

黄柏提取物抗耐大环内酯类药物肺炎支原体的实验研究

张卫英¹, 张艺², 余道军¹, 陈岳明¹

1. 杭州市第一人民医院检验科, 浙江 杭州 310006; 2. 杭州市第一人民医院儿科

摘要: **目的** 探讨黄柏提取物体外对大环内酯类药物耐药肺炎支原体(MP)的抗菌活性,并分析黄柏提取物对其耐药相关基因 MPN421 mRNA 表达的影响,通过检测黄柏提取物作用前后 MPN421 mRNA 表达改变情况,初步阐述黄柏提取物抗 MP 的相关分子机制。**方法** 用实时荧光定量 PCR 鉴定 45 例 MP 临床分离株对大环内酯类药物耐药突变(23S rRNA 区域),鉴定肺炎支原体的突变株(23S rRNA 2063 点突变)和野生株;体外药物敏感试验检测 45 株肺炎支原体对黄柏提取物的最小抑菌浓度(MIC);实时荧光 PCR 检测黄柏提取物作用前后对 MP MPN421 mRNA 表达改变。**结果** 45 例 MP 临床分离株中发现 30 株 23S rRNA 发生突变(突变株),15 株 MP 未发生突变(野生型);15 株 MP 野生株的 MIC 值为 0.036 ~ 0.576 mg/ml,30 株肺炎支原体突变株的 MIC 值为 0.036 ~ 1.152 mg/ml。15 株野生株及 30 株突变株在无黄柏提取物作用下 MPN421 mRNA 相对表达量分别为 0.079(0.071,0.089),0.083(0.062,0.084), $P > 0.05$;黄柏提取物作用 6 h 和 9 h 后,无论是野生株还是突变株的 MPN421 mRNA 相对表达量均显著下降(均 $P < 0.01$)。**结论** MP 野生株及突变株对黄柏提取物均敏感,其机制可能是降低 MP MPN421 mRNA 表达,对大环内酯类药物耐药 MP 感染有潜在治疗价值。

关键词: 黄柏;肺炎支原体;大环内酯类药物耐药

中图分类号: R375.2 R978.15 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2018)10-1702-04

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000464

The effect of Cortex Phellodendri extract on the macrolides-resistant *Mycoplasma pneumoniae*

ZHANG Wei-ying, ZHANG Yi, YU Dao-jun, et al

Department of Laboratory Medicine, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310006, China

Abstract: Objective To explore Cortex Phellodendri extract antibacterial activity against macrolides resistant *mycoplasma pneumoniae* (MP) in vitro, and to analyze its effect on the expression change of resistance gene MPN421 of MP.

Methods The 23S rRNA mutations of 45 clinical isolated MP strains were determined by real-time PCR which were related to macrolides resistant. In further, MICs of 45 MP strains for Cortex Phellodendri extract were tested by serial dilution method. The MPNA421 mRNA expression change was measured with real-time PCR before and after being effected by Cortex Phellodendri extract. **Results** From 45 clinical isolated strains, there were 30 strains detected 23 s rRNA mutations, no mutations were detected in the other 15 strains. The MICs of 15 wild-type MP strains were 0.036 - 0.576 mg/ml for Cortex Phellodendri extract; the MICs of 30 resistant strains were 0.036 - 1.152 mg/ml. Combined with the MICs of berberine hydrochloride for most of the common bacteria and fungi were in range of 0.5 - 1.0 mg/ml. The results showed that 45 strains of MP for Cortex Phellodendri extract all were sensitive. On the condition without Cortex Phellodendri extract effect, the relative expressions of MPN421 mRNA of 15 wild-type MP strains and 30 MP resistant strains were 0.079 (0.071, 0.089), 0.083 (0.062, 0.084), $P > 0.05$, respectively. After administration of Cortex Phellodendri extract for 6 hours or 9 hours, the relative expression of MPN421 mRNA of both wild-type strains and resistant strains were decreasing significantly (all $P < 0.01$). **Conclusion** Both wild-type MP strains and macrolides-resistant strains were sensitive to Cortex Phellodendri extract. Cortex Phellodendri extract could decrease the relative expression of MPN421 mRNA, which mean that it could be used in treatment of the macrolides-resistant MP strain infection.

Key words: Cortex Phellodendri; *Mycoplasma pneumoniae*; Macrolides Resistant

有关黄柏抗菌作用的研究,国内就有报道黄柏水提取物与抗菌药联用对产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠杆菌的抑制效果,为黄柏的综合开发利用提供了参考依据^[1]。黄柏提取物在体外对沙眼衣原体(Ct)具有显著抑制作用,在其 9 种提取物中,发挥抗 Ct 活性的主要成分为盐酸小檗碱^[2]。黄柏煎剂、水浸出液、乙醇浸出液对化脓性细菌抑菌作用强,特别是对金黄

色葡萄球菌、化脓性链球菌等阳性球菌有较强的菌株抑制作用^[3]。

此外,黄柏水提取物在体外牛支原体、鸡毒支原体及羊肺炎支原体(MP)有很好的体外抗菌作用,而且对 Vero 细胞毒性作用小^[4]。

以上研究表明黄柏对一些革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、衣原体、支原体都有一定的抑制作用。目前还没有单用黄柏抗人 MP 的研究,特别是针对耐大环内酯类抗生素 MP 的疗效以及相关作用分子机制。因此,在我们前期研究的基础上^[5],本研究用实时荧光

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2012ZA103, 2014-ZA079)

通信作者: 张艺, E-mail: fzhang03@126.com

PCR 鉴定 45 例 MP 临床分离株对大环内酯类药物耐药突变情况(23S rRNA 区域);体外药物敏感试验检测 45 株肺炎支原体对黄柏提取物的最小抑菌浓度(MIC);同时选取 MP 利用能量的重要转运蛋白之一(MPN421)作为研究靶点,通过检测黄柏提取物作用前后 MPN421 mRNA^[6]表达改变情况,以期初步阐述黄柏提取物抗 MP 的相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源 儿科疑似支原体感染患儿咽拭子标本采用实时荧光 PCR(广州中山大学达安基因股份有限公司)检测肺炎支原体 DNA,保留临床检测中 45 例 MP DNA 阳性标本,进行支原体分离培养和大环内酯类药物耐药突变检测。

1.2 MP 对大环内酯类药物耐药突变检测 45 例 MP DNA 阳性标本,针对抗大环内酯类抗生素耐药突变位点,即 23S rRNA 2063(A > G)和 2064(A > G)进行定性检测,试剂采用江苏默乐生物科技有限公司产品。

1.3 黄柏提取物体外敏感试验

1.3.1 菌株来源与药物 以上述临床检测 MP DNA 阳性的 45 例临床标本为研究对象,国际标准株 MP FH ATCC15531,购于首都医科大学儿科研究所;用醇提取的方法获取的黄柏提取物,成分以盐酸小檗碱为主(含量:18.524 1 mg/ml);SP4 液体培养基(SP4 Glucose Broth, Remel 公司, USA);96 孔聚乙烯板购自浙江拱东医用塑料厂。

1.3.2 菌株准备 将 45 例 MP DNA 阳性的咽拭子标本直接接种于 MP 液体培养基(珠海迪尔生物技术有限公司),按说明书进行分离培养;45 例临床分离株和标准菌株用 SP4 液体培养基按 10^5 浓度接种,37 °C 孵育 2 h 备用。

1.3.3 药物配置 参照文献^[7-10],盐酸小檗碱对目前常见细菌及真菌的 MIC 范围(0.5 ~ 1.0 mg/ml)。将黄柏提取物在试管内倍比稀释,终浓度分别为 0.140 ~ 18.520 mg/ml。

1.3.4 MIC 测定 按药物浓度梯度在 96 孔聚苯乙烯微量板中第 1 ~ 8 孔逐孔加入黄柏提取物 0.025 ml,再加入待测菌液 0.175 ml;第 9 孔加入含待测菌株的 SP4 培养基 0.2 ml 作为生长阳性对照;第 10 孔加入 SP4 培养基 0.2 ml 作为阴性对照。微量板孔中盐酸小檗碱终浓度为 0.018 ~ 2.315 mg/ml。每株菌平行 3 次试验。MP 标准株 FH 按上述方法加样。每孔滴入 1 滴石蜡油保湿,将培养板加盖密封,置 37 °C 培养 48 h 后观察结果:每株 MP 以变色的前一个药物浓度为读数点记录结果,阳性对照不变色或阴性对照变色均评价为无法判读。设三复孔读取平均值作为 MIC 最终值。

1.4 药物作用前后 MPN421 mRNA 表达改变

1.4.1 药物处理 在 96 孔聚苯乙烯微量板中第 1 ~ 8 孔逐孔加入黄柏提取物 0.025 ml,再加入待测菌液 0.175 ml;每孔加中等浓度黄柏提取物(1.158 mg/ml),使每孔终浓度为 0.144 mg/ml。第 9、10 孔加入含待测菌株的 SP4 培养基 0.2 ml,不加黄柏提取物。每孔滴入 1 滴石蜡油保湿,将培养板加盖密封,置 37 °C 分别培养 6、9 h。

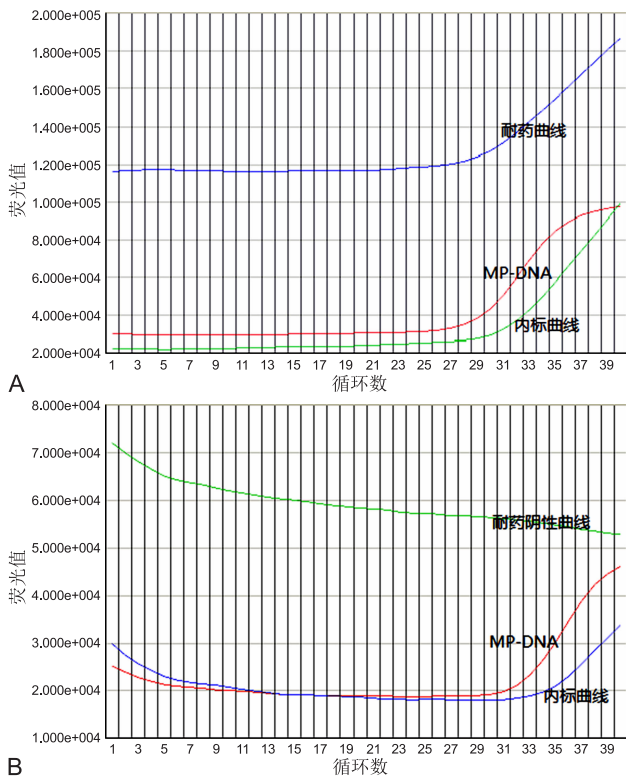
1.4.2 MP 总 RNA 提取 直接吸取培养板 0.2 ml 培养物加入 1 ml TRIzol(Introvigen, USA)裂解,用移液器吸打几次。将匀浆样品在室温(15 ~ 30 °C)放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离。每使用 1 ml TRIzol 加入 0.2 ml 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min。4 °C,12 000 × g 离心 15 min。样品分为 3 层:底层为黄色有机相,上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中,把水相转移到新管中,用异丙醇沉淀水相中的 RNA。每使用 1 ml TRIzol 加入 0.5 ml 异丙醇,室温放置 10 min。4 °C,10 000 × g,离心 10 min,离心前看不出 RNA 沉淀,离心后在管侧和管底出现胶状沉淀。移去上清。用 75% 乙醇(DEPC 水处理)洗涤 RNA 沉淀。每使用 1 ml TRIzol 至少加 1 ml 75% 乙醇。4 °C,不超过 7 500 × g 离心 5 min,弃上清。室温放置干燥 RNA 沉淀,大约晾 5 ~ 10 min 即可,加入 100 μl 无 RNase 的水,60 °C 放置 10 min 使 RNA 溶解,-80 °C 保存。

1.4.3 MPN421 mRNA 表达检测 以 GenBank:U00089.2 序列设计 MPN421 扩增引物,正向引物为 5'-ctggatgactgtctgtac-3',反向引物为 5'-tatgcctttattattggt-3';以 16S 核糖体 RNA 为内参照,正向引物为 5'-gtgaagttaacacattaa-3',反向引物为 5'-tccactgtgctgggtccc-3'。20 μl 的反应体系:2 × PCR 缓冲液 10.0 μl,正向引物 0.5 (10 mM),反向引物 0.5 (10 mM),RoxDye2 (50 ×) 0.5 μl,总 RNA 2.0 μl,ddH₂O 6.5 μl。反应条件:50 °C,30 min,95 °C 2 min,(95 °C 15 s,60 °C 45 s) 40 个循环,在 ABI 7500 PCR 仪上检测。用 $2^{-\Delta Ct}$ 来表示 MPN421 mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学方法 数据用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,MPN421 mRNA 相对表达量用中位数(四分位距)来表示,其组间差异用 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis H 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大环内酯类抗生素耐药突变检测结果 45 例 MP DNA 阳性咽拭子经实时荧光 PCR 鉴定,有 30 株检测出 MP 23S rRNA 突变,另 15 株未检测出。检测结果阴性、阳性曲线见图 1。



注:图1A为大环内酯类耐药突变阳性结果(30株);图1B为大环内酯类耐药突变阴性结果(15株)。

图1 实时荧光 PCR 检测 MP 大环内酯类抗生素耐药性突变

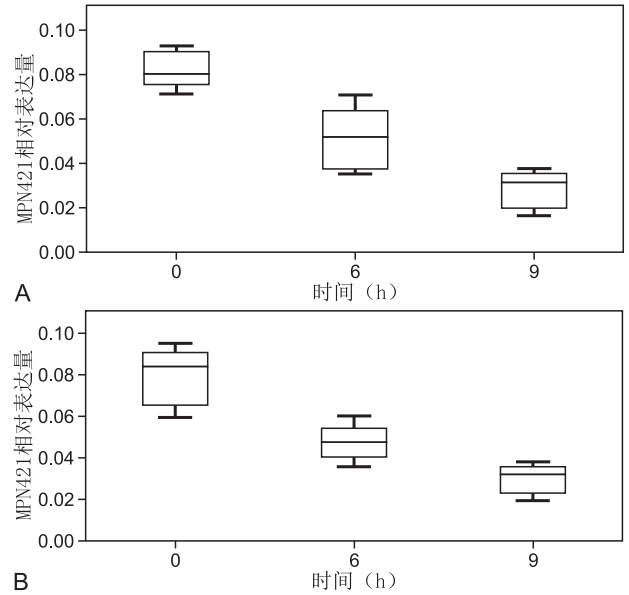
2.2 黄柏提取物体外敏感试验结果 15株MP野生株的MIC值为0.036~0.576 mg/ml,30株突变MP株的MIC值为0.036~1.152 mg/ml,标准株MP FH的MIC值为0.036 mg/ml;结合盐酸小檗碱对目前常见细菌及真菌的MIC基本上在0.5~1.0 mg/ml范围;结果表明本实验中15株野生及30株突变MP株对黄柏提取物均敏感。

2.3 黄柏提取物作用后MPN421 mRNA表达改变 15株野生及30株突变MP株在无黄柏提取物作用下(0 h)MPN421 mRNA相对表达量分别为0.079(0.071,0.089)、0.083(0.062,0.084),表达差异无统计学意义($Z=1.357, P=0.175$);在黄柏提取物作用6 h和9 h后,野生株MPN421 mRNA相对表达量分别0.051(0.038,0.064)、0.036(0.019,0.037),突变株相对表达量分别为0.048(0.039,0.057)、0.032(0.021,0.036),无论是野生株还是突变株在黄柏提取物作用0 h、6 h及9 h下MPN421 mRNA相对表达量均显著下降($H=10.142, P=0.003; H=11.418, P=0.002$),见图2。

3 讨论

近年来随着抗菌药物的广泛使用,MP对大环内酯类抗菌药物出现严重的耐药现象,其耐药机制主要大环内酯类抗生素作用靶位23S rRNA基因发生点突变^[11-13]。尽管MP对喹诺酮类药物较为敏感,但该类药物不能使用在儿童人群,因此目前临床上治疗儿童

MP感染主流药物是大环内酯类抗生素。有研究^[14-15]通过比较感染耐大环内酯类抗生素菌株和敏感菌株的患者平均发热天数,发现感染耐药株患者会持续更长的发热天数。因此,他们认为感染了耐药株有必要考虑用其他抗生素治疗。然而,在儿童用药选择方面目前则受到极大限制。



注:图2A为15株野生株MP株在黄柏提取物作用0、6、9 h下MPN421 mRNA相对表达量显著下降($P<0.01$);图2B为30株突变株MP株黄柏提取物作用0、6、9 h下MPN421 mRNA相对表达量显著下降($P<0.01$)。

图2 45株MP在黄柏提取物作用下MPN421 mRNA相对表达量

黄柏对一些革兰阳性球菌、革兰阴性杆菌、衣原体、支原体甚至病毒都有一定的抑制作用。我们采用醇提法黄柏提取物中盐酸小檗碱高达18.524 mg/ml^[5],并按盐酸小檗碱对常见微生物的MIC值来配制黄柏提取物系列浓度,在体外测定抗野生和突变MP临床分离株敏感性。结合盐酸小檗碱对目前常见细菌及真菌的MIC基本上在0.5~1.0 mg/ml范围,结果表明本实验中15株野生及30株突变MP株对黄柏提取物均敏感,提示黄柏提取物可能可以作为MP感染的有效药物,特别是可以针对耐大环内酯类抗菌药物MP菌株。

本研究选取MPN421作为黄柏提取物可能作用的靶点,MPN421作用是MP生长、繁殖所必需的甘油和磷脂的转运体^[6]。针对野生和突变株作用6 h和9 h后,经实时荧光PCR检测MP野生和突变株MPN421 mRNA表达均显著下调,提示MPN421可能是黄柏提取物抗MP的作用靶点之一,通过抑制甘油和磷脂的转运来实现抗菌作用。

综上所述,我们初步发现黄柏提取物无论对

野生还是突变 MP 株均具有明显抗菌作用,其主要有效成分为盐酸小檗碱,通过抑制 MP MPN421 mRNA 表达可能是其药理机制之一。

参考文献

- [1] 徐素萍,刘增援,吴永继,等. 黄柏水提物联合抗菌药对产 ESBLs 大肠杆菌的抑菌效果[J]. 南方农业学报,2016,47(3):500-505.
- [2] 李建红,黄敏,薛耀华,等. 大黄及黄柏提取物体外抗沙眼衣原体活性研究[J]. 中华中医药杂志,2015,30(8):2935-2938.
- [3] 杨磊,张延英,李卉,等. 黄柏煎剂的抗炎、抗菌作用研究[J]. 实验动物科学,2014,31(4):14-17.
- [4] 陈美安,甄汉深,裴渭静,等. 抗畜禽支原体中草药筛选及细胞毒性研究[J]. 动物医学进展,2014,35(4):33-38.
- [5] 韩淑萍,张卫英,余道军,等. 黄柏不同提取液中盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀的含量比较[J]. 浙江中医药大学学报,2013,37(7):905-908.
- [6] Großennig S, Schmidl SR, Schmeisky G, et al. Implication of glycerol and phospholipid transporters in *Mycoplasma pneumoniae* growth and virulence[J]. Infect Immun, 2013, 81(3):896-904.
- [7] 竺璐,胡丽华,徐新美. 盐酸小檗碱抗白念珠菌体外药敏实验研究[J]. 中华皮肤科杂志,2011,44(9):661-662.
- [8] 贾芳,杨江流,刘文慧. 两种生物碱联合氨苄西林对表皮葡萄球菌抗菌作用研究[J]. 宁夏大学学报(自然科学版),2014,35(4):362-365.
- [9] 刘仁红,肖毅,陈虹余,等. 盐酸小檗碱灌肠治疗小儿细菌性肠炎的临床应用[J]. 西部医学,2014,26(12):1635-1640.
- [10] 钟慈平,骞宇,舒畅,等. 小檗碱及其衍生物抑菌作用研究进展[J]. 食品科学,34(7):321-325.
- [11] Kim JH, Kim JY, Yoo CH, et al. Macrolide resistance and its impacts on *M. Pneumoniae* Pneumonia in children: comparison of two recent epidemics in Korea[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2017, 9(4):340-346.
- [12] Sugiyama H, Yoshida I, Ueki M, et al. In vitro antibacterial activity of α -methoxyimino acylide derivatives against macrolide-resistant pathogens and mutation analysis in 23S rRNA[J]. J Antibiot (Tokyo), 2017, 70(3):264-271.
- [13] Li S, Sun H, Liu F, et al. Two case reports: Whole genome sequencing of two clinical macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* isolates with different responses to azithromycin[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(38):e4963.
- [14] Pereyre S, Goret J, Bébéar C. *Mycoplasma pneumoniae*: Current knowledge on macrolide resistance and treatment[J]. Front Microbiol, 2016, 7:974.
- [15] Zheng X, Lee S, Selvarangan R, et al. Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae*, United States[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(8):1470-1472.

(本文编辑:季群)

收稿日期:2017-04-16

(上接第1628页)

定量 PCR 的方法检测基底细胞乳腺癌组织中 ADAM12L 蛋白和 mRNA 的表达量,结果发现 ADAM12L 在基底细胞样乳腺癌组织中的表达量显著高于良性纤维瘤和配对癌旁组织,且与患者的 TNM 分期和淋巴结转移状态密切相关,说明 ADAM12L 可能可以作为新的基底细胞样乳腺癌患者的个体化诊疗靶点。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [2] 辛灵,刘倩,徐玲,等. 乳腺癌基因检测与临床实践[J]. 中国实验外科杂志,2014,34(1):104-106.
- [3] Pareja F, Geyer FC, Marchio C, et al. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants[J]. NPJ Breast Cancer, 2016, 16(2):16036-16046.
- [4] Li Z, Wang Y, Kong L, et al. Expression of ADAM12 is regulated by E2F1 in small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2015, 34(6):3231-3237.
- [5] Cheon DJ, Li AJ, Beach JA, et al. ADAM12 is a prognostic factor associated with an aggressive molecular subtype of high-grade serous ovarian carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(7):739-747.
- [6] Duhachek-Muggy S, Qi Y, Wise R, et al. Metalloprotease-disintegrin ADAM12 actively promotes the stem cell-like phenotype in claudin-low breast cancer[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1):32.
- [7] Ma B, Ma QQ, Jin CH, et al. ADAM12 expression predicts clinical outcome in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10):13279-13283.
- [8] Reiss K, Bhakdi S. The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function[J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 11(6):2082-2087.
- [9] Walkiewicz K, Getek M, Muc-Wierzgon M, et al. The importance of ADAM family proteins in malignant tumors[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2016, 70(2):67-73.
- [10] Ruff M, Leyme A, Le Cann F, et al. The disintegrin and metalloprotease ADAM12 is associated with TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. PLoS One, 2015, 10(9):e139179.
- [11] Qi Y, Duhachek-Muggy S, Li H, et al. Abstract B43: ADAM12 is a novel regulator of stem-like cells in triple-negative breast cancer[J]. Cancer Research, 2016, 76(7):2054.
- [12] Qi Y, Duhachek-Muggy S, Li H, et al. Phenotypic diversity of breast cancer-related mutations in metalloproteinase-disintegrin ADAM12[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92536.
- [13] Li H, Duhachek-Muggy S, Dubnicka S, et al. Metalloproteinase-disintegrin ADAM12 is associated with a breast tumor-initiating cell phenotype[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 139(3):691-703.

(本文编辑:季群)

收稿日期:2017-12-14