

叔胺单体在制备抑制口腔及胃部幽门螺杆菌药物中的用途

技术领域

本发明属于抗幽门螺杆菌治疗技术领域，尤其涉及一种叔胺单体在制备抑制口腔及胃部幽门螺杆菌药物中的用途。

背景技术

目前，幽门螺杆菌是一种人类常见感染性病菌，它的感染已经成为一个全球性的卫生问题，全球超过一半的人感染了幽门螺杆菌，在我国的感染率为40-60%。幽门螺杆菌是多种疾病如慢性胃炎、胃溃疡、胃腺癌，甚至是黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等的危险因素。1994年世界卫生组织国际癌症研究机构（IARC）将幽门螺杆菌列为人类I类致癌原。67%~80%的胃溃疡和95%的十二指肠溃疡由幽门螺杆菌引起，约39%的胃癌与幽门螺杆菌感染密切相关。在全世界，胃癌每年影响着超过100万人，并造成超过70万人的死亡。

经口传播是幽门螺杆菌的主要传播方式，有大量研究表明不良口腔习惯，如缺少刷牙习惯等，会增加感染幽门螺杆菌的风险。同时，有流行病学研究表明幽门螺杆菌感染与牙周病、口腔白斑、扁平苔藓等口腔疾病之间存在相关性，联合口腔洁治与三联疗法治疗幽门螺杆菌感染的患者可提高根除胃幽门螺杆菌感染的成功率，并降低复发率。口腔是幽门螺杆菌的主要定殖场所和重要的储存库，然而现有药物治疗方法中缺乏有效防治口腔幽门螺杆菌感染的局部使用药物。幽门螺杆菌感染后最常用的治疗方法为以抗生素为代表的药物治疗，如质子泵抑制剂配合两种抗生素的三联疗法或质子泵抑制剂、两种抗生素联合铋剂的四联疗法。虽然不断有新的胃保护剂与抗生素的配合疗法或贯序疗法被运用于临床，但关于幽门螺杆菌抗生素耐药报道仍在不断增加，现有治疗方法很难达到对幽门螺杆菌的根除。据统计，三联疗法的根除率在62~66%，四联疗法的根除率在84~91%。除此之外，抗生素的不良使用容易使宿主菌群紊乱进而

说明书

导致疾病的发生发展。因此，亟待发展新的抗幽门螺杆菌药物来防治幽门螺杆菌感染及减少其抗生素耐药情况。

DMAEM (dodecylmethylaminoethyl methacrylate)是一种具备有 pH 敏感抗菌特性的新型叔胺单体，其在酸性环境中可质子化具有强效抗菌能力，同时可提升环境 pH 值抑制细菌滋生。DMAEM 的 pH 敏感的抗菌特性是其具有适应口腔及胃部环境 pH 变化的能力，能有效抑制口腔及胃部幽门螺杆菌。

通过上述分析，现有技术存在的问题及缺陷为：现有技术缺乏有效防治口腔幽门螺杆菌感染的局部使用药物；幽门螺杆菌抗生素耐药性逐年上升以及抗生素的不良使用易使宿主菌群紊乱进而导致疾病的发生发展。

解决以上问题及缺陷的难度为：世界卫生组织表明，抗生素新药开发不容乐观。现有大部分药品仍处于研发的早期阶段，仍然需要证明其有效性和安全性；同时新药与现有的治疗方法相比仍收效甚微，而针对关键耐药细菌——革兰氏阴性细菌的开发新药则很少。缺少有效抗幽门螺杆菌感染的新药研发。

解决以上问题及缺陷的意义为：幽门螺杆菌作为人类 I 类致癌原，且其感染率高，全球有超过一半的人感染，因此它的感染具有较大危害性。本技术提供有效抗幽门螺杆菌的新药物，降低幽门螺杆菌的经口传播；同时减少抗生素的全身使用，有利于降低抗生素不良使用导致的细菌耐药、菌群紊乱、宿主疾病的发生发展等。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种具备有 pH 敏感抗菌特性的新型叔胺单体在制备抑制口腔及胃部幽门螺杆菌药物中的用途。

本发明是这样实现的，一种具备有 pH 敏感抗菌特性的新型叔胺单体 (DMAEM , dodecylmethylaminoethyl methacrylate)在制备抑制口腔及胃部幽门螺杆菌药物中的用途。

进一步，所述新型叔胺单体作用于幽门螺杆菌后， MIC 为 8 μ g/mL；对于

说明书

幽门螺杆菌的 MBC 为 64 μ g/mL。即叔胺作用浓度在 $>8\mu$ g/mL 时能对幽门螺杆菌的生长繁殖及致病作用起到有效抑制，而在 $>64\mu$ g/mL 时能有效杀灭幽门螺杆菌。

本发明的另一目的在于提供一种所述用途中的新型叔胺单体作为抗幽门螺杆菌的新型材料的药效检测方法，所述检测方法包括：

步骤一，平板及液体培养基培养，确定药物最小抑菌浓度及最小杀菌浓度；

步骤二，药物作用下细菌菌量变化测定和药物对细菌毒力测定；

步骤三，细胞安全性检测。

进一步，所述步骤一中，平板培养具体过程为：

使用 10 μ L 一次性接种环，将幽门螺杆菌均匀涂抹于 CBA 固体培养基上，置于二氧化碳恒温孵箱，37 $^{\circ}$ C，微需氧条件下培养 24 小时；

所述微需氧条件为：5%氧气，10%二氧化碳和 85%氮气。

药物最小抑菌浓度及最小杀菌浓度 确定，具体过程为：

使用 10 μ L 一次性接种环，从 CBA 培养基上刮下新鲜菌体，置于 BHI 血清培养基中，交替使用枪尖吹打和涡旋振荡器充分混匀；

使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5 调节菌液 OD 值为 OD_{600nm}=0.3，稀释 10 倍，此时菌液浓度约为 1×10^5 CFU/mL；菌液加入无菌 96 孔板，体系为 100 μ L，加入 98 μ L 菌悬液与 2 μ L 2 倍连续稀释后的 DMAEM，使药物浓度为 0、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128 μ g/mL，置于孵箱中培养 24 小时；后观察菌液清亮的最低药物浓度组为该药物 MIC，每个药物作用浓度吸取 2 μ L 垂直悬空滴加于 CBA 培养基，培养 24 小时后，无菌落生成的最低药物浓度为该药物的 MBC，该实验设置三组平行样本。

进一步，所述步骤二中，药物作用下细菌菌量变化测定过程为：制备活菌菌量标准曲线和菌量测定；

制备活菌菌量标准曲线具体过程为：

使用无菌 10 μ L 一次性接种环刮下 CBA 固体培养基上菌体置于 PBS，混匀，

说明书

调节 OD_{600nm}=1, 菌液浓度约为 1×10^8 CFU/mL; 依次 10 倍梯度稀释, 得到 1×10^8 CFU/mL、 1×10^7 CFU/mL、 1×10^6 CFU/mL、 1×10^5 CFU/mL 和 1×10^4 CFU/mL 浓度菌液各 1mL; 该实验设置三组平行样本, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作; 将上述中所得样本通过 5000g 离心 10 分钟, 以提取的 DNA 为模板, 使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒, 采用 12.5 μL 体系, 在 LightCycler 480 II System 实时荧光定量 PCR 仪上运行, 检测幽门螺杆菌 16S rDNA 基因; 以细菌浓度的对数值作为横坐标 x 值, 上一步得到的 CT 值为纵坐标 y 值绘制回归曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 所得实验数据的统计学分析使用软件 SPSS 16.0 完成;

菌量测定过程为: 使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5 检测细菌 OD 值; 取各药物浓度菌液 1mL, 提取细菌 DNA, 通过 qPCR 获得 CT 值, 并通过上述得到公式进行活菌菌量测定;

药物对细菌毒力测定具体过程为:

在测得 DMAEM 对幽门螺杆菌的 MIC 为 8μg/mL, 在 MIC 以下, 取药物浓度为 0、0.5、1、2、4、8μg/mL 作用于幽门螺杆菌并孵育 24 小时; 富集菌液 1mL, 5000rpm 离心 10 分钟, Trizol 重悬;

提取细菌 RNA: 转移至加有氧化锆磁珠的破壁管中, 液氮冷却, 在高速组织匀浆机中破碎细胞; 冰浴 2-5 分钟, 待破壁过程产生的气泡逐渐消失; 加入 350 μL“氯仿: 异戊醇 (24:1)”溶液, 涡旋振荡器震荡 15 秒, 静置 10 分钟; 13000 rpm, 4℃, 离心 15 分钟; 吸取 400μL 上层澄清液体, 转移至新的无酶 EP 管内; 依次加入已预冷的 350 μL 高盐溶液和 250 μL 异丙醇, 上下颠倒 EP 管数次以充分混匀, 静置 10 分钟; 13000 rpm, 4℃, 离心 15 分钟; 弃去上清液, 13000 rpm, 4℃, 离心 2 分钟, 小心去尽上清液; 向沉淀中加入 1 mL 提前预冷的 70%乙醇溶液, 上下颠倒 EP 管数次, 13000 rpm, 4℃条件下离心 5 分钟; 弃去上清, 自然风干底部沉淀; 根据底部沉淀多少, 加入 40-70μL 无酶水; 65℃水浴 10 分钟, 使用无酶枪尖吹打混匀; 使用 NanoDrop 2000 分光光度计测定 RNA 的浓度和纯

度；

RNA 纯化及反转录：使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒，去除 RNA 样本中的 DNA 进行纯化及后续的 RNA 反转录过程。

进一步，所述实时荧光定量反转录聚合酶链式反应：以反转录后的 cDNA 为模板，每个样本设置 4 个复孔，使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒，采用 20 μL 体系；在 LightCycler 480 II System 实时荧光定量 PCR 仪上运行，确定反应条件；以幽门螺杆菌管家基因 16S rRNA 为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行幽门螺杆菌 16S rRNA、VacA、CagA、UreaB、FlaA、LuxS 的表达检测。

进一步，所述步骤三中，细胞安全性检测过程为：

96 孔板里，接种 1×10^4 个 HOK 细胞或 L929 细胞，于 5% CO₂ 细胞培养箱、37℃ 过夜孵育；细胞贴壁后，吸去原培养基，加入新鲜 100μL 含不同浓度 DMAEM 的 DMEM 培养基，在 37℃ 细胞培养箱孵育；每组 6 个复孔，24 h 后，利用 CCK8 试剂盒进行细胞增殖毒性检测。

进一步，所述细胞安全性检测过程还包括：吸去原培养基，PBS 洗三遍，加入 100μL 含 10% CCK8 试剂的 DMEM 培养基，37℃ 细胞培养箱内避光孵育；1~2 小时后，吸取上清转移到新的 96 孔板，在酶标仪下读取 A450 的光吸收值。

本发明的另一目的在于提供一种抑制口腔及胃部幽门螺杆菌的检测试剂盒，所述抑制口腔及胃部幽门螺杆菌的检测试剂盒包含所述新型叔胺单体。

本发明的另一目的在于提供一种所述新型叔胺单体在制备抗幽门螺杆菌及幽门螺杆菌导致的慢性胃炎、胃溃疡、胃腺癌、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的相关疾病药物中的应用。本发明还以在牙科材料（如树脂充填材料、窝沟封闭材料、根管充填材料等）添加叔胺中进行应用。

结合上述的所有技术方案，本发明所具备的优点及积极效果为：

（1）本发明具备 pH 敏感特性，能有效抑制及杀灭口腔及胃部幽门螺杆菌，能有效抗幽门螺杆菌的口腔及胃部感染定植，降低罹患由幽门螺杆菌感染所导致的胃部及全身疾病几率。

说明书

(2) 本发明作用浓度在 $>8\mu\text{g/mL}$ 时即可起到对幽门螺杆菌的有效抑制作用, 在 $>64\mu\text{g/mL}$ 时即可有效杀灭幽门螺杆菌, 具有较强的抗幽门螺杆菌特性。可作用于口腔、环境等达到局部有效抗菌, 从源头减少幽门螺杆菌感染风险。

(3) 将新型叔胺单体作用于幽门螺杆菌的新型材料的药效检测方法, 包括平板及液体培养基培养, 确定药物最小抑菌浓度及最小杀菌浓度; 药物作用下细菌菌量测定及药物对细菌毒力水平影响测定; 细胞安全性检测等, 这些方法能有效检测新药对幽门螺杆菌的杀伤及抑制作用并能体现药物的细胞安全性, 能对抗幽门螺杆菌新药提供指导。

(4) 对比的技术效果或者实验效果。新型 pH 敏感的叔胺单体能有效抗口腔及胃部幽门螺杆菌, 并能在不同环境中根据环境 pH 变化从而质子化-去质子化智能响应, 具有良好的生物相容性, 是一种安全有效的抗幽门螺杆菌药物。

本发明具有较强抗幽门螺杆菌生长及增殖效果, 从而减少抗生素的不良使用, 进而减少抗生素耐药及其导致的宿主菌群紊乱的问题。

附图说明

图 1 是本发明实施例提供的抗幽门螺杆菌的新型材料检测方法流程图。

图 2 是本发明实施例提供的 DMAEM 作用于幽门螺杆菌后效果示意图。

图 3 是本发明实施例提供的在 DMAEM 作用于幽门螺杆菌的 OD 值检测示意图。

图 4 是本发明实施例提供的 DMAEM 作用于幽门螺杆菌后进行的 qPCR 细菌定量检测示意图。

图 5 是本发明实施例提供的 DMAEM 在低于 MIC 浓度时作用于幽门螺杆菌检测示意图。

图 6 是本发明实施例提供的 DMAEM 作用于口腔上皮细胞 HOK 的 CCK8 检测示意图。

图 7 是本发明实施例提供的 DMAEM 作用于小鼠成纤维细胞 L929 的 CCK8

检测示意图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种抗幽门螺杆菌的新型材料制备方法，下面结合附图对本发明作详细的描述。

本发明提供的抗幽门螺杆菌的新型材料制备方法业内的普通技术人员还可以采用其他的步骤实施，图 1 的本发明提供的抗幽门螺杆菌的新型材料制备方法仅仅是一个具体实施例而已。

本发明提供一种具备有 pH 敏感抗菌特性的新型叔胺单体（DMAEM，dodecylmethylaminoethyl methacrylate)在制备抑制口腔及胃部幽门螺杆菌药物中的用途。

所述新型叔胺单体作用于幽门螺杆菌后，培养基的最低浓度为 MIC 为 $8\mu\text{g/mL}$ ；对于幽门螺杆菌的 MBC 为 $64\mu\text{g/mL}$ 。

如图 1 所述，本发明实施例提供的抗幽门螺杆菌的新型材料检测方法，包括：S101：平板培养，确定药物最小抑菌浓度及最小杀菌浓度的确定；

S102：药物作用下细菌菌量变化测定和药物对细菌毒力测定；

S103：细胞安全性检测。

本发明实施例提供的 S101 中，平板培养具体过程为：

使用 $10\mu\text{L}$ 一次性接种环，将幽门螺杆菌均匀涂抹于 CBA 固体培养基上，置于二氧化碳恒温孵箱， 37°C ，微需氧条件下培养 24 小时。

所述微需氧条件为：5%氧气，10%二氧化碳和 85%氮气。

本发明实施例提供的 S101 中，药物最小抑菌浓度及最小杀菌浓度确定，具体过程为：

说明书

使用 10 μ L 一次性接种环，从 CBA 培养基上刮下新鲜菌体，置于 BHI 血清培养基中，交替使用枪尖吹打和涡旋振荡器充分混匀；

使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5 调节菌液 OD 值为 OD_{600nm}=0.3，稀释 10 倍，此时菌液浓度约为 1 \times 10⁵ CFU/mL；菌液加入无菌 96 孔板，体系为 100 μ L，加入 98 μ L 菌悬液与 2 μ L 2 倍连续稀释后的 DMAEM，使药物浓度为 0、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128 μ g/mL，置于孵箱中培养 24 小时；后观察菌液清亮的最低药物浓度组为该药物 MIC，每个药物作用浓度吸取 2 μ L 垂直悬空滴加于 CBA 培养基，培养 24 小时后，无菌落生成的最低药物浓度为该药物的 MBC。该实验设置三组平行样本。

本发明实施例提供的 S102 中，药物作用下细菌菌量变化测定过程为：制备活菌菌量标准曲线和菌量测定；

制备活菌菌量标准曲线具体过程为：

使用无菌 10 μ L 一次性接种环刮下 CBA 固体培养基上菌体置于 PBS，混匀，调节 OD_{600nm}=1，菌液浓度约为 1 \times 10⁸ CFU/mL；依次 10 倍梯度稀释，得到 1 \times 10⁸ CFU/mL、1 \times 10⁷ CFU/mL、1 \times 10⁶ CFU/mL、1 \times 10⁵ CFU/mL 和 1 \times 10⁴ CFU/mL 浓度菌液各 1mL；该实验设置三组平行样本，按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作；将上述中所得样本通过 5000g 离心 10 分钟，以提取的 DNA 为模板，使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒，采用 12.5 μ L 体系，在 LightCycler 480 II System 实时荧光定量 PCR 仪上运行，检测幽门螺杆菌 16S rDNA 基因；以细菌浓度的对数值作为横坐标 x 值，上一步得到的 CT 值为纵坐标 y 值绘制回归曲线，得到标准方程 y=kx+b。所得实验数据的统计学分析使用软件 SPSS 16.0 完成。

菌量测定过程为：使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5 检测细菌 OD 值；取各药物浓度菌液 1mL，提取细菌 DNA，通过 qPCR 获得 CT 值，并通过上述得到公式进行活菌菌量测定。

本发明实施例提供的 S102 中，药物对细菌毒力测定具体过程为：

说明书

在测得 DMAEM 对幽门螺杆菌的 MIC 为 $8\mu\text{g/mL}$ ，在 MIC 以下，取药物浓度为 0、0.5、1、2、4、 $8\mu\text{g/mL}$ 作用于幽门螺杆菌并孵育 24 小时；富集菌液 1mL，5000rpm 离心 10 分钟，Trizol 重悬；

提取细菌 RNA：转移至加有氧化锆磁珠的破壁管中，液氮冷却，在高速组织匀浆机中破碎细胞；冰浴 2-5 分钟，待破壁过程产生的气泡逐渐消失；加入 350 μL “氯仿：异戊醇（24:1）”溶液，涡旋振荡器震荡 15 秒，静置 10 分钟；13000 rpm， 4°C ，离心 15 分钟；吸取 400 μL 上层澄清液体，转移至新的无酶 EP 管内；依次加入已预冷的 350 μL 高盐溶液和 250 μL 异丙醇，上下颠倒 EP 管数次以充分混匀，静置 10 分钟；13000 rpm， 4°C ，离心 15 分钟；弃去上清液，13000 rpm， 4°C ，离心 2 分钟，小心去尽上清液；向沉淀中加入 1 mL 提前预冷的 70%乙醇溶液，上下颠倒 EP 管数次，13000 rpm， 4°C 条件下离心 5 分钟；弃去上清，自然风干底部沉淀；根据底部沉淀多少，加入 40-70 μL 无酶水； 65°C 水浴 10 分钟，使用无酶枪尖吹打混匀；使用 NanoDrop 2000 分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。

RNA 纯化及反转录：使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒（去除 RNA 样本中的 DNA 进行纯化及后续的 RNA 反转录过程。

实时荧光定量反转录聚合酶链式反应：以反转录后的 cDNA 为模板，每个样本设置 4 个复孔，使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒，采用 20 μL 体系；在 LightCycler 480 II System 实时荧光定量 PCR 仪上运行，确定反应条件；以幽门螺杆菌管家基因 16S rRNA 为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行幽门螺杆菌 16S rRNA、VacA、CagA、UreaB、FlaA、LuxS 的表达检测。

本发明实施例提供的 S103 中，细胞安全性检测具体过程为：

96 孔板里，接种 1×10^4 个 HOK 细胞或 L929 细胞，于 5% CO_2 细胞培养箱、 37°C 过夜孵育；细胞贴壁后，吸去原培养基，加入新鲜 100 μL 含不同浓度 DMAEM 的 DMEM 培养基，在 37°C 细胞培养箱孵育；每组 6 个复孔，24 h 后，利用 CCK8 试剂盒进行细胞增殖毒性检测。

说明书

具体过程为：吸去原培养基，PBS 洗三遍，加入 100 μ L 含 10% CCK8 试剂的 DMEM 培养基，37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内避光孵育；1~2 小时后，吸取上清转移到新的 96 孔板，在酶标仪下读取 A450 的光吸收值。

下面结合具体实施例对本发明的技术方案作详细的描述。

幽门螺杆菌标准菌株 G27。

哥伦比亚血琼脂（Columbia blood agar, CBA）培养基：CBA 粉末（Oxoid, Basingstoke, 英国）15.6g，加灭菌去离子水 400mL 溶解，高温高压灭菌。微波炉加热至完全融化，60 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟，待培养基冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右，加入 100mL 无菌脱纤维绵羊血（Solarbio, 中国），八字法混匀。迅速倒入无菌平板，待完全冷却凝固。封口膜封口，置于 4 $^{\circ}$ C 保存，1 月内使用。

脑心浸液肉汤（Brian Heart Infusion, BHI）血清培养基：BHI 粉末（Becton, Dickinson and Company, 美国）14.8g，加灭菌去离子水 400mL 溶解，使用 0.22 μ m 微孔滤膜滤菌，加入 100mL 无菌胎牛血清（Gibco, 澳大利亚），混匀，置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

新型材料的抗幽门螺杆菌活性测试

1、平板培养：使用 10 μ L 一次性接种环，将幽门螺杆菌均匀涂抹于 CBA 固体培养基上，置于二氧化碳恒温孵箱（Thermo, 美国），37 $^{\circ}$ C，微需氧条件（5% 氧气，10% 二氧化碳和 85% 氮气）下培养 24 小时。

2、药物最小抑菌浓度（minimum inhibitory concentration, MIC）及最小杀菌浓度（minimum bactericidal concentration, MBC）确定：使用 10 μ L 一次性接种环，从 CBA 培养基上刮下新鲜菌体，置于 BHI 血清培养基中，交替使用枪尖吹打和涡旋振荡器充分混匀。使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5（Molecular Devices, 美国）调节菌液 OD 值为 OD_{600nm}=0.3，稀释 10 倍，此时菌液浓度约为 1×10^5 CFU/mL。菌液加入无菌 96 孔板，体系为 100 μ L，加入 98 μ L 菌悬液与 2 μ L 2 倍连续稀释后的 DMAEM，使药物浓度为 0、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128 μ g/mL，置于孵箱中培养 24 小时。后观察菌液清亮的最低药物浓度

说明书

组为该药物 MIC。每个药物作用浓度吸取 2 μ L 垂直悬空滴加于 CBA 培养基，培养 24 小时后，无菌落生成的最低药物浓度为该药物的 MBC。该实验设置三组平行样本。

3、药物作用下细菌菌量变化测定：

(1) 制备活菌菌量标准曲线

使用无菌 10 μ L 一次性接种环刮下 CBA 固体培养基上菌体置于 PBS(Gibco, 澳大利亚)，混匀，调节 OD_{600nm}=1，菌液浓度约为 1 $\times 10^8$ CFU/mL。依次 10 倍梯度稀释，得到 1 $\times 10^8$ CFU/mL、1 $\times 10^7$ CFU/mL、1 $\times 10^6$ CFU/mL、1 $\times 10^5$ CFU/mL 和 1 $\times 10^4$ CFU/mL 浓度菌液各 1mL。该实验设置三组平行样本。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 中国) 说明书操作。将上述中所得样本通过 5000g 离心 10 分钟。以提取的 DNA 为模板，使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (Tli RNase H Plus, Takara, 日本)，采用 12.5 μ L 体系，在 LightCycler 480 II System (Forrenstrasse 2,6343 Rotkreuz, 瑞士) 实时荧光定量 PCR 仪上运行。检测幽门螺杆菌 16S rDNA 基因。以细菌浓度的对数值作为横坐标 x 值，上一步得到的 CT 值为纵坐标 y 值绘制回归曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ 。所得实验数据的统计学分析使用软件 SPSS 16.0 (SPSS Inc., 美国) 完成。

(2) 菌量测定

使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5 (Molecular Devices, 美国) 检测细菌 OD 值；取各药物浓度菌液 1mL，提取细菌 DNA，通过 qPCR 获得 CT 值，并通过上述得到公式进行活菌菌量测定。

4、药物对细菌毒力测定：在第 2 步中测得 DMAEM 对幽门螺杆菌的 MIC 为 8 μ g/mL。在 MIC 以下，取药物浓度为 0、0.5、1、2、4、8 μ g/mL 作用于幽门螺杆菌并孵育 24 小时。富集菌液 1mL，5000rpm 离心 10 分钟，Trizol (Invitrogen 公司，美国) 重悬。

(1)提取细菌 RNA: 转移至加有氧化锆磁珠(直径 0.1 mm)的破壁管(Fastprep tube, Betin 公司，中国)中，液氮冷却，在高速组织匀浆机 (Bertin 公司，法

说明书

国)中破碎细胞;冰浴 2-5 分钟,待破壁过程产生的气泡逐渐消失;加入 350 μL “氯仿:异戊醇(24:1)”溶液(Solarbio 公司,中国),涡旋振荡器震荡 15 秒,静置 10 分钟;13000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 15 分钟;吸取 400 μL 上层澄清液体(勿触及白色破碎组织沉淀),转移至新的无酶 EP 管内。依次加入已预冷的 350 μL 高盐溶液(Takara, 中国)和 250 μL 异丙醇,上下颠倒 EP 管数次以充分混匀,静置 10 分钟;13000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 15 分钟;弃去上清液,13000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 2 分钟,小心去尽上清液;向沉淀中加入 1 mL 提前预冷的 70%乙醇溶液,上下颠倒 EP 管数次,13000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 分钟;弃去上清,自然风干底部沉淀;根据底部沉淀多少,加入 40-70 μL 无酶水;65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 分钟,使用无酶枪尖吹打混匀;使用 NanoDrop 2000 分光光度计(Gene Company Limited, 中国)测定 RNA 的浓度和纯度。

(2) RNA 纯化及反转录:使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(Taraka Bio Inc, Otsu, 日本)去除 RNA 样本中的 DNA 进行纯化及后续的反转录过程。

(3) 实时荧光定量反转录聚合酶链式反应(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR):以反转录后的 cDNA 为模板,每个样本设置 4 个复孔,使用 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II 试剂盒(Tli RNase H Plus, Takara, 日本),采用 20 μL 体系。在 LightCycler 480 II System (Forrenstrasse 2,6343 Rotkreuz, 瑞士)实时荧光定量 PCR 仪上运行,反应条件如表 2-4 所示。以幽门螺杆菌管家基因 16S rRNA 为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行幽门螺杆菌 16S rRNA、*VacA*、*CagA*、*UreaB*、*FlaA*、*LuxS* 的表达检测。

5、细胞安全性检测:96 孔板里,接种 1×10^4 个 HOK 细胞或 L929 细胞,于 5% CO_2 细胞培养箱、37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。细胞贴壁后,吸去原培养基,加入新鲜 100 μL 含不同浓度 DMAEM (0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 DMEM 培养基,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱孵育。每组 6 个复孔。24 h 后,利用 CCK8 试剂盒(APEX-BIO)进行细胞增殖毒性检测。具体操作步骤为:吸去原培养基,PBS 洗三遍,加入 100 μL 含 10% CCK8

说明书

试剂的 DMEM 培养基，37℃细胞培养箱内避光孵育。1~2 小时后，吸取上清转移到新的 96 孔板，在酶标仪下读取 A450 的光吸收值。

本发明由于口腔和胃部幽门螺杆菌感染具有不同的 pH 环境，且针对现有条件下缺乏有效治疗幽门螺杆菌感染的局部药物，及幽门螺杆菌抗生素耐药率逐年上升的情况，本发明首次结合 DMAEM 的 pH 敏感特性，将 DMAEM 作用于幽门螺杆菌，发现其对幽门螺杆菌具有显著的杀菌作用，可有效防治幽门螺杆菌感染；同时检测 DMAEM 具有良好生物安全性。

下面结合实验对本发明的技术方案作进一步的描述。

图 2 是 DMAEM 作用于幽门螺杆菌后，通过肉眼观察培养基清亮的最低浓度为 MIC，为 8μg/mL。细菌涂板在 64μg/mL 时无菌落生成，说明 DMAEM 药物对于幽门螺杆菌的 MBC 为 64μg/mL；

图 3 是在 DMAEM 作用于幽门螺杆菌的 OD 值检测，可见在 8μg/mL 浓度是，细菌 OD 值大幅度降低，表明此时为药物作用于细菌的 MIC 值；

图 4 是 DMAEM 作用于幽门螺杆菌后进行的 qPCR 细菌定量，药物浓度在 8μg/mL 和 64μg/mL 时细菌浓度出现大幅度降低，表明这两个浓度分别是药物作用于幽门螺杆菌的 MIC 和 MBC；

图 5 是 DMAEM 在低于 MIC 浓度时作用于幽门螺杆菌，幽门螺杆菌主要的毒力因子表达程度。由于 DMAEM 对细菌具有强烈抑制作用，在低于 MIC 浓度时，细菌毒力因子表达量大幅度升高。而在 MIC 浓度时，毒力因子表达量降低；

图 6 是 DMAEM 作用于口腔上皮细胞 HOK 的 CCK8 检测，表明 DMAEM 具有良好的生物安全性；

图 7 是 DMAEM 作用于小鼠成纤维细胞 L929 的 CCK8 检测，表明 DMAEM 具有良好的生物安全性。

以上所述，仅为本发明的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，都应涵盖在本发明的

保护范围之内。