DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.020
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
286 2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)03-0286-03

幽门螺杆菌沙鼠感染模型的定量分析研究

郭 刚,刘开云,解庆华,王毅超,曾韦锟,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)蒙古沙鼠感染模型,并通过比较定量培养、快速脲酶试验和ELISA三种方法,确定Hp动物模型的最佳评判指标。方法 采用临床分离的Hp强毒株对20只蒙古沙鼠进行感染,4周后剖杀。取血按常规ELISA法检测抗Hp抗体;分别剪取胃窦、胃体和胃底粘膜组织作定量培养;其余组织作快速脲酶试验及病理检查。结果 经定量培养结果显示沙鼠的Hp感染率达到80%(16/20),胃窦、胃体和胃底的Hp定植密度的对数均值分别为5.24±1.50、4.11±3.22、和0.97±2.39;16只Hp阳性沙鼠中脲酶试验有4只阳性,ELISA有7只阳性,阳性鼠的感染均值显著高于阴性鼠。结论 经筛选的Hp强毒株成功感染沙鼠后4周,Hp主要定植于胃窦和胃体部;定量培养仍是评价Hp动物模型的最有效方法。

关键词:幽门螺杆菌;动物模型;定量培养;蒙古沙鼠
中图法分类号:R-332;R377 文献标识码:A

Quantitative analysis of *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbil

GUO Gang, LIU Kai-yun, XIE Qing-hua, WANG Yi-cao, ZENG Wei-kun, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a Mongolian gerbil model infected with H. pylori and to determine its most suitable index by the means of quantitative culture, urease test and ELISA. Methods Twenty Mongolian gerbils were orally administered with *H. pylori*. Four weeks after inoculation, all animals were killed with dissection. H. pylori infection index were evaluated by quantitative culture and urease test of gastric tissue and the serum H. pylori-specific antibodies were measured with ELISA method. Results Eighity percent of gerbils(16/20) were infected. The density of colonization in the gastric antrum, body of and fundus of stomach, expressed in the form of lg CFU/g, was 5.24±1.50, 4.11±3.22 and 0.97±2.39, respectively. Of 16 gerbils stomach with H. pylori colonization in quantitative culture, 12 were negative in urease test and 9 were negative in ELISA. Conclusion H. pylori colonizes predominantly in gastric antrum and body of stomach in Mongolian gerbils 4 weeks after inoculation. For assessment of H. pylori colonization in the gerbil model, quantitative culture is the choice.

Key words: *Helicobacter pylori*; animal model; Mongolian gerbil; quantitative culture

由于目前对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)的抗感染治疗尚存在易复发、费用高及耐药菌株日益多见等诸多问题,因此,研制有效的Hp疫苗一直是医学界的研究热点。其中,建立一稳定的动物模型是Hp疫苗研制的关键。而Hp在胃内的分布和定植密度是评判其动物感染模型成功与否的重要依据之一,评判Hp疫苗的疗效也需要动态观测Hp定植密度的变化。虽然国内有初步建立Hp小鼠和沙鼠模型的报道[1,2],但均未对Hp在胃内的分布和定植密度进行定量检测。基于定量分析的重要性,我们在已建立的Hp蒙古沙鼠感染模型基础上,建立定量培养技术,对Hp的定植情况进行定量分析,从而为Hp疫苗研制提供坚实的技术保障。

1 材料和方法

1.1 菌株

由本室自临床慢性胃炎患者体内分离、鉴定并保存(编号CCM9903),采用Hp cag A基因PCR诊断试剂盒(上海复星高科技有限公司,批号:6021)进行cag A基因检测,确定为cag A阳性。

1.2 实验动物

蒙古沙鼠20只,8周龄,雌性,体重(50±55)g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.3 Hp的灌喂

Hp用脑心浸液血琼脂平板复苏后,采用脑心浸液加10%小牛血清作为培养肉汤,采用本室自行研制的液体培养方法[3]进行培养,最终调整Hp菌浓度约为10^9 cfu/ml,然后用可曲导管(Φ0.9×L50 mm,上海茂生生物科技公司)灌喂已断食水24 h的沙鼠,0.5 ml/只,上、下午各一次,共2次。末次灌喂后2 h供食供水。

1.4 动物的处理

灌菌后4周对试验鼠进行剖杀,处死前24 h断食水。首先行眼球放血分离血清,采用我室建立的ELISA法检测抗Hp抗体,处死后取出鼠胃,沿胃大弯剖开,用生理盐水轻轻冲洗掉胃内残留物,在其中一半胃组织的胃窦、胃体和胃底部各剪取3块粘膜组织,约50 mg/块,进行定量培养,剩余组织作快速尿素酶纸片试验。另一半粘膜组织经福尔马林常规固定,石蜡包埋,连续垂直切片,作HE染色,之后镜检。

1.5 定量培养

将每个部位的粘膜组织称量后,置于内装0.5 ml无菌生理盐水的玻璃匀浆器中进行研磨,然后取研磨液作10倍系列稀释,每个稀释度取50 μl均匀涂布于脑心浸液血琼脂选择性平

基金项目:国家重点科技攻关计划项目(96-901-01-54)
作者简介:郭 刚(1970-),男,四川省宜宾县人,博士研究生,讲师,主要从事幽门螺杆菌及其疫苗方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752315
收稿日期:2001-07-30;修回日期:2001-10-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

板, 置微需氧环境培养 5~7 d, 记数 Hp 菌落数, 再根据稀释倍数换算成每克胃组织中的活菌数(CFU), 结果以 lg CFU/ 克组织表示。

1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPMR 软件包进行统计学分析。

2　结果

2.1　Hp 在蒙古沙鼠胃内的定植和分布

20 只被感染的沙鼠中共有 16 只培养出 Hp, 培养阳性率高达 80%。其中胃窦部 16 只均阳性, 胃体部 14 只阳性, 胃底部只有 3 只培养出 Hp。经计算对数均值与方差, Hp 在 16 只阳性鼠的胃窦、胃体和胃底的定植密度分别为 5.24±1.50、4.11±3.22、和 0.97±2.39, 表明 Hp 感染沙鼠 4 周后主要定植于胃窦和胃体部, 显著高于胃底部的定植密度($P<0.01$)。结果见图 1。

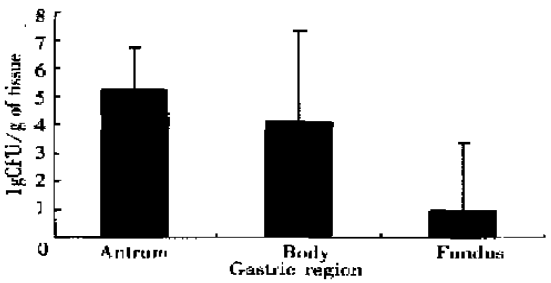


图 1　蒙古沙鼠感染 **Hp 4** 周后在胃内的分布及密度

Fig 1　Distribution of *H. pylori* in stomach of Mongolian gerbils 4 weeks after inoculation

2.2　病理学检查结果

在 16 只感染阳性的沙鼠胃窦及幽门部胃粘膜上皮细胞、腺窝上皮细胞间及固有层中出现大量炎症细胞, 包括中性粒细胞, 淋巴细胞和单核细胞, 粘膜下层血管扩张、充血明显, 结果, 见图 2 所示。用油镜观察, 在胃粘膜上皮细胞表层粘液、胃腺窝中以及上皮细胞间可明显见到大量 Hp 存在, 结果见图 3。

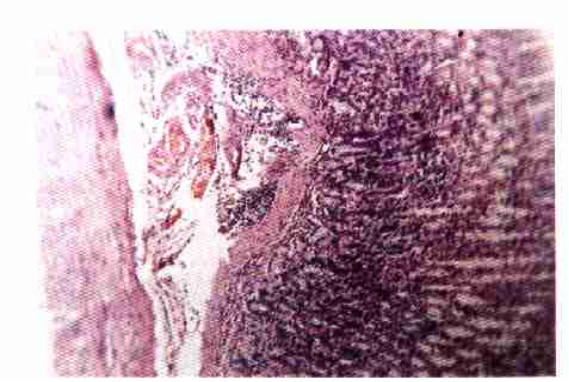


图 2　蒙古沙鼠感染 **Hp** 后粘膜固有层出现大量炎症细胞浸润 (HE× 100)

Fig 2　Mononuclear cell infiltrition in the lamina propria mucosae of Mongolian gerbils infected with *H. pylori*　(HE× 100)



图 3　蒙古沙鼠感染 **Hp** 后胃粘膜表层粘液中定植大量 **Hp** (HE× 1000)

Fig 3　*H. pylori* in the gastric surface mucus layer of Mongolian gerbils infected with *H. pylori*　(HE × 1000)

2.3　定量培养与脲酶试验及 ELISA 检测结果的比较

将每只培养出 Hp 的沙鼠不同部位的 Hp 定植数计算平均值, 获得该只沙鼠的 Hp 总感染值。在 16 只培养出 Hp 的沙鼠中, 经脲酶试验检测有 4 只显示阳性反应, 12 只显阴性, 前者的 Hp 感染值均数为 5.01±0.25, 而后者感染值均数仅为 3.04±0.88, 差异显著($P<0.05$)。经 ELISA 法检测, 16 只沙鼠中有 7 只结果显阳性, 9 只阴性, Hp 感染值均数分别为 4.87±0.12 和 2.87±0.60, 有显著性差异($P<0.05$)。结果如图 4。

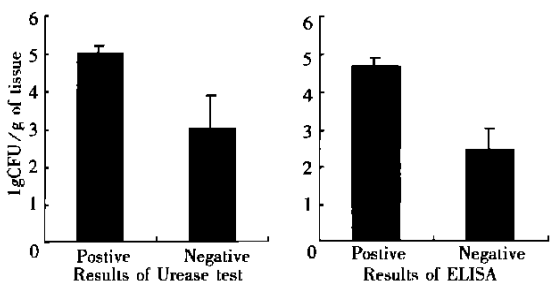


图 4　蒙古沙鼠感染 **Hp** 后定量培养与脲酶试验及 **ELISA** 的结果比较

Fig 4　Comparision of quantitative culture, urease test and ELISA

3　讨论

自 1982 年 Marshall 和 Warren[4] 首次发现 Hp 以来, 建立稳定而实用的动物模型一直是 Hp 研究者的目标。经过不断的探索, 人们已在悉生乳猪、豚鼠、无胸腺小鼠及 BALB/c 小鼠等动物身上取得了成功[5~7]。而近几年出现的 Hp 沙鼠模型由于其可产生与人相似的病理变化, 在 Hp 致病机制和疫苗研究方面现示出极大的应用价值[8]。本试验采用经筛选的临床分离毒株对蒙古沙鼠进行感染, 结果经分离培养这一金标准进行检测, 显示感染率已高达 80%。从病理切片也观察到部分沙鼠胃粘膜出现与人体病理学变化相似的炎症性反应。结果足以说明我们已成功建立起了 Hp 的沙鼠感染模型。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

目前,国内虽然有初步建立Hp沙鼠模型的报道,但均是通过细菌的定性方法和病理学方法来进行研究,尚未见有定量分析的报道。本试验通过建立胃粘膜的定量培养技术并对感染的沙鼠进行检测,显示沙鼠感染Hp 4周后主要定植于胃窦和胃体部,其定植密度分别为5.24±1.50和4.11±3.22,而胃底部仅有3只沙鼠培养出Hp,且定植密度(0.97±2.39)大大少于前两者。结果与国外报道相近[9]。

我们同时采用定量培养、快速脲酶试验和ELISA法对感染的沙鼠进行检测,检测出的感染阳性率分别为80%、20%和35%,显示前者的灵敏度远远高于后两者,表明定量培养仍是目前评价Hp动物感染模型的金标准。从脲酶试验和ELISA的检测结果看,阳性鼠的感染平均值显著高于阴性鼠的感染值,说明Hp定植量的高低可显著影响脲酶和ELISA试验的结果,即当Hp定植量小于某一范围时,这两种方法均不能检测出沙鼠的感染情况,提示在疫苗学研究中,不能仅以这两种方法的结果作为评判疗效的标准。

由于沙鼠胃内pH值较人胃内环境偏高,因此其定居的杂菌较多。在Hp的分离培养过程中各种杂菌常常抑制Hp的生长,并影响到结果的观察,这也是定量评判Hp感染模型的一大技术难点。为了最大限度地减少杂菌的这种干扰作用,我们对Hp选择性平板的组成进行了比较研究,特别是对抗生素的种类和浓度作了反复摸索,试验证明在Hp选择性培养基中加入多种抗生素能有效抑制大多数杂菌的生长,而对Hp无影响。此外,我们试验中也发现在每次灌喂Hp之前,延长断食时间,充分清空沙鼠胃内残余食物,能促进Hp的定植量,从而部分抑制杂菌的生长。

参考文献:

[1] 曾志荣,胡品津,陈闵湖,等. 幽门螺杆菌长期感染鼠腺胃模型的研究[J]. 中华医学杂志,1998,78(7):494-497.

[2] 迟 晶,傅宝玉,九岛亮治,等. 沙土鼠感染幽门螺杆菌后胃粘膜病理学改变的研究[J]. 临床消化病杂志,1999,11(2):60-61.

[3] 郭 刚,邹全明,张卫军,等. 一种改良幽门螺杆菌液体培养方法[J]. 第三军医大学学报,1999,21(2):124-125.

[4] Warren J R, Marshall B J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis[J]. Lancet, 1984, 1(8390):200-210.

[5] Eaton K A, Morgan D R, Krakowka S. Campylobacter pylori virulence factors in gnotobiotic piglets[J]. Infect Immun, 1989, 57(4):1119-1125.

[6] Shomer N H, Dangler C A, Whary M T, *et al*. Experimental Helicobacter pylori infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs[J]. Infect Immun, 1998, 66(6):2614-2618.

[7] Lee A, Orourke J, De Ungria M C, *et al*. A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain[J]. Gastroenterology, 1997, 112(4):1386-1397.

[8] Honda S, Fujioka T, Tokieda M, *et al*. Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by Helicobacter pylori in Mongolian gerbils[J]. Scand J Gastroenterol, 1998, 33(5):454-460.

[9] Miyata H, Yagi K, Kimura M, *et al*. Distribution of Helicobacter pylori in a Mongolian gerbil gastric ulcer model[J]. Laboratory Animal Science, 1999, 49(6):622-627.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2002)03-0288-01

空管药物疗法治疗慢性尖周炎的远期疗效观察

Curative effects in the treatment of chronic apicitis with empty root canal medication

李海斌[1],汪志德[2] ([1]解放军78379部队门诊部,重庆 400042;[2]第三军医大学附属新桥医院口腔科,重庆 400037)

目前龋齿患病率呈上升趋势[1],尖周病患者也日益增多,传统的根管治疗术治疗尖周病操作麻烦、难度较大。为找出更简便有效的治疗方法,作者自1995年10月-1997年9月将120例患者的137颗慢性尖周炎患牙随机分成空管组(70牙)和充填组(67牙),分别进行了空管药物疗法和根管治疗术,现将疗效报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

门诊患者120例,男58例,女62例,年龄12~70岁。患牙137颗,其中前牙65颗,前磨牙40颗,磨牙32颗。137颗均为慢性尖周炎患牙,伴有牙龈窦道者40颗。

作者简介:李海斌(1972-),男,山东省成武县人,医师,主要从事牙体牙髓病学方面的研究。电话:(023)68758420

收稿日期:2001-06-05;修回日期:2001-12-24

1.2 治疗用药

空管组:将强力霉素0.1 g、磺胺增效剂0.1 g、地塞米松0.75 mg研成粉剂,用消毒棕色瓶贮存。用时取适量粉剂与木馏油调成糊状即可。

充填组:牙胶尖加根管糊剂。

1.3 操作方法

空管组:常规开髓,清根,根管可以不成形扩大,用3%过氧化氢液与生理盐水反复冲洗,干燥根管,封FC棉球5~7 d。复诊时若无叩痛、根尖部牙龈红肿等急性期炎症,去除原封料,在根管口覆盖2 mm厚的空管治疗药物,垫基底,永久充填。

充填组:按常规根管预备、根管消毒和根管充填三个步骤进行操作。

1.4 疗效评定标准

临床疗效根据术后3年的效果评价。

(下转291页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net