

幽门螺杆菌表型与毒力的相关性研究

陈玉礼, 韦红玉, 唐华英, 赵丽娟, 曾 怡[▲]
(右江民族医学院微生物与免疫学教研室, 百色 533000)

【摘要】 目的 明确幽门螺杆菌表型与毒力的相关性, 掌握幽门螺杆菌的生物学特征, 为临床快速了解幽门螺杆菌的毒力并通过减毒方法防治幽门螺杆菌提供实验依据。方法 配制含有合适浓度的甲硝唑培养液, 用倍比稀释法使培养液中甲硝唑的浓度为 0 $\mu\text{g/ml}$ 、2 $\mu\text{g/ml}$ 、4 $\mu\text{g/ml}$ 、8 $\mu\text{g/ml}$ 、16 $\mu\text{g/ml}$ 、32 $\mu\text{g/ml}$, 分别培养幽门螺杆菌, 诱导幽门螺杆菌的形态发生球形变, 然后用革兰染色镜下观察培养 12 h、24 h、48 h 时在不同抗生素浓度下幽门螺杆菌形态学的变化, 并用 Real-time PCR 法检测不同形态学下其细胞毒素相关基因 A (CagA) 和空泡毒素基因 (VacA) 毒力基因的表达。结果 培养 12 h 时幽门螺杆菌的形态未发生变化; 当培养 24 h 时在 16 $\mu\text{g/ml}$ 、32 $\mu\text{g/ml}$ 浓度抗生素下, 一部分幽门螺杆菌由螺旋状变成了短杆状; 培养 48 h 时在 16 $\mu\text{g/ml}$ 、32 $\mu\text{g/ml}$ 浓度抗生素下, 幽门螺杆菌几乎全部变成了圆球状, 其他抗生素浓度下的幽门螺杆菌没有形态学变化, 且球形变时幽门螺杆菌的 CagA 和 VacA 表达下降。结论 幽门螺杆菌表型与毒力有密切的关系, 抗生素能诱导幽门螺杆菌发生形态学变化且球形变的幽门螺杆菌毒力下降。

【关键词】 幽门螺杆菌; 抗生素; 表型; 毒力变化

中图分类号: R378 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1003-1383.2018.03.003

Study on relationship between phenotype and virulence of *Helicobacter pylori*

CHEN Yuli, WEI Hongyu, TANG Huaying, ZHAO Lijuan, ZENG Yi[▲]

(Department of Microbiology and Immunology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

【Abstract】 Objective To clarify relationship between the phenotype and virulence of *Helicobacter pylori* and to grasp the biological characteristics of *Helicobacter pylori*, so as to provide experimental evidence for the clinical understanding of the virulence of *Helicobacter pylori* and the prevention and treatment of it by detoxification. **Methods** Metronidazole medium containing suitable concentration was prepared. The concentration of metronidazole in the culture medium was 0 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$ by double dilution method, and they were respectively used to culture *Helicobacter pylori*. The morphology of *Helicobacter pylori* was induced to be spherical. And then, the morphological changes of *Helicobacter pylori* at different concentrations of antibiotics were observed under Gram staining microscope at 12 h, 24 h and 48 h. In addition, the expression of cytotoxin associated gene (CagA) and vacuolating cytotoxin gene A (VacA) under different morphology were detected by real time PCR. **Results** The morphology of *Helicobacter pylori* did not change when culturing for 12 h, while some *Helicobacter pylori* changed from spiral to short rod under concentrations of 16 $\mu\text{g/ml}$ and 32 $\mu\text{g/ml}$ when culturing for 24 h. When culturing for 48 h, almost all of the *Helicobacter pylori* became globular at the concentration of 16 $\mu\text{g/ml}$ and 32 $\mu\text{g/ml}$, but no morphological changes were found in other concentrations of antibiotics. Furthermore, the expression of CagA and VacA genes in *Helicobacter pylori* decreased during globular change. **Conclusion** The phenotype of *Helicobacter pylori* is closely related to its virulence. Antibiotics can induce morphological changes of *Helicobacter pylori* and decrease the virulence of the globular *Helicobacter pylori*.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; antibiotics; phenotype; virulence change

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 与人体胃、十二指肠疾病密切相关, 也是胃癌演变的始动因子

之一。目前 Hp 在全世界感染率超过 50%, 一些不发达地区甚至可超过 80%^[1]。1994 年世界卫生组织

基金项目: 广西硕士研究生创新项目 (201601002)

作者简介: 陈玉礼, 女, 医学硕士, 研究方向: 病毒基因调控。E-mail: 1032212879@qq.com

▲通信作者: 曾 怡。E-mail: 47675297@qq.com

织(WHO) 已将 Hp 列为第一类生物致癌因子, 2012 年 2 月中国疾病预防控制中心对 2008 年中国的癌症死亡人数进行报道, 其中因为胃癌死亡 73.6 万例, 在恶性肿瘤死亡率中排第二位, 可见 Hp 严重危害人类健康。细胞毒素相关基因 A(CagA) 是 CagA PAI 中主要的毒力基因, 编码的 CagA 蛋白分子量为 120~145 kDa, 其 5' 端长约 900 个氨基酸, 为保守区, 3' 端由若干不等的重复序列组成, 为可变区^[2]。另外, 分子流行病学调查发现空泡毒素基因(VacA) 也是主要的致病因子, CagA+/VacA+ 的 Hp 患者消化道溃疡和胃癌的发生率明显升高^[3]。有学者提出 Hp 感染复发可能与细菌的球形变有关, 并推测球形 Hp 可潜伏在机体中, 当机体内环境适合 Hp 生长繁殖时便可引起疾病的再次发作^[4]。那么伴随着 Hp 的形态变化, 其毒力将会如何改变? 这种改变是表型的变化抑或是基因的变化呢? 本研究通过采用抗生素的诱变作用, 使 Hp 发生球形变, 明确幽门螺杆菌表型与毒力的相关性, 掌握幽门螺杆菌的生物学特征, 为临床快速了解幽门螺杆菌的毒力并通过减毒方法防治幽门螺杆菌提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 材料 菌株是 26695 标准菌株, 由本实验所保存, 马血清、革兰染色试剂盒、CO₂ 产气袋、脑心浸液培养基、提取 RNA 试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒均购自卓一生物技术有限公司。实验用的仪器有: 高速冷冻离心机、涡旋振荡器、普通 PCR 扩增仪、电子天平、恒温培养箱、恒温水浴箱、电子显微镜、超净工作台、超纯水机、超低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 幽门螺杆菌液体培养基(脑心浸液培养基) 配制 脑心浸液培养基按照说明配制, 高压灭菌冷却后, 每 100 ml 的培养基中加入 5~10 ml 的马血清, 放入 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 用倍比稀释法配制含有不同浓度甲硝唑的幽门螺杆菌培养基 称取适量的甲硝唑, 用配制好的脑心浸液培养基溶解成甲硝唑浓度为 32 μg/ml 的培养液, 然后对此溶液进行 2 倍的倍比稀释: 用灭菌 1 ml 吸管吸取上述配制好的 32 μg/ml 抗生素溶液 5 ml, 沿管壁徐徐注入含有 5 ml 脑心浸液培养基试管中, 轻摇混匀, 记为 16 μg/ml 稀释度含抗生素培养液。另取灭菌 1 ml 吸管, 按照上述操作方法, 进行 2 倍递增稀释。如此每递增稀释一次, 即换用 1 支 1

ml 灭菌吸管, 依次稀释至 2 μg/ml 稀释度含抗生素培养液, 最终配制成 0 μg/ml、2 μg/ml、4 μg/ml、8 μg/ml、16 μg/ml、32 μg/ml 6 组不同浓度甲硝唑的幽门螺杆菌培养基。

1.2.3 在不同浓度甲硝唑的培养基下培养后革兰染色镜下幽门螺杆菌的形态学变化 将等量标准菌株菌液分别接种到含有不同浓度的甲硝唑的培养液中, 然后置于微需氧的环境中(10%CO₂、5%O₂、85%N₂) , 分别培养 12 h、24 h、48 h 后进行革兰染色, 并放在镜下观察幽门螺杆菌形态。

革兰染色镜检步骤: (1) 涂片: 用接种环取两环培养的菌液, 放到洁净的玻璃片上划线的区域, 均匀涂开, 尽量涂薄, 自然干燥。(2) 固定: 将玻片用夹子夹着在酒精灯火焰上方 2~3 cm 处, 来回 3 遍, 以固定菌体在玻片上。(3) 初染: 菌体区域滴加龙胆紫溶液, 轻轻晃动玻片使其全部覆盖菌体区域, 染液停留 1 min, 用自来水轻轻冲洗玻片, 并尽量沥干水分。(4) 媒染: 在菌体区域滴加碘溶液使其覆盖全部菌体区域, 染液停留 1 min 左右, 用自来水轻轻冲洗玻片, 沥干水分。(5) 脱色: 在菌体区域滴加 95% 酒精溶液使其覆盖全部菌体区域, 停留 30 s 左右, 用自来水轻轻冲洗玻片, 沥干水分。(6) 复染: 在菌体区域滴加沙黄溶液使其覆盖全部菌体区域, 停留 1~2 min, 用自来水轻轻冲洗玻片, 沥干水分, 并自然干燥。(7) 观察: 待标本干燥后置于光学显微镜下, 观察细菌的染色特征以及形态特征。

1.2.4 Real-time PCR 检测幽门螺杆菌不同形态下毒力因子的表达 将螺杆菌状的幽门螺杆菌和圆球状的幽门螺杆菌按照提取 RNA 试剂盒说明书步骤分别提取总 RNA, 然后用逆转录试剂盒将 RNA 进行逆转录成 cDNA, 最后用 Real-time PCR SYBR Green I 法检测幽门螺杆菌相关基因(CagA 和 VacA) 表达。其 qPCR 反应的引物设计、反应体系的配制及反应程序见表 1~表 3。

表 1 qPCR 反应的引物设计

基因指标	引物序列
CagA-F	TTCAGACTTTATCAATAA
CagA-R	TCCTGCAAAAAGATTGTTTG
VacA-F	CGTGATCATTCAGCCATTG
VacA-R	ACCTCCATCAATCTTACTGG
gyrB-F	CGCTAAAGAAAGTGGCACGA
gyrB-R	TGCGCGTTTCTTCATCCAT

表 2 qPCR 反应体系的配制

试剂	50 μ L 反应体系	终浓度
2 \times UltraSYBR Mixture	25 μ L	1 \times
Forward Primer ,10M	1 μ L	0.2 μ M
Reverse Primer ,10M	1 μ L	0.2 μ M
Template DNA	2 μ L	
ddH ₂ O	Up to 50 μ L	

表 3 qPCR 反应程序

步骤	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min
变性	95 $^{\circ}$ C	15 s
退火/延伸	60 $^{\circ}$ C	1 min
35~40 个循环		
溶解曲线分析		
	95 $^{\circ}$ C	
	60 $^{\circ}$ C	
	95 $^{\circ}$ C	
	60 $^{\circ}$ C	

杆菌的形态学变化 幽门螺杆菌在培养 12 h 时革兰染色发现 6 组不同浓度的幽门螺杆菌的形态学没有明显的变化。如表 4。幽门螺杆菌形态变为圆球状从多到少依次定为“++++” “+++” “++” “+” “-” 5 个等级(每个+大约代表了 25%的幽门螺杆菌球形变) ; 培养 24 h 时发现只有在 32 μ g/ml 和 16 μ g/ml 浓度下幽门螺杆菌开始有螺杆菌状变成短杆状 , 少部分变成了圆球状。如表 5。当培养 48 h 时发现在 32 μ g/ml 和 16 μ g/ml 浓度下幽门螺杆菌几乎都变成圆球状 , 而 0 μ g/ml、2 μ g/ml、4 μ g/ml、8 μ g/ml 浓度幽门螺杆菌的形态学几乎没什么变化。如表 6。图 1 是螺杆菌状幽门螺杆菌的革兰染色图片 , 图 2 是抗生素诱导下螺杆菌状幽门螺杆菌部分变成了短杆状 , 图 3 是在抗生素长时间的诱导下幽门螺杆菌由短杆状变成了圆球形。

2.2 用 Real-time PCR 检测不同形态下幽门螺杆菌的毒力因子的变化 Real-time PCR 结果如图 4 显示 , 用甲硝唑诱导后变成圆球状的幽门螺杆菌比诱导前螺旋状态的幽门螺杆菌的毒力因子 VacA 和 CagA 降低。

2 结 果

2.1 在不同时间不同浓度甲硝唑的作用下幽门螺

表 4 不同浓度抗生素(甲硝唑) 诱导 12 h 时幽门螺杆菌的形态变化

形状	0 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	8 μ g/ml	16 μ g/ml	32 μ g/ml
螺旋形	++++	++++	++++	++++	++++	+++
圆球形	—	—	—	—	—	—

表 5 不同浓度抗生素(甲硝唑) 诱导 24 h 时幽门螺杆菌的形态变化

形状	0 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	8 μ g/ml	16 μ g/ml	32 μ g/ml
螺旋形	++++	++++	++++	++++	++	+
圆球形	—	—	—	—	+	++

表 6 不同浓度抗生素(甲硝唑) 诱导 48 h 时幽门螺杆菌的形态变化

形状	0 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	8 μ g/ml	16 μ g/ml	32 μ g/ml
螺旋形	++++	++++	++++	++++	—	—
圆球形	—	—	—	—	++++	++++

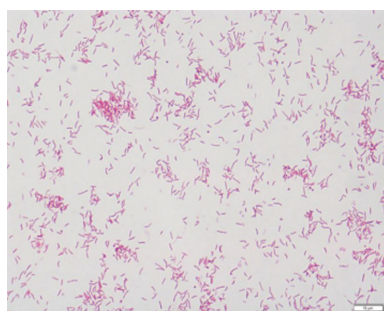


图 1 螺旋状 Hp 的革兰染色图

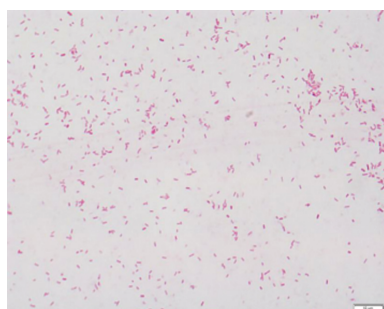


图 2 抗生素诱导下部分螺旋状 Hp 变成了短杆状 Hp

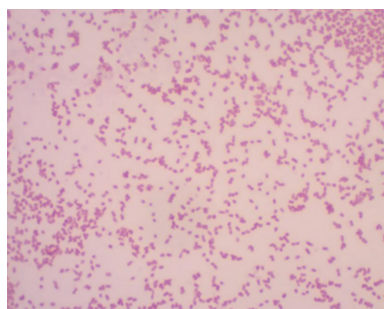


图 3 在抗生素长时间诱导下短杆状的 Hp 变成圆球形 Hp

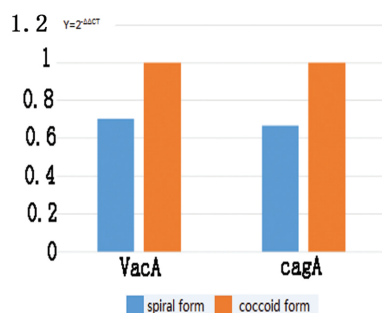


图 4 Real-time PCR 检测不同形态下幽门螺杆菌的毒力因子

3 讨 论

自从 Hp 被成功分离以来,世界各地对其基础与临床的研究日益深入。对于 Hp 球形体的活力和致病性存在两种不同的看法,一种认为 Hp 球形体

是一种退化、死亡的菌体,不具有感染力和致病性^[5];而另一种认为 Hp 从典型的螺旋杆状到球形体的变化可能是对不利环境的一种短暂适应,当环境重新恢复至对 Hp 生长有利时,它有可能会恢复成可增殖的螺杆菌状而重新致病^[6]。本实验采用 6 个浓度梯度甲硝唑溶液,作用于幽门螺杆菌标准菌株,诱导标准菌株的球形变,分别作用 12 h、24 h、48 h 后革兰染色显微镜下观察,可以看到螺旋状、S 形或海鸥状等不规则的革兰氏阴性弯曲杆菌。但是发现随着甲硝唑浓度增加和培养时间的延长,显微镜下除了典型的弯曲杆菌,还可见球形的幽门螺杆菌,视野中混杂着不规则的杆状和球形的幽门螺杆菌,直到最后完全球形变,说明了在不利于生长环境下,幽门螺杆菌发生了由螺杆菌状逐渐变成短杆状最后变成球形的变化,趋于稳定,以适应环境的变化,并且毒力因子的表达量降低,进一步说明虽然抗生素能降低其毒力,但并未完全丧失其毒力,本实验为临床快速了解幽门螺杆菌的毒力并通过减毒方法防治幽门螺杆菌提供实验依据,并为下一步当环境恢复到有利于 Hp 生长时,其形态学和毒力因子的变化打下了坚实的实验基础。

参 考 文 献

- [1] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等.中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J].现代消化及介入诊疗,2010,15(5):265-270.
- [2] 段秀杰,王文凯,邵世和,等.硒对幽门螺杆菌空泡毒素及其重组影响[J].中国公共卫生,2008,24(7):833-835.
- [3] Bridge DR,Merrell DS.Polymorphism in the Helicobacter pylori CagA and VacA toxins and disease[J].Gut Microbes,2013,4(2):101-117.
- [4] Fernandes RM,Silva H,Oliveira R,et al.Morphological transition of Helicobacter pylori adapted to water[J].Future Microbiol,2017,12:1167-1179.
- [5] Poursina F,Fagri J,Mirzaei N,et al.Overexpression of spoT gene in coccoid forms of clinical Helicobacter pylori isolates[J].Folia Microbiol (Praha),2018,63(4):459-465.
- [6] Damasceno JPL,Rodrigues RP,Gonçalves RC,et al.Anti-Helicobacter pylori Activity of Isocoumarin Paepalantine: Morphological and Molecular Docking Analysis[J].Molecules,2017,22(5):pii: E786.

(收稿日期:2018-04-12 修回日期:2018-05-28)

(编辑:潘明志)