(*E. coli*)、肺炎克雷伯菌、表皮葡萄球菌、肠球菌、白色念珠菌等,而 *E. coli* 占比超过 50%。*E. coli* 是临床中常见的条件致病菌,可能引起尿路感染、血行感染和肠道感染等,在近 10 年的检测标本中,*E. coli* 的检出数量历年均居前 5 位^[3]。产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是一种主要由质粒介导的能水解青霉素类、头孢菌素类和单环类抗菌药物的 β -内酰胺酶^[4]。ESBLs 对抗菌药物的选择要求较高,极易引起新的耐药株产生,随着临床抗菌药物的大量使用和不合理使用,产 ESBLs 的 *E. coli*(ESBLs+*E. coli*)的检出率呈逐年上升的趋势,给临床抗感染诊疗带来极大的挑战^[5]。因此,进行延缓或逆转细菌耐药性的相关研究具有重要意义。在肛肠疾病手术后,除了传统的抗菌药物治疗,常采用复方黄柏洗剂进行坐浴辅助治疗,其效果明显优于单纯抗菌药物治疗。本研究主要探讨复方黄柏洗剂改良方“黄金洗剂”对 ESBLs+*E. coli* 的体外抗菌效果及其逆转细菌耐药的部分机制,以期为临床中药与抗菌药物联合使用治疗感染性疾病提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 依据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)推荐的抗菌药物药敏试验操作方法和判断标准^[6],从 2018 年 12 月至 2019 年 6 月山东省临沂市人民医院多重耐药菌与真菌感染控制研究所分离的菌株中筛选出 20 株 ESBLs+*E. coli* 作为实验菌株。铜绿假单胞菌(ATCC25873)为本研究所保存的质控标准菌株,作为生物膜检测的阳性对照。

1.2 试剂 头孢噻肟(CTX, 30 μ g)、头孢曲松(CRO, 30 μ g)、头孢吡肟(FEP, 30 μ g)药敏纸片购自英国 Oxoid 公司;头孢噻肟(CTX)粉末购自中国药品生物制品检定所。三氯乙酸(TCA)购自北京索莱宝科技有限公司;营养琼脂购自杭州滨和微生物试剂有限公司;蛋白检测试剂盒购自天根生化科技有限公司;结晶紫染液购自法国生物梅里埃公司。

1.3 方法

1.3.1 中药“黄金洗剂”的制备 复方黄柏洗剂应用于各类痔疮及肛门疼痛、术后的治疗等有较好的疗效^[7],山东省临沂市人民医院肛肠科在复方黄柏洗剂经典方的基础上进一步改良,得到“黄金洗剂”,效果甚佳,本研究探讨其对 ESBLs+*E. coli* 耐药性的逆转效果。“黄金洗剂”的配方如下:黄柏 20 g,金银花

20 g,苦参 20 g,荆芥 20 g,荔枝草 30 g,白矾 20 g,玄明粉 10 g,川椒 30 g,经医院制剂室自动煎药机浓煎,最终原药材质量与煎液体积比为 1.0 g/mL,瓶装备用。

1.3.2 中药“黄金洗剂”最低抑菌浓度(MIC)检测 采用试管稀释培养法检测 MIC。接种 ESBLs+*E. coli* 1×10^6 cfu/mL,分别置于含不同浓度“黄金洗剂”的肉汤中培养,以无中药的肉汤培养基为对照,24、48、168 h 时观察试管的浑浊程度,结果判定标准:肉汤完全清亮表示无细菌生长,记为一;肉汤浑浊表示有细菌生长,记为十。以肉眼观察无细菌生长试管中的最低药物浓度为 MIC 值^[8]。

1.3.3 药敏检测 将中药“黄金洗剂”配制低于 MIC 的肉汤(含药 0.5 g/mL 和 0.1 g/mL),以无中药肉汤为对照(中药未处理组),接种 ESBLs+*E. coli* 1×10^6 cfu/mL,分别培养 24、48、168 h 后(中药处理组),采用改良 Kirby-Bailey 法,参照 CLSI 推荐的方法判定结果^[6]。测量并比较中药处理前后抑菌圈直径(单位:mm)。中药方剂逆转耐药菌株的逆转率计算公式:逆转率=(D2-D1)/D1 $\times$ 100%(D1 为干预前的药敏直径,D2 为干预后的药敏直径)。实验重复 3 次,结果取平均值。

1.3.4 生物膜抑菌率的检测 将菌液加入 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,无菌生理盐水清洗数次后,在超净工作台上完全风干。加入结晶紫染液,室温染色,无菌双蒸水清洗数次,自然完全风干。加入 33%冰醋酸,脱色 10 min 后于 575 nm 处检测吸光度(A)值。分别以新鲜培养基、ATCC25873 菌液作为阴性对照组和阳性对照组,做 3 个平行重复实验。生物膜的抑制率(BIR)=(A0-A1)/A0 $\times$ 100%(A0 为中药未处理组的 A 值,A1 为中药处理组的 A 值)。

1.3.5 细菌粗酶提取与 ESBLs 酶活性的检测 取等量 ESBLs+*E. coli* 于无菌小管中,离心后留菌备用。磷酸盐(PBS)缓冲液重悬细菌,反复冻融 8~10 次,4 $^{\circ}$ C 8 000 r/min 离心 10 min,留取上清。将 60 μ L 的 0.01 mol/L PBS、60 μ L 的 100 μ g/mL CTX 溶液和 30 μ L 的粗酶提取液分别加入 96 孔板中,于 37 $^{\circ}$ C 孵育,精确计时,加入终止液 60 μ L 的 5%三氯乙酸终止反应,于 235 nm 检测 A 值。60 μ L CTX 作为空白对照,做 3 个平行重复实验。

酶活性单位:在 37 $^{\circ}$ C, pH 值为 7.0 时,每 1 mL 酶液内每 1 mg 活性蛋白质每 1 min 内水解底物的量。酶活性单位(U)= $\Delta A/0.03 \times T$;公式中 ΔA 为 37 $^{\circ}$ C, 235 nm 下的 $A_N - A_0$, A_N 为测试后数值, A_0 为空白值;0.03 是将酶液体积换算成 1 mL;T 是酶与底物的反应时间。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数

据处理及统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间中的两组比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 中药“黄金洗剂”MIC 的检测结果 通过试管稀

释培养法检测“黄金洗剂”的 MIC 发现,中药处理 ES-
BLs+E. coli 24、48、168 h 都能够抑制细菌的生长,
“黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 具有一定的抑菌作用,
其 MIC 为 0.6 g/mL。见表 1。

表 1 不同浓度“黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 的抑菌效果

中药作用 时间(h)	1.0 g/mL	0.9 g/mL	0.8 g/mL	0.7 g/mL	0.6 g/mL	0.5 g/mL	0.4 g/mL	0.3 g/mL	0.2 g/mL	0.1 g/mL	0.0 g/mL
24	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—
48	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—
168	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—

2.2 中药“黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 耐药性的逆
转效果 通过检测中药处理后的细菌对抗菌药物的
抑菌圈直径发现,与中药未处理组相比,经中药处理
24 h 的 ESBLs+E. coli 对 FEP 抑菌圈直径明显变
大,而对 CTX 和 CRO 的抑菌圈直径大小变化并不
大,见图 1。根据测得的抑菌圈直径计算逆转率,0.5
g/mL 的中药“黄金洗剂”作用于 ESBLs+E. coli
24 h,能够逆转细菌对第四代头孢菌素 FEP 的耐
药性,逆转率为 $(13.9 \pm 1.2)\%$,而对第三代头孢菌素
CTX 和 CRO 的影响不大。0.1 g/mL 的中药对
FEP、CTX 和 CRO 无明显影响。见表 2。

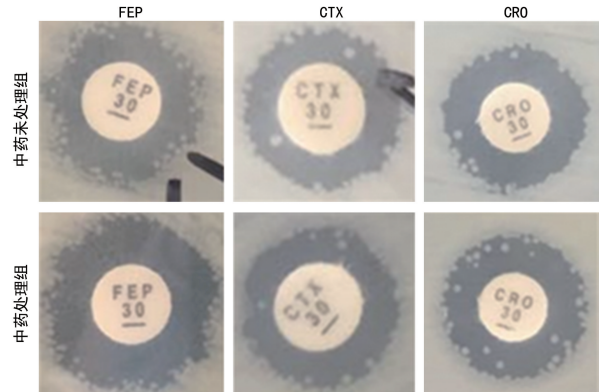


图 1 中药“黄金洗剂”处理前后 ESBLs+E. coli 分离株
对抗菌药物的耐药性变化

表 2 中药“黄金洗剂”逆转 ESBLs+E. coli
耐药的逆转率($\bar{x} \pm s, \%$)

中药浓度(g/mL)	FEP	CTX	CRO
0.5	13.9 ± 1.2	2.9 ± 1.1	3.0 ± 1.6
0.1	5.6 ± 3.5	1.9 ± 1.2	2.1 ± 1.2

2.3 中药“黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 生物膜形成
的影响 通过结晶紫染色法分析中药对细菌生物膜
形成的影响发现,与中药未处理组相比,中药处理组
能够明显抑制生物膜的形成,0.5 g/mL 的中药处理
24 h 时,生物膜抑制效果最佳,生物膜抑制率可以达
到 63%,见图 2。

2.4 中药“黄金洗剂”对 ESBLs 酶活性的影响 通
过分析中药对 ESBLs 活性的影响发现,与中药未处

理组相比,0.5 g/mL 的中药处理细菌 24 h 能够明显
抑制 ESBLs 的活性,差异有统计学意义($P < 0.001$),
酶活性单位从 0.50 U 降到 0.35 U,见图 3。另外,
0.5 g/mL 和 0.1 g/mL 的中药处理细菌 48 h,也能够
略微抑制 ESBLs 的酶活性,与中药未处理组比较,差
异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

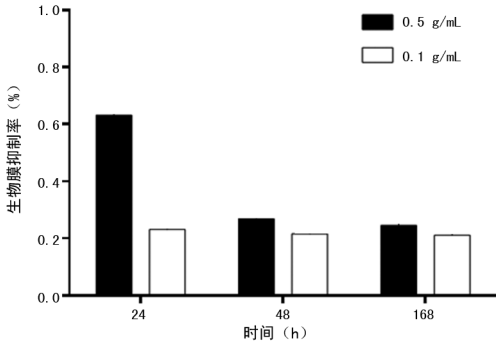
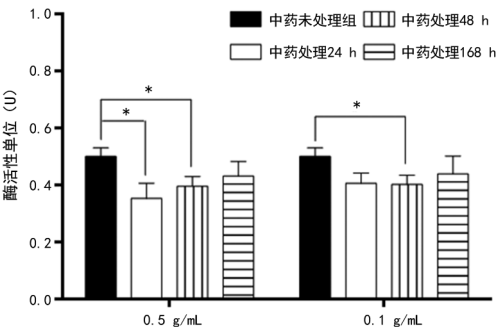


图 2 中药“黄金洗剂”对 ESBLs+E. coli 生物膜
形成的抑制作用



注:与中药未处理组比较,* $P < 0.05$ 。
图 3 中药“黄金洗剂”对 ESBLs 酶活性的影响

3 讨 论

肛肠疾病患者的机体免疫功能减退,极易发生条
件致病菌感染,尤其是 E. coli 的感染。同时,
ESBLs+E. coli 的临床分离率逐年升高,情况越来越
严重,给抗感染治疗带来了极大的困难。单纯使用抗
菌药物治疗 E. coli 感染极易产生新的耐药菌,因此,
除了常规的抗菌药物治疗感染性肛肠疾病,常通过中
药坐浴或者外敷进行辅助治疗。一方面,中药坐浴可
以达到消肿止痛的目的;另一方面,清热燥湿或泻火
解毒等功效的中草药不仅具有广谱抗菌作用,同时也

具有降低细菌耐药性的功能^[9-11]。

复方黄柏洗剂改良方中药“黄金洗剂”的主药是黄柏、苦参、金银花,黄柏具有清热燥湿、抑菌消炎、泻火解毒的功效,苦参可清热解毒,金银花能消肿燥湿、清热解毒,在肛肠疾病抗感染治疗中效果甚佳^[9,12]。黄柏提取液对耐青霉素细菌产生的 β -内酰胺酶有不同程度的抑制作用,金银花水煎剂对质粒的消除率较高^[13]。

本研究发现,外用中药“黄金洗剂”能够有效抑制 ESBLs+E. coli 的生长,测得中药“黄金洗剂”的 MIC 为 0.6 g/mL。同时,本研究发现,0.5 g/mL 的中药“黄金洗剂”处理 ESBLs+E. coli 24 h,能够有效逆转 ESBLs+E. coli 对 FEP 的耐药性。以上研究结果提示在肛肠疾病抗感染治疗中辅以中药“黄金洗剂”治疗,能够减少耐药菌的出现,提高治愈率。考虑到中药可以通过改变生物膜形成、影响酶活性等途径逆转细菌的耐药性^[9],本研究进行了进一步机制研究,结果发现 0.5 g/mL 中药“黄金洗剂”处理细菌 24 h 时对生物膜形成的抑制率能达到 63%,而此时只表现出对 FEP 耐药性的明显改变,对 CTX、CRO 的效果并不明显,这可能与 3 种抗菌药物本身的生物膜穿透能力与穿透方式有关,需要进一步深入探讨。另外,检测中药“黄金洗剂”处理对酶活性的影响,结果发现 0.5 g/mL 的中药“黄金洗剂”作用细菌 24 h 对 ESBLs 活性的影响最大,可见中药“黄金洗剂”能够部分逆转细菌对 FEP 的耐药性,而没有逆转其对 CTX、CRO 的耐药性,也可能与中药对酶的影响有关,中药改变了 ESBLs 对第四代头孢菌素的耐药性,而没能改变对第三代头孢菌素的耐药性。在进行机制探讨的过程中,本研究发现中药“黄金洗剂”作用 ESBLs+E. coli 24 h 效果最好,并没有呈现“随着作用时间延长效果提高”的现象,这可能与中药有效成分被细菌消耗有关,也可能与细菌应对外界不利条件产生群体感应有关^[14],具体原因有待进一步研究。以上结果提示中药作用时间并不是越长越好,而是存在最佳的作用时间,中药在最佳作用时间才能够有效地抑制生物膜的形成和 ESBLs 的酶活性。

鉴于合成药物可能存在一定的不良反应,中草药在感染性疾病的治疗中发挥的作用越来越大。有研究发现,药用草本植物的水提物或者醇提物都具有抑制肠杆菌科细菌生长的功效,这为中草药在抗感染治疗中的应用提供了理论依据^[15-16]。本研究发现中药“黄金洗剂”能够抑制细菌生长、逆转耐药菌的耐药性,这为抗菌药物联合中药治疗耐药菌感染提供了依据。但本研究仍有不足,需要进一步探讨分析真正起到逆转耐药作用的成分,为耐药菌的防治提供更加有利的指导。

4 结 论

综上所述,中药“黄金洗剂”能够有效抑制 ESBLs+E. coli 的生长,还能通过改变细菌生物膜形

成,影响 ESBLs 活性,从而发挥逆转耐药菌耐药性的作用,在临床抗感染治疗中可与抗菌药物配伍更好地发挥其作用。

参考文献

- [1] 刘伟,罗小红,焦云婷. 肛痔洗剂联合微波治疗肛肠术后并发症的临床效果[J]. 广西医科大学学报,2017,34(1):118-120.
- [2] 李敏皓,李兵,黄仕灵. 肛肠疾病肛周菌群调查与手术切口感染病原菌分析[J]. 求医问药,2013,11(10):81-82.
- [3] SCHEMBRI M A, ZAKOUR N L, PHAN M D, et al. Molecular characterization of the multidrug resistant escherichia coli ST131 clone[J]. Pathogens, 2015, 4(3): 422-430.
- [4] DUNN S J, CONNOR C, MCNALLY A. The evolution and transmission of multi-drug resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: the complexity of clones and plasmids[J]. Curr Opin Microbiol, 2019, 51: 51-56.
- [5] HARRIS P N. Clinical management of infections caused by enterobacteriaceae that express Extended-Spectrum beta-Lactamase and AmpC enzymes[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2015, 36(1): 56-73.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100 [S]. 28th ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.
- [7] 陈国宝. 复方黄柏洗剂的制备及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 230-231.
- [8] 何明,陶庆春,张永生,等. 清开灵、双黄连联合头孢哌酮-舒巴坦钠对产 ESBLs 大肠埃希菌细菌学实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(5): 342-345.
- [9] 刘坤友. 中药抗耐药大肠埃希菌的机制研究进展[J]. 广西医学, 2016, 38(6): 843-845.
- [10] 房华,汪瑞忠,张晓雪,等. 6 种中草药对多重耐药菌的抗菌活性及逆转耐药性作用的体外研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(4): 396-399.
- [11] 李俊武. 三种中药逆转大肠杆菌耐药性的实验观察[J]. 医学检验与临床, 2010, 21(3): 34-35.
- [12] 宋防震. 肛肠洗剂作用于肛肠术后的治疗效果探讨[J]. 现代诊断与治疗, 2018, 29(10): 1539-1540.
- [13] 李睿明,雷朝霞. 细菌耐药性对抗策略[J]. 医学与哲学(临床决策论坛版), 2006, 27(8): 45-47.
- [14] 刘男男,凌保东. 核糖开关在逆转细菌耐药性机制中的潜在应用[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(6): 2673-2676.
- [15] OHWOFASA I T, OKWENA P J. Synergistic effect of the extracts of vernonia amygdalina and solenostemon monostachyus on gram-negative bacteria[J]. Pak J Biol Sci, 2018, 21(8): 369-375.
- [16] MUHAMMAD F K, HUAQIAO T, JAMES T L, et al. Antibacterial properties of medicinal plants from Pakistan against multidrug-resistant ESKAPE pathogens[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 815-820.