

关于胆囊结石、胆囊结石合并胆总管结石、胆总管结石抗生素抗性基因的初步研究

杨晨瑞¹ 李君剑² 张燕忠^{3,*}

(1 山西医科大学, 太原 030001; 2 山西大学, 太原 030001; 3 山西医科大学附属人民医院, 太原 030001)

摘要: **目的** 了解抗生素抗性基因在胆石病患者中的分布状况, 为临床合理使用抗生素提供理论依据。 **方法** 收集胆囊结石 30 例、胆囊结石合并胆总管结石 30 例、胆总管结石 30 例, 对采集到的标本进行细菌基因组的提取, 并采用 qPCR 的方法对提取的基因组进行检测。 **结果** 在检测到的 ARGs 中, 胆囊结石患者 β -内酰胺类抗生素抗性基因占的比例最低为 5.92%, 检测到的基因有 8 种, *strB* 基因检出率最高, 为 27.1%。*bla*_{TEM}、*cfxA*、*aacc*、*aadD*、*aadA1*、*tetX* 和 *sull* 的检出率分别为 13.9%、5.1%、5.1%、7.7%、20.7%、4.6% 和 15.6%。胆囊结石合并胆总管结石患者 β -内酰胺类抗生素抗性基因占的比例最低为 12.94%, 检测到的基因有 15 种, *sull* 基因检出率最高, 为 17.1%。*bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*ampC-01*、*ampC/bla*_{DHA}、*bla*_{ACC-1}、*bla*_{GES}、*cfxA*、*aac*、*aacc*、*aadA1*、*strB* 和 *tetX* 的检出率分别为 3.2%、9.4%、4.4%、3.4%、8.9%、4.2%、2.8%、2.5%、8.2%、3.9%、8.1%、6.2%、8.2% 和 9.4%。胆总管结石患者氨基糖苷类抗生素抗性基因占的比例最低为 17.34%, 检测到的基因有 16 种, *bla*_{TEM} 基因检出率最高, 为 9.1%。*bla*_{CTX-M}、*bla*_{SHV}、*ampC-01*、*ampC/bla*_{DHA}、*bla*_{ACC-1}、*bla*_{CMY}、*bla*_{GES}、*cfxA*、*aac*、*aacc*、*aadA1*、*strB*、*tetX* 和 *sull* 的检出率分别为 7.3%、6.5%、7.6%、5.4%、5.6%、3.3%、6.4%、4.0%、4.5%、4.7%、6.9%、6.1%、6.0%、7.8% 和 8.9%。*bla*_{CMY} 只在胆总管结石被检测到, *aadD* 只在胆囊结石中被检测到。 **结论** ARGs 不仅广泛存在于公共环境中, 也存在于人体胆道系统中; 同时, 在胆道系统中, 胆总管结石携带 ARGs 最多, 胆囊结石合并胆总管结石次之, 胆囊结石携带的 ARGs 最少; 胆囊结石患者和胆囊结石合并胆总管结石患者中 β -内酰胺类抗生素抗性基因含量最低; 胆总管结石患者中氨基糖苷类抗生素抗性基因含量最低。这些发现可以为胆石病患者在抗生素的选择上提供理论依据。

关键词: 胆囊结石; 胆囊结石合并胆总管结石; 胆总管结石; 抗生素抗性基因

中图分类号: R978 **文献标志码:** A

Preliminary study on antibiotic-resistance genes of bacteria in patients with gallbladder calculi, gallbladder calculi combined with common bile duct calculi, and common bile duct calculi

Yang Chen-rui¹, Li Jun-jian² and Zhang Yan-zhong³

(1 Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; 2 Shanxi University, Taiyuan 030001; 3 People's Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

Abstract Objective To understand the distribution of antibiotic resistance genes in patients with cholelithiasis and provide theoretical basis for rational use of antibiotics in clinic. **Methods** 30 cases of gallbladder stones, 30 cases of gallbladder stones combined with choledocholithiasis and 30 cases of choledocholithiasis were collected. The bacterial genomes were extracted from collected specimens, and the extracted genomes were detected by PCR.

收稿日期: 2018-12-24

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 41271530)

作者简介: 杨晨瑞, 男, 生于 1990 年, 在读硕士研究生, 主要从事肝胆方向细菌耐药性的研究, E-mail: 807446563@qq.com

* 通讯作者, E-mail: understand0101@126.com

Results Among all detected ARGs, 5.92% of the patients with gallbladder stones had the lowest proportion of bacteria with antibiotic-resistance genes to beta-lactam. There were eight antibiotic-resistance genes of bacteria in patients with gallstone stone, and the detection rate of *strB* gene was the highest, 27.1%. The detection rates of *bla*_{TEM}, *cfxA*, *aacc*, *aadD*, *aadA1*, *tetX* and *sull* were 13.9%, 5.1%, 5.1%, 7.7%, 20.7%, 4.6% and 15.6% respectively. Bacteria in 12.94% of the patients with gallbladder stones complicated with choledocholithiasis had the lowest proportion of antibiotic-resistance genes to beta-lactam. There were 15 antibiotic-resistance genes of bacteria in patients with gallstone complicated with choledocholithiasis, and the detection rate of *sull* gene was the highest, 17.1%. The detection rates of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *ampC-01*, *ampC/bla*_{DHA}, *bla*_{-ACC-1}, *bla*_{GES}, *cfxA*, *aac*, *aacc*, *aadA1*, *strB*, and *tetX* were 3.2%, 9.4%, 4.4%, 3.4%, 8.9%, 4.2%, 2.8%, 2.5%, 8.2%, 3.9%, 8.1%, 6.2%, 8.2%, 8.2%, and 9.4% respectively. The lowest proportion of aminoglycoside antibiotic resistance genes in patients with choledocholithiasis was 17.34%. There were 16 types of choledocholithiasis genes, with the highest detection rate of *bla*_{TEM} gene, 9.1%. The detection rates of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *ampC-01*, *ampC/bla*_{DHA}, *bla*_{-ACC-1}, *bla*_{CMY}, *bla*_{GES}, *cfxA*, *aac*, *aacc*, *aadA1*, *strB*, *tetX*, and *sull* were 7.3%, 6.5%, 7.6%, 5.4%, 5.6%, 4.0%, 4.0%, 4.5%, 4.7%, 6.9%, 6.9%, 6.1%, 6.0%, 7.8% and 8.9%, respectively. The gene *bla*_{CMY} was only detected in patients with choledocholithiasis, and *aadD* was only detected in patients with gallbladder stone. **Conclusion** Antibiotic-resistance genes (ARGs) exist not only in the public environment, but also in the human biliary tract system. At the same time, in the biliary tract system, common bile duct stones carry the most ARGs, followed by common bile duct stones combined with gallbladder stones, and gallbladder stones carry the least ARGs. It was found that the lowest level of beta-lactam antibiotic-resistance genes was found in patients with gallbladder stones and common bile duct stones combined with gallbladder stones, and the lowest level of aminoglycoside antibiotic-resistance genes was found in patients with common bile duct stones. These findings can provide a theoretical basis for the selection of antibiotics in patients with cholelithiasis.

Key words Gallstone; Gallstone combined with choledocholithiasis; Choledocholithiasis; Antibiotic resistance genes

近年来, 由于抗生素的滥用而导致大量耐药性致病菌的出现引起了人们广泛关注, 抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 作为细菌耐药性的主要原因常被作为研究对象。目前, 公认的 ARGs 的主要作用机制可以包括以下几种: ①调节细菌细胞壁发生渗透性改变, 从而限制抗生素与靶位相结合; ②编码产生外排泵将抗生素主动排除菌体细胞外; ③对抗生素进行酶修饰; ④编码产生的蛋白酶直接降解抗生素; ⑤使菌体产生代谢旁路, 使抗生素对菌体新陈代谢的抑制作用失效; ⑥调节修饰抗生素的作用靶位; ⑦调节抗生素作用靶位的合成水平, 使靶位相对“过剩”; ⑧形成生物膜^[1-2]。并且, 由于 ARGs 兼具“可复制或传播”的生物特性和“不易消亡或环境持久”的物理化学特性, ARGs 在生物体内可长久而持续地传播, 即使携带 ARGs 的细菌被人体免疫系统杀灭或消亡, 但它释放到环境中的 DNA 与黏土、矿物质和腐殖质物质相结合时, 将逃脱核酸酶的降解, 在环境中存留的时间更长^[3], 并可能通过直接接触或污染食物链等多种途径进入人体, 增加了人类治愈细菌感染性疾病的风险, 严重威胁人类健康^[4-5]。

胆石病 (cholelithiasis) 包括胆囊和胆管的结石, 是常见病和多发病。随着人民生活水平的提高, 我国胆石病的种类和发病率也出现了很大变化。目前,

我国胆囊结石的发病率已达 10%^[6], 国外文献报道 9.2%~33.0% 的胆囊结石患者中存在胆总管结石^[7], 腹腔镜胆囊切除后又并发胆总管结石的总体发生率维持在 3%~10% 之间^[8]。目前, 胆囊结石以腹腔镜胆囊切除为主, 胆囊结石合并胆总管结石以 (胆囊切除 + 胆道切开探查 + T 管引流术) 为主, 胆总管结石以开腹胆总管取石 T 管引流术为主, 而胆道手术后最严重的并发症之一就是感染^[9]。常常引起临床急症, 是一种潜在的威胁生命的疾病。并且由于手术位置及生理的特殊性, 容易产生耐药菌株, 使如何为手术后患者选择合理有效的抗生素治疗成为一个难题。因此, 了解人体内 ARGs 的携带状况, 可以对临床工作中合理选择抗生素提供帮助。

目前, 国内抗生素抗性基因污染的研究相对集中于水产养殖、河流污染、动物粪便等^[10]。对于人体内 ARGs 的研究却很薄弱。鉴于这一研究较少, 本文主要对胆道系统内的 ARGs 进行了检测, 期望为人体内 ARGs 的研究和进展提供帮助, 同时也为抗生素的合理选用提供一定对策。

1 实验材料与方法

1.1 样品采集

收集胆囊结石 30 例 (A 组)、胆囊结石合并胆总管结石 30 例 (B 组)、胆总管结石 30 例 (C 组), 采集

时间(2017 年 10 月—2018 年 6 月)。结石标本取出后直接放入无菌袋中,并直接送与实验室,置于 -20℃ 冰箱中储存。

入选标准:(1)胆囊结石均为行 LC 手术、胆囊结石合并胆总管结石及胆总管结石均为开腹手术、术前 B 超及 MRI 确诊(并且术中证实存在结石);(2)无严重心、脑、肾等其他重要器官原发病;(3)状态良好,可耐受外科手术;(4)对治疗相关药物无过敏并耐受;(5)临床资料完整;(6)对本研究表示理解和支持并签署知情同意书。

排除标准:(1)发性硬化性胆管炎患者;(2)肝硬化患者;(3)胰腺癌、胆管癌患者;(4)胆道良性狭窄患者;(5)肝移植患者;(6)免疫功能低下,存在其他部位感染者;(7)正在接受糖皮质激素治疗的患者。

1.2 DNA 的提取

样品的基因组提取使用 E.Z.N.A®Soil DNA Kit(Omega Bio-Tek, USA),按照生产商的说明操作,用多功能读版机 Infinite 200 PRO(TECAN, Sweden)测定 DNA 浓度和纯度。每个样提取 3 份,然后将 3 份 DNA 提取物合并在一起于 -20℃ 保存待用。

1.3 实时荧光定量 PCR

对对照样品进行了高通量 qPCR,共检测出 175 种 ARGs,根据其丰度大小及查阅相关文献^[11-12],共选取了其中 17 种 ARGs,具体包括 β- 内酰胺类抗生素抗性基因 10 种 (*bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{ampC}、*ampC-01*、*ampC/bla*_{DHA}、*bla*_{-ACC-1}、*bla*_{CMY}、*bla*_{GES}和 *cfxA*),氨基糖苷类抗生素抗性基因 5 种 (*aac*、*aacC*、*aadD*、*aadA1*和 *strB*),四环素类抗生素抗性基因 1 种 (*tetX*),磺胺类抗生素抗性基因 1 种 (*sull*),以及 1 种整合酶基因 (*intI1*)和 1 种转座酶基因 (*tnpA*)进行 qPCR 检测,同时对细菌 16S rRNA 基因进行 qPCR 检测,这些 ARGs 在 qPCR 检测中所用引物序列见(表 1)。含有这些特定基因的质粒由浙江天科生物技术有限公司生产,作为 qPCR 标准曲线 10 倍稀释的标准品,并以无菌水作为阴性对照。将标准品与待测样品一起在 StepOnePlus™实时荧光定量 PCR 仪器上进行 qPCR。所有样品 3 个平行,最终计算平均值。

qPCR 反应体系采用 10μL 体系,包括 TB Green Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)(2×)5μL,上下游引物各 0.4μL,ROX Reference Dye(50×)0.2μL,DNA Sample,1μL,ddH₂O,3μL。反应热循环步骤如下:(1)95℃,30s,1cycle;(2)95℃,5s,40cycles;(3)60℃,

表 1 抗生素抗性基因的引物序列
Tab. 1 primer sequences of antibiotic resistance genes

基因名称	引物序列 (5'-3')
<i>bla</i> _{CTX-M}	F:ATGTGCAGYACCAGTAARGT R:TGGGTRAARTARGTSACCAGA
<i>bla</i> _{TEM}	F:KACAATAACCCGTGRTAAATGA R:AGTATATATTATGAGTAAACTTGG
<i>bla</i> _{SHV}	F:TTTATCGGCCGCGATAACG R:GCTGCGGGCCGCGATAACG
<i>bla</i> _{ampC}	F:CCCCGCTTATAGAGCAACAA R:TCAATGGTCGACTTCACACC
<i>ampC-01</i>	F:TGGCGTATCGGGTCAATGT R:CTCCACGGGCCAGTTAGT
<i>ampC/bla</i> _{DHA}	F:TGGCCGCAGCAGAAAGA R:CCGTTTTATGCACCCAGGAA
<i>bla</i> _{-ACC-1}	F:CACACAGCTGATGGCTTATCTAAAA R:AATAAACGCGATGGGTTCCA
<i>bla</i> _{CMY}	F:CCGCGGCGAAATTAAGC R:GCCACTGTTGCCTGTCAGTT
<i>bla</i> _{GES}	F:GCAATGTGCTCAACGTTCAAG R:GTGCCTGAGTCAATTCTTTCAAAG
<i>cfxA</i>	F:TCATTCTCTGTTCAAGTTTTCAGA R:TGCAGCACCAAGAGGAGATGT
<i>aac</i>	F:CCCTGCGTTGTGGCTATGT R:TTGGCCACGCCAATCC
<i>aacC</i>	F:CGTCACTTATTCGATGCCCTTAC R:GTCGGGCGCGGCATA
<i>aadD</i>	F:CCGACAACATTTCTACCATCCTT R:ACCGAAGCGCTCGTCGTATA
<i>aadA1</i>	F:AGCTAAGCGCGAACTGCAAT R:TGGCTCGAAGATACCTGCAA
<i>strB</i>	F:GCTCGGTCGTGAGAACAACTCT R:CAATTTCGGTCGCTGGTAGT
<i>tetX</i>	F:CAATAATTGGTGGTGACCC R:TTCTTACCTTGGACATCCCG
<i>sull</i>	F:CGCACCGGAAACATCGCTGCAC R:TCCGGTGGAGGCCGGTATATGG

30s, 40cycles。CT 检测限为 40 个循环。通过熔解曲线和凝胶电泳验证引物特异性。

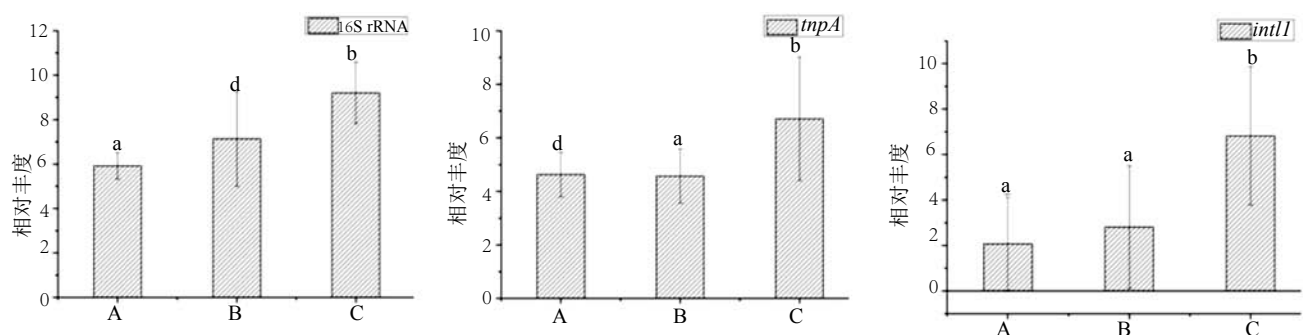
1.4 数据分析

数据采用 Microsoft Excel 2013 和 SPSS 17.0 进行处理和分析,作图采用 Microsoft Excel 2013、SigmaPlot 14.0、R 3.5.1 及 Gephi 等完成。用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对不同部位 ARGs 的差异性进行分析。用 Pearson 线性相关分析确定 MGEs 和 ARGs 丰度之间是否具有显著相关性。

2 结果

2.1 16S rRNA、整合酶基因 (*intI1*)、转座酶基因 (*tnpA*) 的丰度

在该研究中,对胆囊结石、胆囊结石合并胆总管结石、胆总管结石中的 16S rRNA、整合酶、转座酶进行荧光定量 PCR 检测(图 1)。本研究发现胆总管结石中的 16S rRNA 和整合酶基因 (*intI1*)、转座



A: 胆囊结石; B: 胆囊结石合并胆总管结石; C: 胆总管结石; 数值为 3 个重复平均值, 竖线显示的是标准偏差, 字母相同表示没有显著差异 ($P>0.05$); a、b: 有显著性差异 ($P<0.05$); d: 该组与其余两组没有显著差异 ($P>0.05$)

图 1 胆囊结石、胆囊结石合并胆总管结石、胆总管结石中 16S rRNA、整合酶、转座酶基因相对丰度比较

Fig. 1 The relative abundance of 16S rRNA, *int11* and *tnpA* genes in gallbladder stones, common bile duct stones and common bile duct stones was compared

酶基因 (*tnpA*) 相对丰度均要高于其余两组, 但 16S rRNA 基因相对丰度与胆囊结石合并胆总管结石相比没有差异, 与胆囊结石之间相比有显著差异。整合酶基因 (*int11*) 相对丰度与胆囊结石合并胆总管结石、胆囊结石之间相比均有显著差异。转座酶基因 (*tnpA*) 相对丰度与胆囊结石合并胆总管结石相比有显著差异, 与胆囊结石之间相比没有差异。胆囊结石合并胆总管结石中 16S rRNA 和整合酶基因 (*int11*) 的相对丰度要高于胆囊结石, 但没有显著差异。胆囊结石合并胆总管结石中转座酶基因 (*tnpA*) 的相对丰度要与胆囊结石之间相比较低, 但没有显著差异。

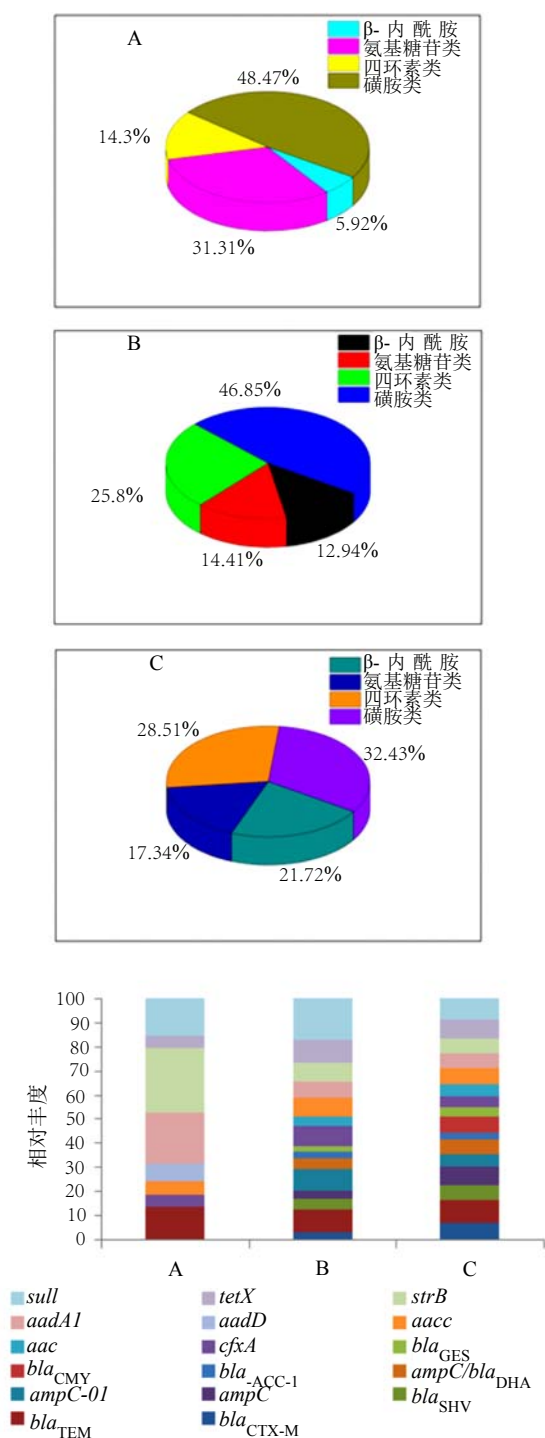
各类 ARGs 的比例及所测得的 ARGs 的相对丰度如图 2 所示中。胆囊结石中, 磺胺类抗生素抗性基因所占的比例最高为 48.47%, β -内酰胺类抗生素抗性基因所占的比例最低为 5.92%, 具体测到的 ARGs 有 8 种, *strB* 基因检出率最高, 为 27.1%。*bla*_{TEM}、*cfxA*、*aacc*、*aadD*、*aadA1*、*tetX*、*sull* 的检出率分别为 13.9%、5.1%、5.1%、7.7%、20.7%、4.6% 和 15.6%。胆囊结石合并胆总管结石中, 磺胺类抗生素抗性基因所占的比例最高为 46.85%, β -内酰胺类抗生素抗性基因所占的比例最低为 12.94%, 具体测到的 ARGs 有 15 种, *sull* 基因检出率最高, 为 17.1%。*bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*ampC-01*、*ampC/bla*_{DHA}、*bla*_{ACC-1}、*bla*_{GES}、*cfxA*、*aac*、*aacc*、*aadA1*、*strB* 和 *tetX* 的检出率分别为 3.2%、9.4%、4.4%、3.4%、8.9%、4.2%、2.8%、2.5%、8.2%、3.9%、8.1%、6.2%、8.2% 和 9.4%。胆总管结石中, 磺胺类抗生素抗性基因所占的比例最高为 32.43%, 氨基糖苷类抗生素抗性基因所占的比例最低为 17.34%, 具体测到的 ARGs 有 16 种, *bla*_{TEM} 基因检出率最高, 为 9.1%。*bla*_{CTX-M}、*bla*_{SHV}、*ampC-01*、*ampC/bla*_{DHA}、*bla*_{ACC-1}、*bla*_{CMY}、

*bla*_{GES}、*cfxA*、*aac*、*aacc*、*aadA1*、*strB*、*tetX* 和 *sull* 的检出率分别为 7.3%、6.5%、7.6%、5.4%、5.6%、3.3%、6.4%、4.0%、4.5%、4.7%、6.9%、6.1%、6.0%、7.8% 和 8.9%。*bla*_{CMY} 只在胆总管结石组被检测到, *aadD* 只在胆囊结石组中被检测到。

在测得的 β -内酰胺类抗生素抗性基因中 (图 3)。胆总管结石中的 *bla*_{TEM}、*bla*_{AmpC}、*bla*_{CMY} 和 *bla*_{GES} 基因的相对丰度均显著高于其余两组; 胆总管结石中的 *ampC-01*、*ampC/bla*_{DHA} 基因的相对丰度显著高于胆囊结石, 但与胆囊结石合并胆总管结石无显著差异; *bla*_{CTX-M}、*bla*_{SHV}、*bla*_{ACC-1} 和 *cfxA* 这 3 组间无显著差异。尽管在胆囊结石合并胆总管结石中测得的 ARGs 的相对丰度均要高于胆囊结石 (除 *bla*_{CMY} 基因未被检测到外), 但两者间无显著性差异。*bla*_{CTX-M}、*bla*_{SHV}、*bla*_{AmpC}、*ampC-01*、*ampC/bla*_{DHA}、*bla*_{ACC-1}、*bla*_{CMY}、*bla*_{GES} 这些基因在胆囊结石中未被检测到。

在测得的氨基糖苷类抗生素抗性基因中 (图 4)。胆总管结石中的 *aac*、*aacC* 基因的相对丰度显著高于胆囊结石, 但与胆囊结石合并胆总管结石无显著差异; 胆总管结石中 *strB* 基因的相对丰度显著高于胆囊结石合并胆总管结石, 但与胆囊结石无显著差异, *aadD*、*aadA1* 这 3 组间无显著差异。胆囊结石合并胆总管结石和胆囊结石中测得的 ARGs 的相对丰度两者间无显著性差异。*aac* 基因在胆囊结石中未被检测到, *aadD* 在胆囊结石合并胆总管结石和胆总管结石中未被检测到。

在测得的四环素类和磺胺类抗生素抗性基因中 (图 5)。胆总管结石中 *tetX* 基因的相对丰度要显著高于胆囊结石, 但与胆囊结石合并胆总管结石无显著差异。胆囊结石合并胆总管结石中的 *tetX* 基因与胆囊结石无显著差异。*sull* 基因这 3 组间无显著差异。



A: 胆囊结石; B: 胆囊结石合并胆总管结石; C: 胆总管结石

图 2 ARGs 的相对丰度及之间的比例

Fig. 2 Relative abundance and ratio of ARGs

2.2 抗生素抗性基因 (ARGs) 与可移动遗传因子 (MGEs) 的相关性分析

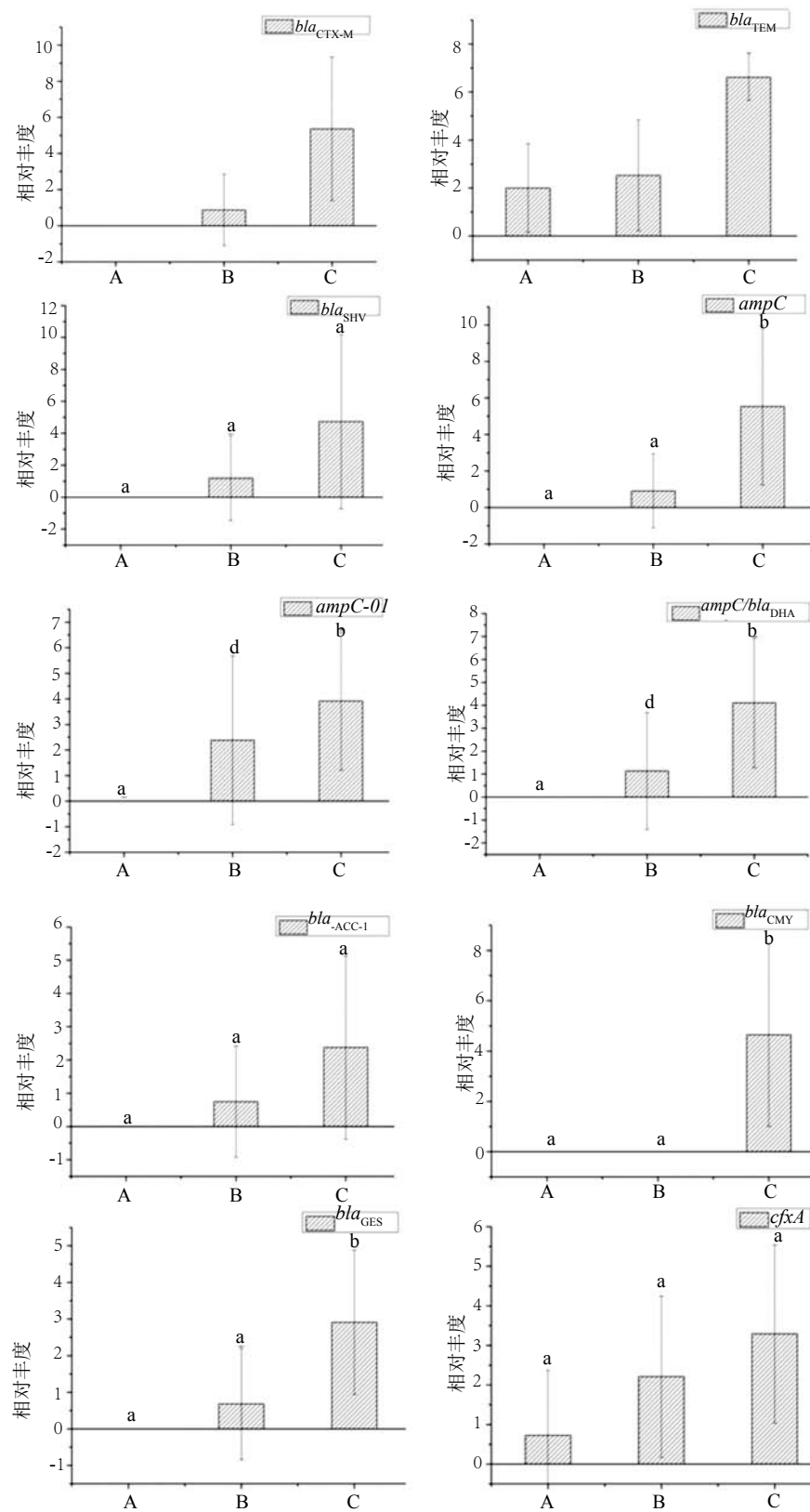
抗生素抗性基因 (ARGs) 和可移动遗传因子 (MGEs) 之间的相关关系如表 2 所示。在检测的 4 类 ARGs 中, *tnpA*、*intI* 基因与 β-内酰胺类基因、四环素类基因和磺胺类基因均具有显著正相关 ($P<0.01$)。

β-内酰胺类基因与氨基糖苷类基因、四环素类基因和磺胺类基因都具有显著相关性 ($P<0.01$)。氨基糖苷类基因与磺胺类基因、四环素类基因具有显著相关性 ($P<0.01$)。四环素类基因和磺胺类基因具有显著相关性 ($P<0.01$)。

3 讨论

健康人群胆汁内一般无细菌生长,但由于结石、畸形、梗阻、既往手术史等因素致胆道发生病理性改变,胆道固有的防御、清除机制受到破坏,细菌异位进入胆道繁殖^[13]。有研究发现,胆石症住院患者约有 6%~9% 会发生胆道感染^[14]。抗生素作为治疗感染性疾病的特效药被广泛应用于临床工作中,目前临床治疗感染性疾病时主要依据经验性用药,这极易造成抗生素的滥用,进一步导致耐药菌株的产生,一旦发生重症感染可造成患者全身炎症反应综合征、脓毒症、多脏器功能不全甚至死亡,病死率可高达 11%~27%^[15]。因此,分析胆石病患者体内 ARGs 的携带情况,为临床中的药物使用如何有效预防并控制细菌的感染、如何合理正确的使用药物提供了重要的科学依据。

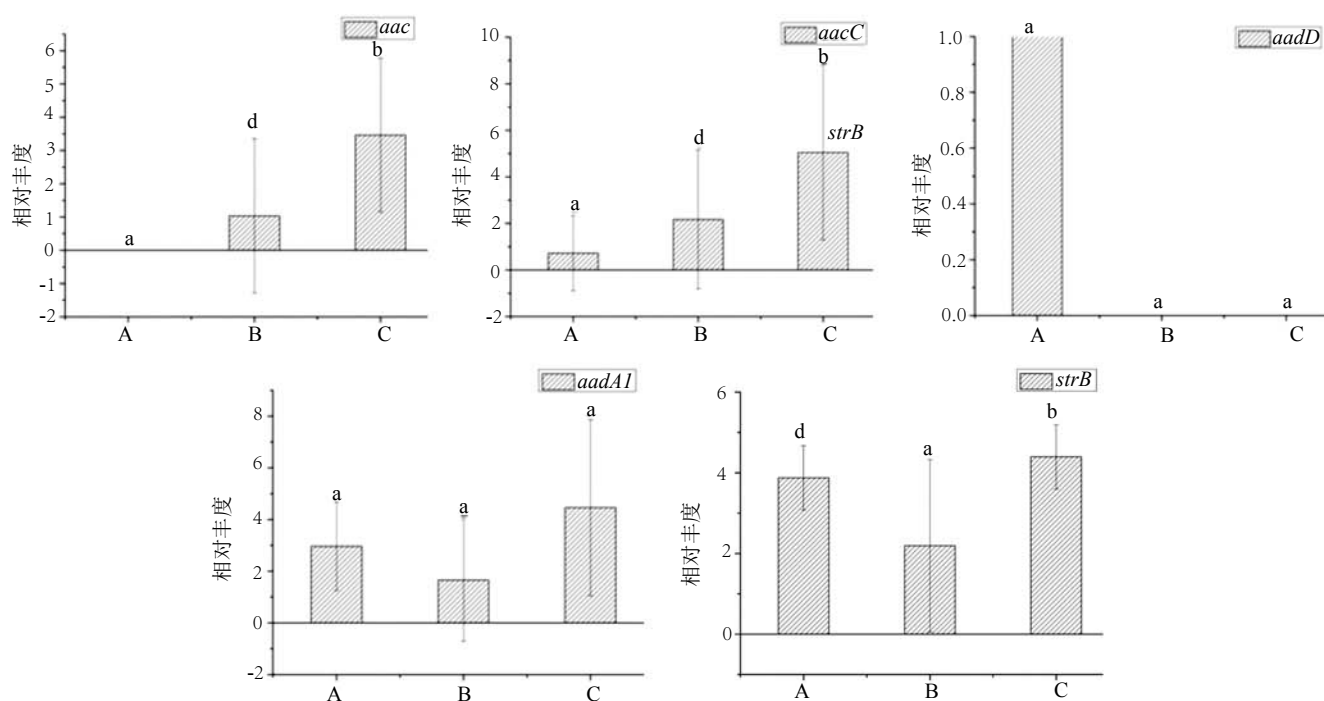
在本次研究中,检测到胆石病患者含有丰富的 ARGs。其中胆囊结石患者 ARGs 有 8 种,胆囊结石合并胆总管结石患者 ARGs 有 15 种,胆总管结石患者 ARGs 有 16 种。检测到 β-内酰胺类抗生素抗性基因在胆囊结石患者和胆囊结石合并胆总管结石患者中占的比例最低,氨基糖苷类抗生素抗性基因在胆总管结石患者占的比例最低。因此,这些发现可以为胆囊结石患者和胆囊结石合并胆总管结石患者首选 β-内酰胺类抗生素及胆总管结石患者首选氨基糖苷类抗生素提供理论上的依据。同时,该研究中还发现,在选择 β-内酰胺类抗生素抗性基因中,胆总管结石患者中 β-内酰胺类抗生素抗性基因的丰度与种类高于胆囊结石患者和胆囊结石合并胆总管结石患者。对氨基糖苷类抗生素抗性基因检测后发现,除 *aadD* 基因在胆总管结石患者中被检测到外,其他氨基糖苷类抗生素抗性基因的相对丰度均要高于胆囊结石患者和胆囊结石合并胆总管结石患者。本次实验也对四环素类和磺胺类抗生素抗性基因进行了检测,发现磺胺类抗生素抗性基因所占比例最高,四环素类次之,这可能与四环素类和磺胺类抗生素曾广泛应用于临床有关。因此,应避免使用这两类抗生素,尽管目前这两类药物临床应用已受到很大限制,但本次研究也为临床抗生素的经验用药的选



A: 胆囊结石; B: 胆囊结石合并胆总管结石; C: 胆总管结石; 数值为 3 个重复的平均值, 竖线显示的是标准偏差; 字母相同表示没有显著差异 ($P > 0.05$); a 和 b: 有显著性差异 ($P < 0.05$); d: 该组与其余两组没有显著差异 ($P > 0.05$)

图 3 胆囊结石、胆囊结石合并胆总管结石、胆总管结石中 β -内酰胺类抗生素抗性基因相对丰度比较

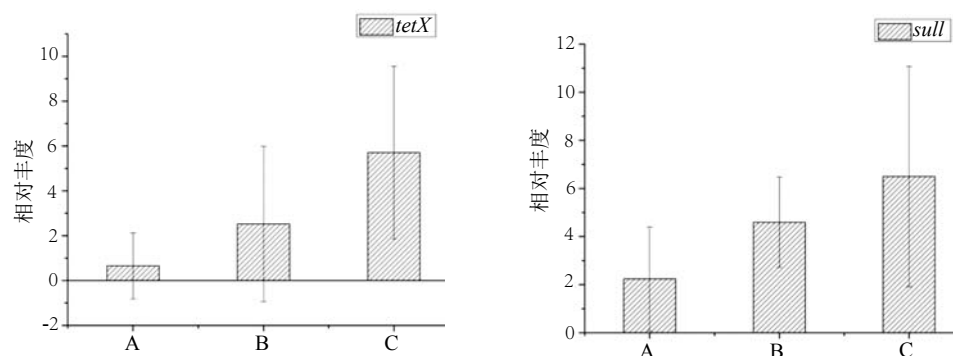
Fig. 3 Comparison of relative abundance of antibiotics resistance genes to beta-lactam in gallbladder stones, common bile duct stones with common bile duct stones and common bile duct stones



A: 胆囊结石; B: 胆囊结石合并胆总管结石; C: 胆总管结石; 数值为 3 个重复的平均值, 竖线显示的是标准偏差; 字母相同表示没有显著差异 ($P>0.05$); a 和 b: 有显著性差异 ($P<0.05$); d: 该组与其余两组没有显著差异 ($P>0.05$)

图 4 胆囊结石、胆囊结石合并胆总管结石、胆总管结石中氨基糖苷类抗生素抗性基因相对丰度比较

Fig. 4 Comparison of relative abundance of aminoglycoside antibiotic resistance genes in gallbladder stones, common bile duct stones with common bile duct stones and common bile duct stones



A: 胆囊结石; B: 胆囊结石合并胆总管结石; C: 胆总管结石; 数值为 3 个重复的平均值, 竖线显示的是标准偏差. 字母相同表示没有显著差异 ($P>0.05$); a 和 b: 有显著性差异 ($P<0.05$); d: 该组与其余两组没有显著差异 ($P>0.05$)

图 5 胆囊结石、胆囊结石合并胆总管结石、胆总管结石中四环素类和磺胺类抗生素抗性基因相对丰度比较

Fig. 5 Comparison of relative abundance of tetracycline and sulfonamide antibiotic resistance genes in gallbladder stones, common bile duct stones with common bile duct stones and common bile duct stones

择提供了理论上的依据。目前研究发现, 高温可以有效减少堆肥中 ARGs 的丰度^[16-17], 也有研究报道在堆肥中加入中药渣发现 ARGs 的相对丰度较少了^[18]。这些发现对如何可以减低人体内的 ARGs 的丰度, 从而提高对抗生素的敏感性提供了思路, 这也将是我们今后研究的一个主要方向。

ARGs 的出现和传播与整合酶基因 (*intI1*)、转座酶基因 (*tnpA*) 密切相关性^[19-21], 在我们的研究中

也证实了这一发现。Heuer 等^[22]研究发现 ARGs 和 *intI1* ($P<0.05$) 有相关性, 说明 *intI1* 在 ARGs 横向转移起到非常重要的作用, 也进一步证明了 *intI1* 是在 ARGs 传播中的一个重要途径^[23]。在我们的研究中 *intI1* 和 ARGs 之间也表现出显著相关性, 并且 *tnpA* 与 ARGs 也表现出显著相关性。但是, Forsberg 等^[24]也认为 ARGs 与 *intI1* 并没有相关性。这些研究表明, ARGs 与可移动基因元件的存在和转移机制是非常复

表 2 抗生素抗性基因和可移动基因元件之间的相关关系

Tab. 2 The correlations among the abundance of antibiotic resistant genes and mobile gene elements

抗菌基因	氨基糖苷类	四环素类	磺胺类	int11	tnpA	16S rRNA
β-内酰胺类	0.855**	0.904**	0.806**	0.811**	0.760**	0.922**
氨基糖苷类		0.931**	0.862**	0.826**	0.872**	0.872**
四环素类			0.902**	0.825**	0.764**	0.960**
磺胺类				0.846**	0.813**	0.791**
int11					0.873**	0.773**
tnpA						0.718**

注: **表示在 $P<0.01$ 水平显著相关(双边检验)

杂的,这需要在将来的研究中进一步探索。

综上,胆石病患者含有丰富的 ARGs,胆总管结石携带 ARGs 最多,胆囊结石合并胆总管结石次之,胆囊结石携带的 ARGs 最少,同时也发现,胆囊结石患者和胆囊结石合并胆总管结石患者中 β-内酰胺类抗生素抗性基因含量最低;胆总管结石患者中氨基糖苷类抗生素抗性基因含量最低。这些发现可以为胆石病患者在临床上选择 β-内酰胺类抗生素及氨基糖苷类抗生素提供理论依据。而对于如何可以有效减低人体内的 ARGs 的程度,这需要在将来的研究中进一步探索。

参考文献

[1] Ochman H, Lawrence J G, Groisman E A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation[J]. *Nature*, 2000, 405(6784): 299-304.

[2] Weight G D. Bacterial resistance to antibiotics:enzymatic degradation and modification[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(10): 1451-1470.

[3] Crecchio C, Ruggiero P, Curci M, et al. Binding of DNA from *Bacillus subtilis* on montmorillonite-humicacids-aluminum or iron hydroxypolymers[J]. *Soil Sci Soc Amer J*, 2005, 69(3): 834-841.

[4] Mellon M, Benbrook C, Benbrook K. Hogging it estimates of antimicrobial abuse in livestock[J]. *Union Concerned Scientists*, 2001, 2238(9105): 192-230.

[5] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. *生态毒学报*, 2007, 2(3): 243-251.

[6] 张培琴, 李卿明, 刘伦扬. 利胆防石散对微创保胆取石术后胆囊结石复发的预防作用[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(3): 991-993.

[7] Schirmer B D, Winters K L, Edlich R F. Cholelithiasis and cholecystitis[J]. *J Long Term Eff Med Implants*, 2005, 15(3): 329-338.

[8] 周华. 腹腔镜胆囊切除术并发症的防治对策[J]. *医学信息*, 2013, 26(6): 29-30.

[9] 王宏, 吴小荣, 李虎山, 等. 胆石症患者胆道手术局部感染的危险因素[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2016, 22(5): 304-307.

[10] 王志刚, 陈宏, 陈玉成. 电解氧化法去除养殖废水中抗生素和激素研究[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2013, 35(5): 131-136.

[11] Wang F H, Qiao M, Chen Z, et al. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest[J]. *J Hazard Mater*, 2015, 299: 215-221.

[12] Wang F H, Qiao M, Lv Z E, et al. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China[J]. *Environ Poll*, 2014, 184(1): 247-253.

[13] 孙斌, 郭源, 李坤. 胆总管结石伴胆道感染患者胆汁病原菌分布与药敏性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(14): 3529-3531.

[14] What if it's acute cholangitis[J]. *Drug Ther Bull*, 2005, 43 (8): 62-64.

[15] Wada K, Takada T, Kawarada Y, et al. Diagnostic criteria and severity assessment of acute cholangitis: Tokyo Guidelines[J]. *Hepatob Pancreat Surg*, 2007, 14(1): 52-58.

[16] Erickson M C, Liao J, Boyhan G, et al. Fate of manure-borne pathogen surrogates in static composting piles of chicken litter and peanut hulls[J]. *Biores Technol*, 2010, 101(3): 1014-1020.

[17] Qian X, Sun W, Gu J, et al. Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 8(101): 425-432.

[18] 宿程远, 郑鹏, 阮祁华. 中药渣与城市污泥好氧共堆肥的效能[J]. *环境科学*, 2016, 3(10): 4062-4068.

[19] Heuer H, Smalla K. Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(6): 1083-1104.

[20] Rahube T, Yost C. Characterization of a mobile and multiple resistance plasmid isolated from swine manure and its detection in soil after manure application[J]. *Appl Microbiol*, 2012, 112(6): 1123-1133.

[21] Zhang W R, Na G S, Lu Z H, et al. Distribution of sulfonamides and sulfonamide-resistant *Escherichia coli* in the coastal marine environment of northern Yellow Sea, China[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, 20(3): 401-406.

[22] Heuer H, Smalla K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months[J]. *Environ. Microbiol*, 2007, 9(3): 657-666.

[23] Gillings M R, Krishnan S, Worden P J, et al. Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 287(1): 56-62.

[24] Forsberg K J, Patel S, Gibson M K. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats[J]. *Nature*, 2014,