

# 大肠埃希氏菌在人工培育羊黄试验中的应用

王南志 付达美 刘衡川\* 刘军\*

(四川省宜宾地区防疫站)

**摘要** 本文应用驯化的埃希氏肠杆菌注入羊胆囊,引起胆囊发炎,分泌物增多,在细菌酶的作用下,胆汁中游离胆红素和胆汁中钙可形成结石-羊黄的方法。半年后平均每只羊可产羊黄0.97g。其药用价值经鉴定与牛黄相似。

**关键词** 羊黄;大肠杆菌;驯化

羊黄原载于《陆川本草》,后被中药大辞典收录,为牛科动物山羊的胆结石。其性味苦、平、有小毒,作用可代牛黄使用。有泻热,利痰、通窍、镇惊等作用。目前尚少见有人研究人工羊黄的试验。因此,人工培育羊黄对于开发新药源,缓和贵重药材牛黄的紧缺状况有重要意义。

据胆囊结石的成因,感染学说认为:当大肠杆菌在胆囊内感染繁殖后,可引起胆壁发炎水肿,分泌物增多,大肠杆菌产生的 $\beta$ -葡萄糖醛酸酯( $\beta$ -G),可把胆汁中原来结合的胆红素(CB)水解为游离胆红素(UCB)。后者与胆汁中钙结合成胆红素钙,形成小颗粒沉淀淤积而成结石<sup>[1,2]</sup>。为使大肠杆菌能长期存活繁殖于羊胆囊内,引起胆壁炎症,造成病理模型而形成人工羊黄。我们进行了大肠杆菌的驯化及应用于产羊黄的研究。

## 材料与方 法

### (一) 菌株及其来源

大肠杆菌A株:从正常人粪便中分离到。  
B株:从正常猪的粪便中分离到。C株:从人工培育牛黄的胆汁中分离得到。

### (二) 培养基

1. 基础培养基:  $K_2HPO_4$  4.5g,  $KH_2PO_4$  1.5g, NaCl 4.5g, 牛肉膏 1.5g, 蛋白胨 10g, 蒸馏水 1000ml。

2. 特殊培养基:在基础培养基内分别加入10、20、30、40、50和60%的羊胆盐,配制成

不同盐浓度的羊胆盐肉汤。再加2%琼脂即成羊胆盐固体培养基,1kg/cm<sup>2</sup>灭菌20分钟备用。

3. 远腾氏、伊红美蓝琼脂:上海市医学化学所生产。

4. 保存肠杆菌半固体培养基:按《肠杆菌科的鉴定》手册配制。

### (三) 分离培养

将大肠埃希氏菌的A、B、C三种来源的菌标本分别划线于远腾氏和伊红美蓝琼脂平板,置40℃培养24小时。挑取典型大肠杆菌菌落,进行革兰氏染色镜检和生化试验,将其结果符合埃希氏肠杆菌的菌株,分别转种在保存肠杆菌的培养基内备用。

### (四) 菌的驯化培养

将已鉴定为埃希氏肠杆菌的菌株,分别转入10%的羊胆盐肉汤培养基,40℃培养24小时。如果培养基出现混浊,说明细菌已生长繁殖,可用含相应胆盐浓度的固体琼脂平板作划线分离培养。然后挑取生长良好的菌落,再转种入20%羊胆盐肉汤培养基培养。如此逐渐提高胆盐浓度。经反复传代,挑选能在含60%羊胆盐的肉汤中生长的菌落,再把该菌加到新鲜羊胆汁中进行模拟耐受试验,即为驯化菌种。临用前一天,用普通肉汤培菌培养15—18小时,然后再用于培育羊黄试验。

### (五) 羊黄培育试验

\* 现工作单位:华西医科大学。

试验选用2岁左右的健康山羊,按常规手术方法,在胆囊内埋入直径2cm的无毒塑料网状球形核心,外包粗布,再注入3ml驯化菌液,缝合伤口,按常规饲养方法饲养。

## 结 果

### (一) 驯化与未驯化的大肠杆菌在羊胆汁中存活时间的比较

3种不同来源的菌株,经反复筛选驯化,均能在新鲜的纯羊胆汁中长时间存活繁殖。而同一菌株未经驯化,却只能在该胆汁内存活5天左右,结果见表1。

表1 3种来源菌株在羊胆汁中存活时间

存活时间(d)	A菌株		B菌株		C菌株	
	驯化	未驯化	驯化	未驯化	驯化	未驯化
5	+	+	+	+	+	+
10	+	-	+	-	+	+
20	+	-	+	-	+	+
40	+	-	+	-	+	+
80	+	-	+	-	+	-

“+”存活 “-”死亡

从表1的结果看出, C菌株虽是从牛胆汁中分离得到,但未经羊胆盐驯化的,仍不能长时间存活于羊胆汁内。说明菌株的驯化筛选是羊黄试验获得成功的重要因素之一。

### (二) 不同来源的大肠杆菌对产羊黄量的影响

为了弄清不同来源的菌株对产羊黄量有无影响,把36只山羊随机分为3组,每组12只。手术埋核心后,分别注入A、B、C三种来源菌株的驯化菌液,在同样条件下饲养半年。宰杀后,各组取羊黄量(指干重)平均为: A组产黄量13.24g, B组为10.72g, C组为12.24g。各组每只羊的产黄量即A组: 1.10g(13.24/12); B组: 0.89g(10.72/12); C组: 1.02g(12.24/12)。方差分析 $P > 0.05$ 。说明3种来源的大肠杆菌产羊黄量无显著差异。证实不同来源的菌株经驯化后,其生理生化特性和对羊胆汁的耐受力是可以达到一致的。

### (三) 加菌与未加菌对产羊黄量的影响

为了进一步证实大肠杆菌在羊黄形成中的作用。把30只羊分成2组作对比实验,实验组手术埋核心后,胆囊内注入3ml驯化菌液。对照组同样手术埋核心,但不注入驯化菌液。缝合伤口后,在同样条件下饲养半年。宰杀后,实验组取羊黄量为14.70g,对照组为6.75g。各组每只羊的产羊黄量(平均值);实验组为0.98g(14.70/15);对照组为0.45g(6.75/15)。经统计学处理两组差异显著, $P < 0.05$ 。说明胆囊内仅有球形核心,虽然可以造成炎症,使可溶性胆汁变成固体沉淀和被吸附,但形成结石的量是有限的。这时如有驯化大肠杆菌存在,它不但可以引起胆囊内炎性水肿,分泌物增多,还可以起到分解结合胆红素的催化作用,达到提高羊黄产量的目的。

通过对1000只羊的现场实验观察。手术后半宰杀取黄时,平均每只羊的产黄量在0.5g以下的占20%, 0.5—1g的占50.6%, 1—2g的占25.3%, 2—3g的占3.1%, 3g以上占1%。

## 讨 论

试验证明,经羊胆盐驯化培养的大肠杆菌能长时间存活于羊胆囊内,并改变胆汁的理化性质,使胆囊壁增厚,形成羊黄的病理模型。我们采用驯化的非致病性大肠杆菌注入羊胆囊内,不影响羊的正常生长、发育、繁殖。在良好的饲养条件下,平均每只羊产干羊黄0.97g,产羊黄量高者可达3.68g,最低者为0.25g,两者相差较大,主要与饲养条件和羊体健壮程度有关。饲养条件好,膘肥健壮的羊产羊黄量就高。

胆囊内放置塑料网状核心,有利于胆汁淤滞,当胆汁浓缩时,可使pH下降,有利于胆红素钙和碳酸钙沉淀而加快羊黄的形成。手术时应根据羊胆囊的大小选择合适的网状核心。

为证实经驯化后的大肠杆菌在羊胆囊内能长期存活,我们把取羊黄时分离出的菌株与手术时加入的菌种进行细菌的同源性试验,结果证明是同一细菌。

人工培育羊黄比人工培育牛黄的方法更易于推广,所获羊黄的药理化学性质经鉴定与牛

黄相似。一只羊如产羊黄 1—2g 可增加约 1/4 至 1/2 的经济价值，对开发农村经济将起到很好的促进作用。

参 考 文 献

1. Womack NA et al.: Ann Surg, 157 (5): 670, 1963.
2. Rege RV: Gastroenterology, 92:281, 1987.