

• 论 著 •

秦皮乙素对产 KPC 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌的体外抗菌效果

王 蕾¹, 刘志远², 潘 健², 张婷菊², 齐 杰², 张国军^{1△}

(1. 首都医科大学附属北京天坛医院检验科, 北京 100050; 2. 中国中医科学院广安门医院检验科, 北京 100053)

摘要:目的 观察秦皮乙素对产碳青霉烯酶(KPC)碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌的体外抗菌效果。方法 采用改良 Hodge 试验、美罗培南加抑制剂 3-氨基苯硼酸(APBA)、乙二胺四乙酸(EDTA)等试验来检测菌株产 KPC 表型; PCR 扩增 KPC 基因并测序; MLST-PCR 法检测菌株 ST 分型; 肉汤微量稀释法检测秦皮乙素的最小抑菌浓度(MIC); 按棋盘法联合药敏试验检测秦皮乙素与亚胺培南、庆大霉素、左氧氟沙星体外联合抗菌效果。结果 所有菌株均携带 KPC-2 基因; MLST 分型均为 ST11 型; 秦皮乙素单独抗菌的 MIC 值为 0.5~1.0 mg/mL。秦皮乙素与亚胺培南联合药敏试验, 分级抑菌浓度(FIC)指数均大于 2。与庆大霉素联合, 庆大霉素 MIC \geq 1 024 μ g/mL 时, FIC 指数均为 2; MIC \leq 512 μ g/mL 时, FIC 指数为 0.31~1.0。与左氧氟沙星联合, FIC 指数均为 2。结论 秦皮乙素对产 KPC 酶碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌具有明确的抗菌作用, 与亚胺培南联合时存在拮抗作用, 与庆大霉素联合时两药联合抗菌结果显示为无关、相加或协同作用, 与左氧氟沙星的结果均表现为无关。

关键词:秦皮乙素; 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌; 抗菌作用

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.23.021 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)23-3483-04

Effect of Esculetin inhibiting for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in vitroWANG Lei¹, LIU Zhiyuan², PAN Jian², ZHANG Tingju², QI Jie², ZHANG Guojun^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Guang An Men Hospital Affiliated of China

Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract: **Objective** To examine the effect of bacteriostasis of Esculetin against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase(KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** Modified Hodge test, meropenem combined with 3-aminophenylboronic acid(APBA) and EDTA were conducted to detect carbapenemases. KPC gene and sequencing were determined by PCR. The molecular typing of strains was analyzed by MLST-PCR. Minimal inhibitory concentrations(MICs) of Esculetin against the strains for research were determined by broth dilution in the 96-well microplates. Synergy effects between Esculetin and antibiotic(imipenem, gentamycin, levofloxacin) were designed with chessboard test. **Results** Modified Hodge Test and APBA inhibiting test were positive in all strains. All samples were KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*, and predominantly to a single sequence type, ST11. The tests showed the MICs of Esculetin were 0.5—1.0 mg/mL. The result was FIC higher than 2 in the combination of Esculetin with imipenem in all strains. Different results were observed in the combination between Esculetin and gentamicin according to the MIC of gentamicin. FIC was equal to 2 when the MIC higher than 1 024 μ g/mL. FIC was in the range of 0.3—1.0 when MIC was lower than 512 μ g/mL. The combination between Esculetin and levofloxacin obtained that FIC was equal to 2 in all specimens. **Conclusion** Esculetin has obvious antibacterial effect on KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. The antagonistic effect is observed in the combination between Esculetin and imipenem. The combined efficacy of Esculetin and gentamicin are different according to MICs of gentamicin. And there is indifferent action between Esculetin and levofloxacin.

Key words: Esculetin; carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*; bacteriostasis

肺炎克雷伯菌是社区获得性及医院感染的重要条件致病菌之一。因碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用, 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)在全球多个地区造成感染暴发^[1]。耐药机制以肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶(KPC)最为主要和常见。在临床中, 治疗产 KPC 肺炎克雷伯菌引起的感染时可用的抗菌药物很少, 为治疗带来了困扰。秦皮乙素是中草药秦皮的主要成分, 具有抗菌作用, 对多种细菌都有显著的抗菌作用^[2]。本研究观察了秦皮对 CRKP 的体外抗菌活性, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料来源 选择 2013—2015 年首都医科大学附属北京天坛医院分离的非重复 CRKP, 并进行耐药基因检测及多位点序列分型, 得到携带 KPC 基因且同时为 ST11 型的肺炎克雷伯菌 10 株, 作为实验用菌。细菌鉴定和药敏试验采用 VITEK

2-Compact 全自动微生物分析系统进行, 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

1.2 仪器与试剂 秦皮乙素、庆大霉素、左氧氟沙星购自北京华迈科生物技术有限责任公司; 亚胺培南购自默沙东公司; M-H 肉汤购自北京陆桥技术责任有限公司; PCR 试剂、电泳用试剂均购自北京赛百盛基因技术有限公司; 药敏纸片购自英国 Oxoid 公司。3-氨基苯硼酸(APBA)购自 SIGMA-ALDRICH 公司; 乙二胺四乙酸(EDTA)购自北京化学试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 菌液配制 从已分离纯化的待检细菌平板上挑取 3~5 个菌落, 接种于 3~5 mL 的 M-H 肉汤培养基, 于 37 °C 培养 6 h。菌液用 M-H 肉汤混匀后经比浊仪校正浊度至 0.5 麦氏比浊标准, 再用 M-H 肉汤稀释至 1.5×10^5 cfu/mL 备用。

1.3.2 药液配制 抗菌药物参照美国 CLSI(2016 年版)配置

成 100 mg/mL 待用;秦皮乙素药液使用相应溶剂溶解配置成 100 mg/mL 浓度待用。

1.3.3 KPC 耐药表型初筛实验 改良 Hodge 实验参照 CLSI 推荐方法操作^[3]。EDTA 抑制实验和 APBA 抑制实验:于孵育 18~24 h 的血平板上挑出单个菌落,用生理盐水制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液,用无菌棉拭子蘸取调好的菌液涂布于 M-H 培养基,将美罗培南(10 μg)药敏纸片、美罗培南(10 μg)+EDTA(730 μg)纸片、美罗培南(10 μg)+APBA(600 μg)均匀贴在 M-H 琼脂培养基上,置于 35 °C 的孵箱培养。18~24 h 后读取结果。美罗培南筛选 KPC 表型。结果判定:含 APBA、EDTA 复合纸片比单独用美罗培南的抑菌圈大于或等于 5 mm 时,判定为阳性结果。

1.3.4 KPC 基因扩增 煮沸法提取细菌 DNA,引物 KPC-F 5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3'; KPC-R 5'-CTCAGT-GCTCTACAGAAAACC-3'^[4],扩增条件:94 °C 预变性 10 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 保持 7 min。引物合成及测序均由中美泰和(北京)有限公司完成。

1.3.5 多位点序列分型(MLST) 煮沸法提取细菌 DNA,根据肺炎克雷伯菌 7 个管家基因(ropB、gapA、mdh、pgi、phoE、infB、tonB)PCR 反应引物反应条件见网站 <http://bigsd.b.pasteur.fr/>。进行试验菌株的 MLST-PCR 检测。PCR 产物测序后,在网站 <http://www.pubmlst.org/> 进行 MLST 分型。试验用引物合成及测序均由中美泰和(北京)有限公司完成。引物序列见表 1。

1.3.6 秦皮乙素最小抑菌浓度(MIC) 将秦皮乙素储存液以灭菌 M-H 肉汤倍比稀释 32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 mg/mL 共 8 个浓度,加 200 μL 于 96 孔板,加菌液至最终菌液浓度 5×

10⁵ cfu/mL,放置在微量振荡仪振荡 3 min,35 °C 过夜培养。

表 1 MLST-PCR 反应引物序列

基因名称	引物序列 5'→3'	产物长度 (nt)
ropB	P1:GGCGAAATGGCWWGAGAACCA P2:GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1 075
gapA	P1:TGAAATATGACTCCACTCACGG P2:CTTCAGAAAGCGGCTTTGATGGCTT	662
mdh	P1:CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG P2:CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	756
pgi	P1:GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC P2:CGCGCCACGCTTATAGCGGTTAAT	566
phoE	P1:ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG P2:TGATCAGAAGTGGTAGGTGAT	602
infB	P1:CTCGCTGCTGGACTATATTCG P2:CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	462
tonB	P1:CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT P2:ATTTCGCCGCTGRGCRGAGAG	539

1.3.7 联合药敏试验 采用微量肉汤稀释法,菌液配制与中药抗菌成分标准品溶液配制同上。将中药抗菌成分标准品溶液以 M-H 肉汤倍比稀释成 2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 共 7 个浓度;将抗菌药物分别用 M-H 肉汤倍比稀释成 11 个浓度,见表 2。将配好的不同浓度的中药抗菌成分标准品溶液与抗菌药物溶液按棋盘法设计,两两组合加入 96 孔细胞培养板中,中药标准品加入 100 μL,抗菌药物加入 50 μL,再将已校正浓度的菌液 50 μL 加入孔中,37 °C 培养 18~24 h 后观察结果。

表 2 抗菌药物联合药敏试验浓度配置表(μg/mL)

药物	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6	浓度 7	浓度 8	浓度 9	浓度 10	浓度 11
亚胺培南	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5
庆大霉素	2 048	1 024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
左氧氟沙星	2 048	1 024	512	256	128	64	32	16	8	4	2

1.3.8 联合药敏试验结果判断 记录单独应用两药的 MIC 浓度,记做 MIC_A 和 MIC_B,并选择两药联合最佳组合效应时各自的 MIC 记为 A 和 B,以计算分级抑菌浓度(FIC)指数:FIC=A/MIC_A+B/MIC_B。判断标准:FIC≤0.5,协同作用;FIC>0.5 且 FIC≤1,相加作用;FIC>1 且 FIC≤2,无关作用;FIC>2,拮抗作用。

2 结 果

2.1 抗菌药物药敏试验结果 经 VITEK 2-Compact 检测,10 株肺炎克雷伯菌对碳青霉烯、头孢菌素、头孢菌素/酶抑制剂、氨基糖苷类、喹诺酮类等抗菌药物均耐药。微量肉汤稀释法确认亚胺培南、庆大霉素、左氧氟沙星 MIC,结果见表 3~5。

2.2 KPC 耐药表型筛选结果 10 株肺炎克雷伯菌的改良 Hodge 试验均为阳性,PBA 协同试验结果均为阳性,EDTA 协同试验结果均为阴性。

2.3 KPC 酶 PCR 结果 对 10 株细菌进行 PCR 实验结果显示均为 KPC 阳性,结果见图 1。将扩增结果进行测序,结果显示 10 株实验用菌均携带 KPC-2 基因。

2.4 MLST-PCR 结果 对 10 株实验菌株进行 MLST-PCR 检测,均扩增出 7 个肺炎克雷伯菌管家基因,见图 2。将 PCR

扩增结果送出测序,结果显示,所用 10 株实验菌株均为 S T11 型。

表 3 秦皮乙素与亚胺培南联合抗菌结果

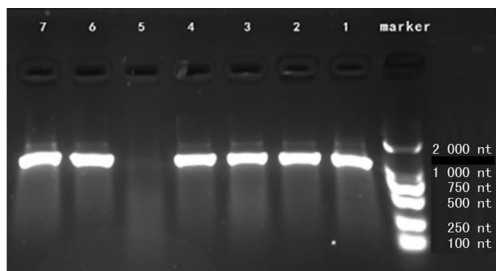
菌株	秦皮乙素(A)		亚胺培南(B)		FIC
	MIC _A (mg/mL)	A (mg/mL)	MIC _B (μg/mL)	B (μg/mL)	
菌株 1	1	1	64	128	3
菌株 2	0.5	0.5	32	64	3
菌株 3	0.5	0.5	64	128	3
菌株 4	0.5	0.5	32	128	5
菌株 5	1	1	32	128	5
菌株 6	1	1	32	128	5
菌株 7	1	1	64	128	3
菌株 8	1	1	32	64	3
菌株 9	0.5	0.5	128	256	3
菌株 10	0.5	0.5	32	64	3

表 4 秦皮乙素与庆大霉素联合抗菌结果

菌株	秦皮乙素(A)		庆大霉素(C)		FIC
	MIC _A	A	MIC _C	C	
	(mg/mL)	(mg/mL)	(μg/mL)	(μg/mL)	
菌株 1	0.5	0.125	256	128	0.75
菌株 2	0.5	0.125	512	128	0.5
菌株 3	0.5	0.031 25	64	32	0.562 5
菌株 4	1	1	2 048	2 048	2
菌株 5	1	1	1 024	1 024	2
菌株 6	0.5	0.25	32	16	1
菌株 7	1	1	1 024	1 024	2
菌株 8	1	0.062 5	64	16	0.312 5
菌株 9	0.5	0.5	2 048	2 048	2
菌株 10	0.5	0.062 5	64	16	0.375

表 5 秦皮乙素与左氧氟沙星联合抗菌结果

菌株	秦皮乙素(A)		左氧氟沙星(D)		FIC
	MIC _A	A	MIC _D	D	
	(mg/mL)	(mg/mL)	(μg/mL)	(μg/mL)	
菌株 1	1	1	2 048	2 048	2
菌株 2	0.5	0.5	2 048	2 048	2
菌株 3	0.5	0.5	2 048	2 048	2
菌株 4	0.5	0.5	2 048	2 048	2
菌株 5	1	1	2 048	2 048	2
菌株 6	0.5	0.5	2 048	2 048	2
菌株 7	1	1	2 048	2 048	2
菌株 8	1	1	2 048	2 048	2
菌株 9	0.5	0.5	2 048	2 048	2
菌株 10	0.5	0.5	2 048	2 048	2



注：1、2、3、4、6、7 号为实验菌株，KPC 阳性；5 号为阴性对照

图 1 部分分离肺炎克雷伯菌株 KPC 基因琼脂糖凝胶电泳结果

2.5 秦皮乙素药敏试验结果 使用肉汤微量稀释法检测 10 株实验菌株对秦皮乙素的药敏情况见表 3~5。

2.6 秦皮乙素与抗菌药物联合药敏试验结果

2.6.1 秦皮乙素与亚胺培南联合药敏试验结果 使用肉汤微量稀释法，对 10 株实验菌株进行秦皮乙素与亚胺培南联合抗菌实验。秦皮乙素的单独用药 MIC 值与联合用药 MIC 值无明显变化；亚胺培南与秦皮乙素联合用药后的 MIC 值较单独用药时升高 1~3 倍，其 FIC 指数均大于 2，见表 3。

2.6.2 秦皮乙素与庆大霉素联合药敏试验结果 使用肉汤微

量稀释法，对 10 株实验菌株进行秦皮乙素与庆大霉素联合抗菌实验。庆大霉素 MIC_≥1 024 μg/mL 时，秦皮乙素及庆大霉素的联合用药 MIC 值均没有变化，FIC 指数均为 2；当庆大霉素 MIC 值_≤512 μg/mL 时，秦皮乙素及庆大霉素的联合用药 MIC 值均明显下降，FIC 指数为 0.312 5~1，见表 4。

2.6.3 秦皮乙素与左氧氟沙星联合药敏试验结果 使用肉汤微量稀释法，对 10 株实验菌株进行秦皮乙素与庆大霉素联合抗菌实验。两者联合 MIC 值较单独用药 MIC 值没有变化，FIC 指数均为 2，见表 5。

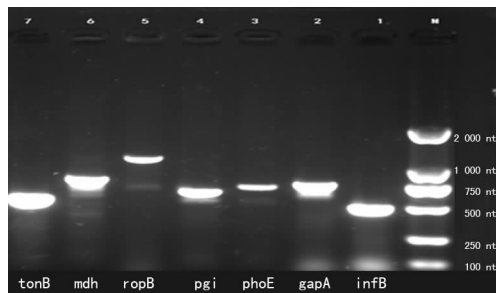


图 2 MLST-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

3 讨论

肺炎克雷伯菌是重要的条件致病菌，常导致呼吸道、泌尿道等医院感染^[5-6]。随着碳青霉烯类抗菌药物的出现及广泛使用，导致 CRKP 的出现，造成患者病程迁延和临床抗感染治疗的失败，从而增加了患者的病死率。细菌产 KPC 是 CRKP 耐药的主要原因，KPC 属于 A 类酶。携带 KPC 基因的 CRKP 在临床上分离率较高；且 KPC 由质粒编码，具有在不同菌种(属)间传播的特点^[7-8]。在我国，CRKP 的广泛传播和出现都以产 KPC 肺炎克雷伯菌为主，而 ST11 型被认为是产 KPC 肺炎克雷伯菌优势克隆型^[9-11]。秦皮乙素提取自秦皮，属于香豆素类化合物。秦皮在治疗菌痢的中药方剂“白头翁汤”中起很重要的作用，而秦皮乙素对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、痢疾杆菌等有显著的抗菌作用^[12]。本研究发现秦皮乙素对 ST11 型产 KPC 的 CRKP 有明显抑菌作用。其 MIC 值在 0.5~1 mg/mL，见表 3。体外联合药敏试验显示，秦皮乙素与亚胺培南呈明显的拮抗趋势，10 株菌的 FIC 指数均大于 2，可以使亚胺培南的 MIC 值提高 1~2 倍。秦皮乙素浓度在低至 0.062 5 mg/mL 时，两者联合仍存在拮抗现象。秦皮乙素与亚胺培南的拮抗作用提示，在服用含有秦皮乙素成分的中药汤剂时不要与亚胺培南同时使用。此种情况是否出现于其他型肺炎克雷伯菌或肠杆菌科细菌还有待于进一步的研究。

此外，秦皮乙素在与庆大霉素的体外联合抗菌试验中，出现了 FIC 指数不一致的现象，即存在协同、相加和无关 3 种结果；其中庆大霉素单独抗菌 MIC_≥1 024 μg/mL 的菌株，其秦皮乙素与庆大霉素联合抗菌的 FIC 指数均为 2，显示为无关的结果；而庆大霉素 MIC_≤512 μg/mL 的菌株，其秦皮乙素与庆大霉素联合抗菌的 FIC 指数小于 1，部分菌株 FIC 指数小于 0.5，显示为相加与协同作用。氨基糖苷类抗菌药物的抗菌机制是阻碍细菌蛋白质的合成。因此，分析二者联合抗菌产生协同效应的原因可能是，秦皮乙素可以提高细菌细胞膜的通透性，使庆大霉素进入菌体，作用于菌体从而达到抗菌作用，降低了庆大霉素的 MIC 值，具体原因还有待于进一步研究。秦皮乙素与喹诺酮类抗菌药物左氧氟沙星的体外联合抗菌效果不显著，从数据来看，实验菌株的抗菌实验结果均表现为无关。

秦皮乙素对产 KPC 肺炎克雷伯菌具有明显的抗菌作用，与不同抗菌药物可能存在拮抗或协同作用。临床上联合使用

含秦皮的中药处方和抗菌药物治疗感染时,应注意秦皮乙素与抗菌药物之间的相互作用,避免影响抗菌药物的治疗效果。CRKP 广泛出现的今天,研究中草药的抗菌、抗感染作用,以及中药与抗菌药物的相互作用,具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] Munoz-Price LD, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases[J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(9): 785-796.
- [2] Duncan SH, Leitch EC, Stanley KN, et al. Effects of esculetin and esculetin on the survival of *Escherichia coli* O157 in human faecal slurries, continuous-flow simulations of the rumen and colon and in calves[J]. *Br J Nutr*, 2004, 91(5): 749-755.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-fourth Informal Supplement; M100-S26[S]. Wayne, PA: CLSI, 2016.
- [4] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4): 1151-1161.
- [5] 姚希,徐丹慧,贾建侠,等. 2011—2016 年耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌医院感染趋势分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(12): 2652-2655.
- [6] Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in

mediterranean countries[J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2016, 8(1): e2016032.

- [7] Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance[J]. *Infect Drug Resist*, 2012, 5: 133-141.
- [8] 储雯雯,刘周,杨凯,等. 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌耐药机制及分子流行病学研究[J]. *安徽大学学报*, 2016, 51(6): 809-813.
- [9] Chen S, Hu F, Xu X, et al. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5): 2493-2494.
- [10] Cai JC, Zhou HW, Zhang R, et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolate possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(6): 2014-2018.
- [11] Qi Y, Wei Z, Ji S, et al. ST11, dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. *Antimicrob Chemother*, 2011, 66(2): 307-312.
- [12] 方莲花,吕扬,杜冠华,等. 秦皮的药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(23): 2732-2736.

(收稿日期:2017-04-22 修回日期:2017-07-21)

(上接第 3482 页)

采用常规静脉营养补充能量的患儿。但胆汁淤积综合征发生率差异无统计学意义($P>0.05$)。因此,本研究认为非营养性吸吮在预防胆汁淤积综合征上无明显价值。

综上所述,故早产儿在鼻胃管喂养期间辅非营养性吸吮是一种适宜的辅助喂养方法,但它在临床胆汁淤积综合征上的预防无明显作用。

参考文献

- [1] 侯德红,张琳,王金秀,等. 早产儿肠外营养相关性胆汁淤积的危险因素临床分析[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(34): 6043-6045.
- [2] Kamhawy H, Holditch-Davis D, Alsharkawy S, et al. Non-nutritive sucking for preterm infants in Egypt[J]. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 2014, 43(3): 330-340.
- [3] 扇敏娜. 早产儿管理诊治进展[J]. *西藏医药*, 2016, 37(1): 78-82.
- [4] Antunes JC, Nascimento MA. The non-nutritive sucking of premature newborn as a nursing technology[J]. *Rev Bras Enferm*, 2013, 66(5): 663-667.
- [5] 王梅芳. 非营养性吸吮促进早产儿胃肠道功能成熟的效果[J]. *江苏医药*, 2016, 42(1): 99-100.
- [6] Simbron AV, Sorbera-Ferrer L, Gomez De Ferraris ME, et al. Cyclical pattern of non-nutritive sucking in normal and high-risk neonates[J]. *Acta Odontol Latinoam*, 2013, 26

(3): 150-154.

- [7] 李雅丹,林新祝,黄静,等. 早产儿喂养不耐受的影响因素与治疗策略[J/CD]. *发育医学电子杂志*, 2015, 3(4): 212-215.
- [8] Liaw JJ, Yang L, Katherine KW, et al. Non-nutritive sucking and facilitated tucking relieve preterm infant pain during heel-stick procedures: a prospective, randomised controlled crossover trial[J]. *Int J Nurs Stud*, 2012, 49(3): 300-309.
- [9] 周婵. 改良式非营养性吸吮对重力鼻胃管喂养早产儿体重的影响观察[J]. *基层医学论坛*, 2016, 20(5): 720.
- [10] Standley JM, Cassidy J, Grant R, et al. The effect of music reinforcement for non-nutritive sucking on nipple feeding of premature infants[J]. *Pediatr Nurs*, 2010, 36(3): 138-145.
- [11] 吴艳,钟晓云,陈文,等. 超低出生体重儿住院情况回顾性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(1): 98-101.
- [12] Harding C. An evaluation of the benefits of non-nutritive sucking for premature infants as described in the literature[J]. *Arch Dis Child*, 2009, 94(8): 636-640.
- [13] 王爱珍,张振宇. 非营养性吸吮及穴位按摩对早产儿胃肠功能的影响[J]. *儿科药理学杂志*, 2013, 19(9): 30-33.

(收稿日期:2017-05-04 修回日期:2017-08-04)