

在黃連影響下痢疾桿菌的變異

王 守 良 藍 懋 功

(第七軍醫大學微生物學教研組)

黃連在體外對痢疾桿菌的抗菌作用,已有許多學者作了研究。實驗證明,黃連在低濃度時對痢疾桿菌具有抑制作用,在高濃度時具有殺死作用^[1-2]。臨床上用黃連來治療細菌性痢疾,已為許多學者採用。幾年來經過許多臨床家的實際運用,足以證明,黃連治療急性細菌性痢疾是有明顯效果的^[3]。

近年來,由於痢疾桿菌對磺胺藥、鏈霉素產生了一定程度的抗藥性^[4-5],使得該藥物的治療效果日趨減退^[6-7]。因此,正當黃連在臨床方面推廣應用的時候,我們還必須考慮到痢疾桿菌對黃連是否會產生抗藥性,以致影響到日後的治療效果。為此我們在試管中採用逐日微量誘導法,將痢疾桿菌培養在含有黃連的培養基內使其產生抗藥性,然後再來研究產生抗藥性的程度和性質。現將我們的初步實驗結果報導如下。

實驗材料和方法

材料

1. 黃連劑的製備: 黃連加水煮沸,在煮的過程中隨時添水。最後濃縮到每毫升中含 1 克之藥量。
2. 其他藥品: 如鏈霉素和氯霉素先配成原液,保存於 -15°C 低溫冰箱,使用前配成溶液,再以普通肉湯稀釋後應用。在磺胺藥物的試驗中,因肉湯蛋白胨能對抗磺胺藥的抑菌作用^[8],我們採用了張學德介紹的不含蛋白胨的培養基,效果頗為滿意。
3. 抗藥菌株的製備: 將在本教研室保存的生化反應和血清反應典型的四種痢疾桿菌(志賀氏、宋內氏、福氏和斯氏),分別接種在 1:1500 濃度的黃連肉湯(pH 7.6)內,在 37°C 孵育 24 小時,取該培養物二白金耳接種在同樣濃度的黃連肉湯內。如此共適應 5 代,每代培養 24 小時。再取上述黃連肉湯內適應的第 5 代培養物二白金耳接種在 1:1000 濃度

表 I 四種痢疾桿菌在各種濃度黃連肉湯內的適應情況

黃連濃度/適應代數 生長情況 菌 種	1:1500	1:1000	1:800	1:600	1:400	1:200	1:100	1:50	1:25
	第 5 代	第 10 代	第 15 代	第 20 代	第 25 代	第 30 代	第 35 代	第 40 代	第 45 代
志賀氏痢疾菌	+	+	+	+	+	-	-	-	-
宋內氏痢疾菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-
福氏痢疾菌	+	+	+	+	+	+	+	+	-
斯氏痢疾菌	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1957 年 8 月 13 日收到。

的黃連肉湯內進行適應，在該培養基內適應 5 代。以後，照表 1 的進程進行連續的適應。

從表 1 可看出，四種痢疾桿菌在黃連培養基內適應的情況是不一致的，志賀氏菌的適應能力最差，在 1:200 濃度黃連肉湯內不能生長。福氏和斯氏痢疾菌的適應能力最強，在 1:50 濃度黃連肉湯內仍能生長。全部菌種在 1:25 濃度黃連肉湯內均不能生長。我們為了對四種痢疾菌之耐藥性作一比較，故在下列試驗中除了 1:1500 及 1:200 以下的黃連肉湯培養物以外，由各種濃度的黃連肉湯中，各取出最末 1 代的培養物進行耐藥性試驗。

實驗方法

1. 對黃連耐藥性的測定：取一系列無菌試管，用肉湯稀釋黃連，每排第 1 管的濃度均為 1:10，第 11 管的濃度為 1:10240，最後 1 管不加黃連作對照。然後將每毫升含約 3 億的菌液 0.05 毫升分別加入各管中，搖勻後置 37°C 孵箱中，24 小時後觀察結果。

2. 對小蘗鹼 (Berberine) 的耐藥性試驗：秤取小蘗鹼少許溶解於肉湯內，使其每毫升肉湯中含 10,000 微克、5000 微克、1000 微克、500 微克、100 微克、10 微克和 1 微克。以上法接種細菌，在 37°C 孵育 24 小時觀察結果。

3. 對鏈霉素、氯霉素和磺胺藥的敏感試驗：將四種痢疾桿菌的原始株和黃連耐藥株 (第 25 代) 分別測定它們對鏈霉素、氯霉素和磺胺藥的敏感程度，方法為一般實驗室常用的試管法。

實驗結果

(一) 對黃連耐藥性的測定 經 24 小時孵育後，有抑菌者肉湯呈澄清透明，有耐藥者則呈混濁，其結果如圖 1。

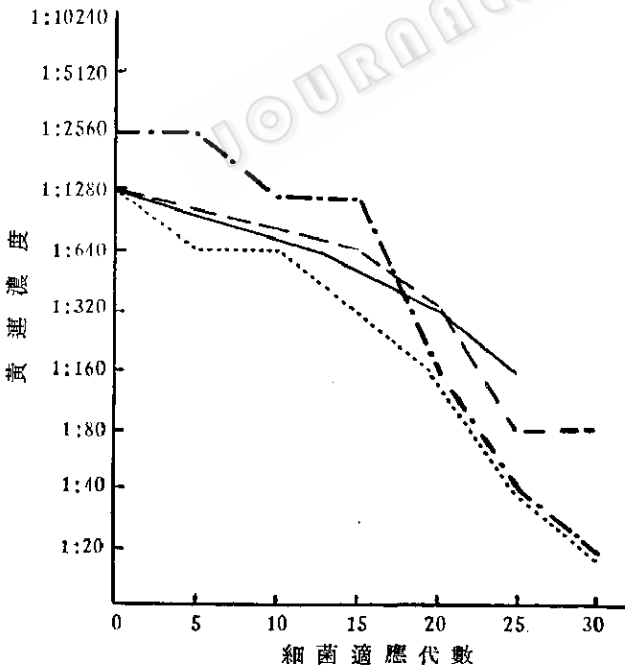


圖 1 試管法測定痢疾桿菌對黃連的敏感度

—— 志賀氏痢疾桿菌 - - - 宋內氏痢疾桿菌
- · - 斯氏痢疾桿菌 ····· 福氏痢疾桿菌

由圖 1 表明，黃連對痢疾桿菌原始株具有很強的抑菌作用，其中對斯氏痢疾菌作用最強，稀釋至 1:2560 仍能抑制其生長。但黃連對於抗藥菌株的抑制作用有明顯的降低，一般稀釋至 1:320—640 細菌都能生長。其中以斯氏和福氏痢疾菌耐藥性最強，甚至在 1:40 的濃度下仍能生長。新近由患者分離出 5 株福氏痢疾桿菌，經適應 15 代後，抗藥性就有明顯的產生，在 1:40 濃度的黃連肉湯內均能生長。此外可以看出細菌對黃連產生抗藥的程度是與細菌適應代數的多寡有密切關係。

此外也已經證明，對黃連有耐藥性的菌株，同樣能對小蘗鹼產生很強的抵抗力。測知痢疾桿菌原始

株對小蘗鹼的敏感度 100—500 微克/毫升，在 1000 微克/毫升的濃度下均不能生長，但對黃連有耐藥性的菌株，在 5000 或 10,000 微克/毫升小蘗鹼的濃度下均能生長。

(二) 對鏈霉素、氯霉素和磺胺藥的敏感試驗

實驗中對四種痢疾桿菌的原始株和對黃連耐藥株(第 25 代)分別測定它們對鏈霉素、氯霉素和磺胺噻唑的敏感性。結果除了耐藥性的志賀氏菌對鏈霉素和宋內氏菌對磺胺噻唑的敏感度略有降低以外，其餘菌株對藥物的敏感度與原始菌株沒有差別。由此說明了對黃連產生耐藥的菌株對其他抗生素和化學藥品未必同時能產生耐藥性。

(三) 耐藥菌形態和菌落的改變

將已經黃連肉湯適應之 5、10、15、20、25 代之志賀氏、斯氏、宋內氏和福氏痢疾桿菌分別接種於普通瓊脂平板上，經 37°C 20 小時培養後進行觀察菌落生長的情況，並以白金耳挑菌落少許作革蘭氏染色，其結果如表 2。

表 2 四種痢疾桿菌經黃連肉湯適應不同代數之菌落形態之變化

適應代數		1	5	10	15	20	25	30	35	40
肉湯中黃連濃度		0	1/1500	1/1000	1/800	1/600	1/400	1/200	1/100	1/50
痢疾桿菌	志賀氏	+	△	△	△	△	△	-	-	-
	宋內氏	+	△	△	△	△	△	△	△	-
	斯氏	+	△	△	△	△	△	△	△	△
	福氏	+	△	△	△	△	△	△	△	△

註解：+：在普通瓊脂平板上菌落細小，圓形邊緣整齊，表面光滑、濕潤，灰白色、半透明，塗片染色為革蘭氏陰性，短小桿菌；
 △：代表意義同上，但有少數菌落略變大，表面粗糙，邊緣不整齊，細菌染色形態無改變；
 △：菌落變大，表面粗糙，邊緣不整齊，菌落稍帶淺黃色，細菌形態無特殊改變；
 △：代表意義同上，細菌變粗或變細長，有的呈顆粒狀，形態極不規則；
 -：無細菌生長。

從表 2 中看出，四種痢疾桿菌在黃連肉湯內適應五代後，菌落即開始增大，變粗糙；志賀氏菌改變稍慢。細菌形態一般在 15 代後開始變粗，變細長或呈顆粒狀，形態極不規則。(圖 2 a, b)

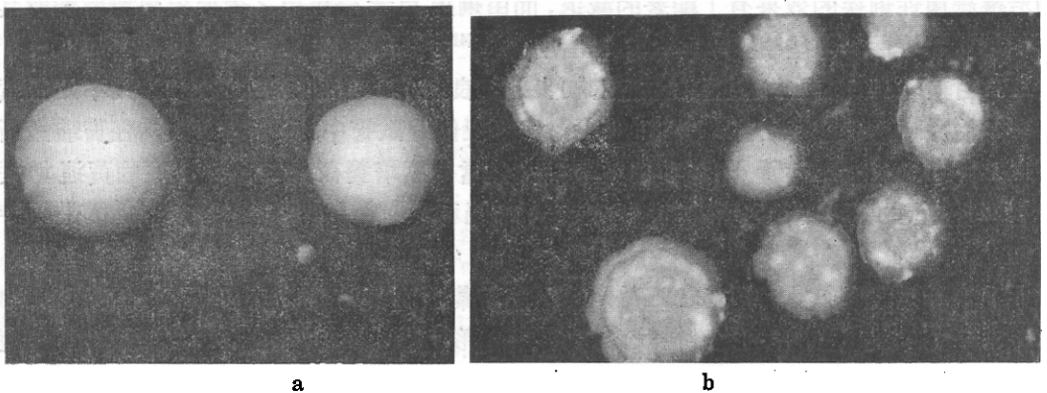


圖 2 a, 志賀氏原始株； b, 志賀氏抗藥株。

(四) 生化性質的改變

按照程氏^[1]對痢疾桿菌的檢定方法,作了主要生化反應試驗。將四種痢疾桿菌原始株和抗藥株(第25代)分別種入各種單糖發酵管,包括葡萄糖、乳糖、麥芽糖、甘露醇、蔗糖、阿拉伯膠糖、鼠李糖、山梨醇、衛矛醇、木膠糖、肌醇、側金盞花醇、水楊素、蕈糖、醋酸鋁、尿素及枸橼酸鹽培養基,以蛋白胨水作鹼基質和動力檢查。上述培養基都放 37°C 每天觀察,糖發酵共觀察 14 天。實驗結果證明耐藥菌株分解糖的能力與原始菌株沒有區別。

(五) 抗原性的變動

我們選用了黃連 25 代耐藥菌株,用本教研室所製備的免疫血清,用試管凝集法測定其凝集效價。(惟在製作抗藥菌株的抗原時,由於菌落變粗糙而不易使成均勻懸液,所以做成菌液後,曾放冰箱過夜,讓其塊狀物自然沉降,次日棄去沉澱,再進行比濁矯正其菌液濃度。)結果四種痢疾桿菌原始株與抗藥株之凝集效價基本上無差別,但耐藥株之凝集效價似乎要增高一管。

(四) 對小白鼠毒力的變動

對小白鼠毒力之測定,祇選擇了志賀氏與宋內氏二種痢疾耐藥菌株(第25代)來和原始菌株作比較,觀察其毒力有無改變。試驗方法先將該菌接種於普通瓊脂斜面,經 37°C 20 小時孵育,以白金耳輕輕刮取斜面上之菌苔,用分析天秤稱取一定重量之細菌。然後用生理鹽水作成每毫升內含 1 克之菌量,再稀釋成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 等 5 個稀釋度,然後每個稀釋度以 0.3 毫升經腹腔注入 5 只體重 12—15 克之小白鼠,注射後觀察一週。動物感染後,呈現一般中毒症狀,大多數於 72 小時內死亡,從毒力測定來看,抗藥株比原始株的毒力稍低一些。

討 論

遠在 1887 年蘇聯學者 M. Г. Косьяков 氏^[10]首先指出,細菌對殺菌物質有着適應的能力。這現象完全為光輝的米丘林生物科學理論所證實。有機體必須與它的生活環境求得統一。

許多學者們,包括 И. М. Беркович 氏、Е. Д. Беляева 氏等^[11]均已證明,磺胺藥物治療細菌性痢疾的效果有了顯著的減退,而由痢疾患者分離出之痢疾桿菌對磺胺藥具有明顯的抵抗力。這些事實也被我國學者所證實^[4]。

從目前來看,黃連治療細菌性痢疾,初步效果良好,但我們必須注意,當使用不足量黃連進行治療時,是否同樣會產生抗藥性呢?根據我們的試管中實驗證明,無論在實驗室所保存的或者新近從患者所分離出來的痢疾桿菌,當長期培養在含有遞增濃度的黃連培養基內,均能產生明顯的耐藥性。至於在黃連治療過程中細菌是否產生耐藥性,尚需進一步的研究。

將適應於黃連肉湯培養基之四種痢疾桿菌耐藥菌株,進行了細菌形態和菌落變異的觀察。結果菌落變異現象的獲得較容易,而細菌形態的變異尚須要適應多次以後才能獲得,可見菌落之變異與細菌形態之變異不是平行的。

細菌抗藥性的形成常伴隨着綜合機能的變異,此種特性的存在是有賴於藥物性質而

異^[12]。А. Ф. Мороз 氏^[13]也發現腸道細菌對 Грезмин 抗藥後，志賀氏、福氏痢疾桿菌失去了分解葡萄糖的能力，並產生了硫化氫。相反地 Ю. С. Нобоков 氏^[14]研究了宋內氏、福氏痢疾桿菌在合霉素、左旋霉素、鏈霉素、生霉素等連續轉種 30 代，其生化性質並無變動。在我們的實驗中對黃連抗藥的四種痢疾菌株所進行的全面生化反應結果看來其分解糖的能力也無明顯變動。

關於耐藥菌株毒力變異的問題，目前許多學者見解不一致，M. Барбер 氏^[12]報告，用人工形成的葡萄球菌株（青霉素）對小白鼠的毒力較降低。但對鏈霉素耐藥之結核桿菌，毒力仍然保持。Т. А. Свирибова^[15] 氏報告了在鏈霉素作用下所獲得的耐藥性傷寒和副傷寒菌株，其生化性質及抗原性保持，而毒力極其微弱。在我們所進行的試驗中耐藥株比原始株毒力略為減低。

總 結

1. 當痢疾桿菌長期培養在含遞增濃度的黃連培養基內，細菌能對黃連產生明顯的抵抗力。這種抵抗性能減弱或延遲黃連對它們的殺菌濃度和殺菌時間。
2. 對黃連已產生了耐藥性的細菌，對鏈霉素、氯霉素和磺胺藥的敏感性看不出有所改變。
3. 痢疾桿菌對小藥鹼的敏感度一般在 100—1000 微克/毫升，但對黃連產生了耐藥性的細菌，對小藥鹼的敏感性也有明顯降低。
4. 痢疾桿菌經黃連肉湯適應 5 代後，菌落開始由光滑型變為粗糙型，較原始菌株的菌落大而扁平；細菌形態之改變較為遲緩，經轉種 15 代後，菌體變粗大或細長，有的呈顆粒狀，形狀極不規則。這些細菌之菌落和細菌形態之變異不是同時發生的。
5. 耐藥菌株對單糖的發酵能力未有變動，在抗原性方面，未改變其原有與相應抗血清凝集的特性。因此，經黃連作用之抗藥菌株的糖發酵能力和抗原性仍屬穩定。
6. 對黃連產生耐藥的志賀氏及宋內氏痢疾桿菌，對小白鼠毒力稍有減弱的趨勢。

（小藥鹼為本校藥理教研室贈給，特此致謝）

參 考 文 獻

- [1] 王守良：上海中醫藥雜誌，12：30，1956。
- [2] 詹湧泉：中華醫學雜誌，34：399，1948。
- [3] 金荷文等：人民軍醫，9：41，1956。
- [4] 陳鴻珊：微生物學報，3（2）：151，1955。
- [5] McFadzean, A. J. S. et al.: *Lancet*, 2: 166, 1952.
- [6] 張洲雲、蘇祖斐：中華兒科雜誌，（2）：67，1950。
- [7] 張彩英等：中華兒科雜誌，（1）：40，1953。
- [8] MacLeod, C. M. & Mirick, G. S.: *J. Bact.*, 44: 3, 1942.
- [9] 程知義：中國人民解放軍醫學科學院院刊，（2）：188，1956。
- [10] Г. Ф. Гаузе：Лекции по антибиотикам, стр. 209—220, 1953.
- [11] Д. Г. Кудлай：Именчивость микробов кишечной группы. стр. 50—51, 1954.
- [12] М. Барбер：Ж. М. Э. И., (9)：71—82, 1955.
- [13] А. Ф. Мороз：Ж. М. Э. И., (3)：84—90, 1956.
- [14] Ю. С. Набоков：Ж. М. Э. И., (1)：20—24, 1957.
- [15] Т. А. Свирибова：腸道傳染免疫問題，261—268, 1955.

VARIATION OF DYSENTERY BACILLI UNDER THE INFLUENCE OF COPTIS ROOT INFUSION

WANG, S. L. and LAN, M. K.

(Department of Bacteriology, Army Medical College, Chungking)

As infusion of coptis root is becoming more and more frequently employed in the clinical management of bacillary dysentery, it is considered important to study the possible effect of the drug on the variation of dysentery organisms. It has been found by the authors in in-vitro experiments, that under the action of suitable amounts of coptis root infusion, for prolonged periods of time, resistant forms were produced. These showed a change in morphology and in colony appearance, but little change in biochemical activity and antigenic structure, as determined by serological means. The resistant forms also failed to show any change in sensitivity to streptomycin, chloromycetin and sulfanamides.