

研究证实,肺成纤维细胞是肺纤维化发生发展的重要效应细胞,分泌炎症介质、释放大量 ECM^[6],因此研究药物对肺成纤维细胞的作用也尤其重要。

本实验应用消化法成功培养了来源于肺脏和心脏的成纤维细胞,并用中药干预。倒置显微镜下观察,肺成纤维细胞呈梭形或三角形,心肌成纤维细胞多呈梭形,当归、川芎、黄芪作用 24 h 后成纤维细胞数目明显减少,丹参作用 24 h 后成纤维细胞数目明显增多,而且由于增殖旺盛,有些细胞死亡漂浮于液面。通过 MTT 比色法对两种来源的成纤维细胞进行测定,观察细胞的增殖,结果显示不同质量浓度的川芎、当归、丹参、黄芪对成纤维细胞的作用有差异。其中中、小剂量的当归、川芎及大、中、小剂量的黄芪对肺成纤维细胞的增殖有抑制作用,而大剂量当归、川芎及各剂量丹参对肺成纤维细胞有促进增殖的作用;而对心肌成纤维细胞而言,中、小剂量的当归、黄芪及大、中、小剂量的川芎有抑制作用,大剂量当归、黄芪及各剂量丹参有促进作用。中药川芎、黄芪对肺、心肌成纤维细胞的不同特点,可能与药物对不同靶器官的作用不同而异。总之,中、小剂量的当归、川

芎、黄芪提取液对成纤维细胞均有抑制作用,而丹参却无此作用。可以看出,不同药物对不同成纤维细胞的作用有差异;同一种药物的不同剂量对成纤维细胞具有不同的作用结果;这些药物是通过怎样的途径发挥其作用的,其作用机制如何,有待进一步研究。

References:

- [1] Li R Q, Jin Y N. Effect and significance of TGF- β in the process of radiation fibrosis [J]. *China Oncol* (中国癌症杂志), 2001, 11(3): 267-269.
- [2] Desmouliere A. Factors in fluencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis [J]. *Cell Biol Int*, 1996, 19(5): 471-476.
- [3] Powell D W, Mifflin R C, Valentich J D, et al. Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(1Pt1): C19.
- [4] Vergara J A, Raymand U, Thetl A, et al. Changes in lung morphology and cell number in radiation pneumonia and fibrosis: a quantitative ultrastructure study [J]. *Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 13(5): 723.
- [5] Phan S H. The myofibroblast in pulmonary fibrosis [J]. *Chest*, 2002, 122 (6 Suppl): 286S-289S.
- [6] Roy S G, Nozaki Y, Phan S H. Regulation of α -smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33: 723-734.

葡萄提取物消除 O157 大肠埃希氏菌耐药性的作用

王秀英,刘世贵,高 荣,蒋舜媛,朱 冰,陈 恬

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室,四川 成都 610064)

O157 肠出血性大肠埃希氏菌 (EHEC),是出血性肠炎的主要致病菌,不仅致病性、传染性强,还可并发溶血性尿毒综合征 (hemolytic uremic syndrome, Hus) 等严重疾病。自 1982 年以来,已在美国、日本等地多次引起疾病的暴发流行。1990 年 5~8 月日本爆发了到目前为止世界上最大的一次 O157:H7 大肠埃希氏菌 (简称大肠杆菌) 感染,9 000 多人患病,10 余人死亡。欧洲一些国家也先后发生了 O157 大肠杆菌感染,在我国 O157 大肠杆菌感染也散在发生。因此,O157 大肠杆菌已成为威胁人类生命的重要病菌之一。随着 O157 大肠杆菌疾病的暴发以及伴随着抗菌药物的广泛应用,O157 大肠杆菌对抗菌药物的耐药性也随之增加,给疾病

的控制带来了影响。为了克服日趋严重的细菌耐药性,从天然产物中寻找能够致敏细菌的生物活性物质,是增强抗菌药物疗效的有效途径。本实验室从中国西部食源性植物中筛选具有消除细菌耐药性的植物种类,自葡萄科 (Vitaceae Lindley 或 Ampelidaceae Kunth) 葡萄属 (*Vitis* L.) 植物提取物中,发现具有消除 O157 大肠杆菌耐药性的作用。

1 材料与方法

1.1 3 株受试大肠埃希氏菌株来源:大肠埃希氏菌标准菌株 *Escherichia coli* ATCC-25922,由中国科学院微生物研究所提供;*E. coli* O157:H7 出血性大肠埃希氏菌,由中国疾病预防控制中心微生物流行病学研究所提供;*E. coli* O157:88ac:19 出血性大

收稿日期:2005-09-13

基金项目:科技部重大基础研究前期研究专项 (2001CC02700);四川省科技厅科技攻关项目 (04SG022-015-01)

作者简介:王秀英(1956-),女,博士研究生,主任医师,于成都军区疾病预防控制中心从事病原微生物预防研究工作。

Tel: (028) 66179465 E-mail: wangxy48@163.com

肠埃希氏菌,由丹麦国家血清研究所提供。

1.2 药敏纸片(60 种药物)购自中国药品生物制品检定所,实验方法和判断标准按说明书执行。

1.3 培养基:MHA 培养基、营养肉汤培养基、麦康凯培养基、半固体培养基、LB 培养基,购自中国药品生物制品检定所。

1.4 葡萄提取物的制备:以葡萄 *Vitis vinifera* L. 为原料,首先采用传统的水提法、醇提法、甘油提法制成初提物,然后再用药用吸附树脂进行分类吸附,所得到的提取物(含酚类成分 1%~5%)配制 10:1 药液待用。

1.5 消除细菌耐药性实验:分别在含有植物提取物的培养基和无提取物的培养基中对 O157 大肠杆菌进行连续传代,然后在空白 LB 培养基中再次传代,采用多种药敏纸片测定细菌药敏变化(抑菌圈直径大小)。以未加植物提取物的空白对照为标准,观察

经植物提取物作用后的细菌药敏变化。

2 结果

2.1 大肠杆菌对青霉素类药物的药敏变化:葡萄提取物作用细菌 24 h 后,与无提取物作用的空白对照组比较,3 株大肠杆菌对青霉素类药物的抑菌圈直径有显著增大,抑菌圈增加幅度 6.33~12.00 mm,其中哌拉西林平均增加幅度最大。3 株大肠杆菌之间比较,抑菌圈平均增加幅度依次为 *E. coli* O157:H7 为 10.22 mm, *E. coli* O157:88ac:19 为 7.77 mm, *E. coli* ATCC 25922 为 5.22 mm。见表 1。

2.2 大肠杆菌对 7 类(60 种)抗菌药物的药敏变化:葡萄提取物作用细菌 24 h 后,与无提取物作用的空白对照组比较,3 株大肠杆菌对青霉素类、头孢类、喹诺酮类、磺胺类、氨基糖苷类、四环素类和大环内酯类 7 类 60 种抗菌药物药敏平均增加百分率为 34.41% ($P < 0.01$),见表 2。

表 1 葡萄提取物作用 24 h 后细菌对青霉素类药物药敏变化 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Change of bacterial sensitivity to Penicillin derived antibiotics after treatment with grape extracts for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	抑菌圈直径/mm									
	羧苄西林	氨苄西林	氨苄西林/舒巴坦	阿莫西林	阿莫西林/舒巴坦	哌拉西林	哌拉西林/舒巴坦	阿洛西林	替卡西林	
<i>E. coli</i> ATCC-25922 提取物	26±1*	21±1*	23±1*	32±1**	23±1**	31±2**	32±2**	30±1**	25±1**	
<i>E. coli</i> ATCC-25922 空白对照	23±1	18±0.8	20±1	25±1	17±1	24±1	25±1	24±1	20±1	
<i>E. coli</i> O157:H7 提取物	32±2**	27±1**	28±1**	36±2**	34±1**	38±2**	36±2**	36±1**	28±1**	
<i>E. coli</i> O157:H7 空白对照	23±1	18±0.5	18±0.5	27±1	20±1	26±1	27±1	24±1	20±1	
<i>E. coli</i> O157:88ac:19 提取物	30±2**	26±1**	26±1**	24±1**	24±1**	37±2**	24±1**	30±1**	33±2**	
<i>E. coli</i> O157:88ac:19 空白对照	23±1	20±1	19±0.5	18±0.5	17±0.5	20±1	18±0.5	23±1	26±1	
每种药物抑菌圈直径平均增加/mm	6.33	6.33	6.66	7.33	9.00	12.00	7.33	8.33	6.66	

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 2 葡萄提取物作用 24 h 后与空白对照组比较细菌对(60 种)抗菌药物药敏平均增加百分率 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Average percentage of increase of bacterial sensitivity to 60 antibiotics after treatment with grape extracts for 24 h compared with blank control bacteria ($\bar{x} \pm s, n=12$)

菌株	药敏增加百分率/%								平均增加百分率/%
	青霉素类 (13 种药物)	头孢类 (29 种药物)	喹诺酮类 (12 种药物)	磺胺类 (2 种药物)	氨基糖苷类 (8 种药物)	四环素类 (3 种药物)	大环内酯类 (3 种药物)		
<i>E. coli</i> ATCC-25922	36.15±1.85	23.93±1.54	22.09±1.33	30.60±1.45	12.80±1.12	20.59±1.45	15.00±1.28	23.02	
<i>E. coli</i> O157:H7	41.00±2.45	38.37±2.36	17.29±1.33	40.35±2.67	35.29±2.59	40.00±2.83	3.12±0.13	31.06	
<i>E. coli</i> O157:88ac:19	39.87±2.16	42.21±2.14	23.35±1.21	67.36±2.45	28.63±1.84	38.27±2.58	14.81±1.75	36.35	

2.3 提取物作用细菌 120 h(传 5 代)与去掉提取物后 120 h(传 5 代),大肠杆菌标准菌株 *E. coli* ATCC 25922 与 O157:H7 比较,观察细菌对 60 种药物的平均药敏动态变化:结果发现,随着提取物作用细菌时间的延长,与空白对照比较,药敏性也随之增加,当达到 120 h, O157:H7 药敏性增加至 38.57%,当去掉提取物 24 h,细菌药敏迅速下降,但去掉提取物 120 h, O157:H7 药敏仍高于对照组

7.86%,见图 1。

3 讨论

自 1929 年 Fleming 发现青霉素,1940 年 Waksman 发现链霉素以来,人们不断从微生物次级代谢产物中找到众多有效的抗生素,并由此开发出许多半合成抗生素,对防治细菌性感染起到了重要的作用。但细菌的耐药性也随之而来^[1,2],而且越来越严重^[3-6],尤其是大肠杆菌对抗生素的耐药性十

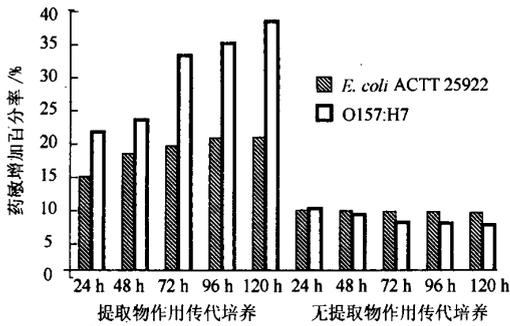


图 1 葡萄提取物作用 120 h (传 5 代) 及无提取物作用 120 h (传 5 代) 细菌对 60 种药物的平均药敏动态变化

Fig. 1 Dynamic change of bacterial sensitivity to 60 antibiotics after treatment with grape extracts for 120 h and cultured for another 120 h without grape extracts (cultured for 5 generations)

分严重,已成为最常见的感染病原之一。我国学者曾研究报道某些中药如大蒜、山楂、紫草、车前子、金银花等提取物具有一定的消除细菌耐药性质粒的作用,而石芽茶、大黄、谷精籽、黄芩等中药提取物对细菌产生的 β-内酰胺酶也有不同程度的抑制作用^[1],这为我国传统中药的深度开发应用探索了一条新的途径。

近十余年来,本实验室对中国西部食源性植物进行广泛的筛选,发现葡萄属植物中的某些种类具有致敏 O157 大肠杆菌的作用,药敏实验证实被致敏的大肠杆菌对多种抗菌药物增强了敏感性。本研究初步探索发现葡萄属植物提取物具有独特的消除 O157 大肠杆菌耐药性的作用,经过提取物作用的细菌,对 7 类 60 种抗菌药物均有不同程度的增敏作

用,与对照组比较,实验组 60 种抗菌药物平均增加敏感性 34.41%。同时,分别对 7 种抗菌药物进行了药敏检测,结果显示:青霉素类、头孢类、磺胺类、四环素类药物更为敏感。本研究还对提取物作用细菌 120 h (传 5 代) 和去掉提取物 120 h (传 5 代) 的细菌进行药敏动态变化分析,发现随着提取物作用细菌时间的延长,药敏性也随之增加,细菌处于致敏状态,但去掉提取物后,细菌药敏迅速下降,发现随着药敏迅速下降,当达到 120 h 的时候,O157 大肠杆菌仍比对照组高出 7.86%,仍然不能恢复到始发药敏状态,分析其原因可能与细菌受到提取物作用后某些基因的表达改变有关系。今后,还有待进行植物有效成分的分析及植物提取物消除 O157 大肠杆菌耐药性作用机制的深入研究。

References:

- [1] Sun L, Cheng Z L. Development of the antagonists to bacterial drug resistance [J]. *Chin J Vet Drug* (中国兽药杂志), 2003, 37(8): 34-39.
- [2] Meng Z, Jin J L, Liu Y Q, et al. The induction and elimination of bacteria's resistance [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(9): 1047-1050.
- [3] Qkusu H, Mad Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple antibiotic resistance (Mar) mutants [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(1): 306-308.
- [4] Guz N R. Flavone lignan and flavone inhibit of a structure activity relationships [J]. *J Med Chem*, 2001, 44(2): 261-268.
- [5] Hughes V M, Jack G W, Kaatz G W. Gonjugative plasmid in bacteria of the preantibiotic era [J]. *Nature*, 1983, 302: 725.
- [6] Chang S C, Hsu L, Pan H J, et al. Epidem iologic investigation of nosocomial outbreak of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by plasmid pattern analysis [J]. *J Formosan Med Assoc*, 1992, 91(10): 945.

欢迎订阅《中草药》杂志 2001 年增刊

2001 年第 32 卷增刊为“第三届中中药新药研究与开发信息交流会”会议论文集,特邀了中国工程院院士、国内十多名专家和中青年学科带头人就加快中药现代化的进程、我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章 20 多篇,另有反映近年来中花化学、药理分析、制剂、药材及临床等方面的科研论文和综述文章 140 多篇。

每本定价 60 元,另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅,款到寄刊。

编辑部地址:天津市南开区鞍山道 308 号 邮编:300193 网址:www.tjipr.com

电话:(022)27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzjb@tjipr.com