3 讨论

Hp的分离培养方法已非常成熟,但由于其苛刻的气体条件而使其液体培养受到了很大限制。我们综合国外文献报道的方法和我们实验室的工作经验建立的这一培养方法充分体现气液接触面大的特点,将小量液体培养基装入组织培养瓶,水平放入微氧气罐,使液体表面积大增,再经振荡,气体能充分弥散于液体中,较好地促进 Hp的生长。国外资料报道几种液体培养基(如布氏肉汤、哥伦比亚肉汤、MH肉汤以及脑心浸液肉汤)均能满足 Hp的生长条件,但以脑心浸液肉汤加上小牛血清生长最好[5,6],这与我们的结果一致(资料待发表)。此外,加入 0.5% 的淀粉能有效吸附细菌生长过程中的代谢毒性产物,有利于 Hp的生长。对 Hp液体培养的另一制约因素是污染。我们在肉汤中按固体培养基中抗生素的浓度加入万古霉素和多粘菌素 B,较好地控制了污染的发生,未对 Hp的生长造成影响。

从培养的第 4天开始,液体中活菌数开始下降,涂片染色观察到随着活菌数的减少,Hp形态也发生着改变。由典型的纤细螺杆状向球形状转变,这可能是由于代谢产物的堆积和营养成份的消耗造成生存环境的恶化所致。

近几年,Hp的疫苗已成为研究的热点,而各种毒力因子、菌体成份及免疫原的制备均需要通过液体培养 Hp来获得。本方法尚局限于小量培养,要进行大批量 Hp液体发酵培养尚需进一步的摸索和完善。

(感谢新桥医院消化科张朋彬博士在收集标本中所提供的大力帮助!)

关键词 幽门螺杆菌;液体培养

中图法分类号 R446.5

参考文献

1 范学工,夏华向.幽门螺杆菌感染——基础与临床.长沙:湖南科学技术出版社,1997.19~25

2 Xia H X, English L, Leane C T, *et al*. Enhanced cultivation of Helicobacter pylori in liquid media. J Clin Pathol, 1993, 46(8): 750

3 Deshpande M, Calenoff E, Daniels L, *et al*. Rapid large-scale growth of Helicobacter pylori in flasks and fermentors. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(6): 2431

4 Norris J R. Methods on Microbilogy. London: Academic Press, 1969. 611~628

5 Lin Y L, Lee N, Chan E C, *et al*. Determination of optimal liquid medium for enzyme expression by Helicobactor pylori. J Clin Pathol, 1996, 49(4): 818

6 Shahamat M, Mai U EH, Yamamoto H, *et al*. Evaluation of liquid media for growth of Helicobacter pylori. J Clin Microbiol, 1991, 29(12): 2835

(收稿: 1998-06-23;修回: 1998-12-09)

(编辑 仇玉福)

不同年龄供体正常胃粘膜端粒状态分析*

Analysis of telomere length in normal gastric mucosa from donors of different ages

杨仕明** 房殿春 罗元辉 鲁 荣 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,400038

提 要 目的:探讨不同年龄供体正常胃粘膜端粒长度的变化规律。方法:采用 Southern杂交及图像分析技术,检测 26例 76岁以下不同年龄供体正常胃粘膜端粒限制性片段长度(Telomeric restriction fragment, TRF)。结果:正常胃粘膜 TRF长度呈年龄递减趋势,60岁以上组 TRF长度明显短于 0~39岁、40~49岁及 50~59岁组(4.1±1.2 *vs* 6.4±1.8 6.0±1.0 5.5±1.1, $P<0.05$),正常胃粘膜 TRF长度与供体年龄呈明显负相关($r=-0.56$, $P=0.0028$),端粒重复序列平均每年丢失约(41±12)bp碱基对。结论:TRF长度可以作为衡量胃粘膜细胞衰老的一种生物学标志。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670347

** 杨仕明,男,29岁,博士研究生

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

端粒是真核生物的染色体末端一种由许多富含 AC/TG重复序列及相关蛋白质组成的复合结构,具有保持染色体结构完整及解决末端复制难题(End replication problem)的作用,近年来有学者发现体细胞端粒长度随着年龄或者有丝分裂次数的增加而逐渐缩短[1~3]。本研究以不同年龄供体正常胃粘膜为研究对象,分析其端粒长度的变化,以探讨端粒长度在胃粘膜细胞衰老中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

聚蔗糖(Ficoll 400): Sigma公司; HinfI, T_4多聚核苷酸激酶: Promega公司; Sephadex G-50 Pharmacia公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVP),牛血清白蛋白(BSA),硝酸纤维素膜: 华美公司;高强度琼脂糖 9201: 中山公司;$(TTAGGG)_4$寡核苷酸探针: 上海细胞所合成;γ-^{32}P-ATP: 亚辉公司。

1.2 研究对象

3例胎胃粘膜取自本院水囊引产的死胎,23例正常胃粘膜分别取自 1996年 1月至 1997年 12月在本院因消化性溃疡或胃癌行胃大部切除患者的非病变区胃粘膜,标本取到后,去除坏死组织,放入经消毒处理的试管内,-80℃贮存备用。所有组织均经病理学证实。

1.3 DNA提取

按分子克隆有关章节进行。大致步骤如下: 标本剪碎后,加入含 0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)裂解缓冲液中,再加入蛋白酶 K 100 μg/ml,混匀后 37℃恒温过夜,等体积酚氯仿抽提 3次,乙醇沉淀 2次,核酸絮状沉淀物经真空低温干燥后溶于 TE缓冲液中,取少许用紫外分光光度计(Du-50, PE公司)定量并分析其纯度,其余在 4℃保存备用。

1.4 寡核苷酸探针标记

严格按说明书进行,自制 Sephadex G-50离心柱层析纯化,液闪计数仪进行放射性比活性及标记效率测定。

1.5 Southern印迹杂交

按 Counter[4]介绍的方法进行,简述如下: 10 μg DNA经 HinfI 37℃下酶切 6 h, 1%琼脂糖电泳,然后转移至硝酸纤维素膜上,与含 γ-^{32}P-ATP标记的$(TTAGGG)_4$探针在 5× SSC(750 mmol/L NaCl, 75 mmol/L柠檬酸钠), 5× Denhardt液及 0.1× 焦磷酸钠缓冲液(0.5 mmol/L焦磷酸钠, 10 mmol/L Na_2HPO_4)中 37℃下杂交 24 h, 0.1× SSC室浊下洗膜 3次,每次 7 min,凉干后 AFGA医用 X线片曝光 24~48 h,附加增感屏。

1.6 端粒限制性片段分析

所获 X线片,经本院光密度室真彩图像分析系统 CAMIS型(空军总医院生物工程研究所研制)进行积分光密度扫描,端粒限制性片段(TRF)长度按以下公式进行计算,平均 $TRF=\sum ODi/\sum (ODi/Li)$, ODi为 i点的光密度值, Li为 i点的 Marker长度[1]。

1.7 统计学分析

所获结果用计算机进行方差分析和相关分析。

2 结果

2.1 基因组 DNA的鉴定

所抽提 DNA经紫外分光光度仪分析,其 D_{260}/D_{280}在 1.8至 2.0之间。将基因组 DNA及经 HinfI酶切 DNA进行 1%琼脂糖电泳,其结果见图 1,基因组 DNA在点样孔附近,说明 DNA分子未降解,酶切 DNA呈火箭样均匀分布,说明酶切完全。

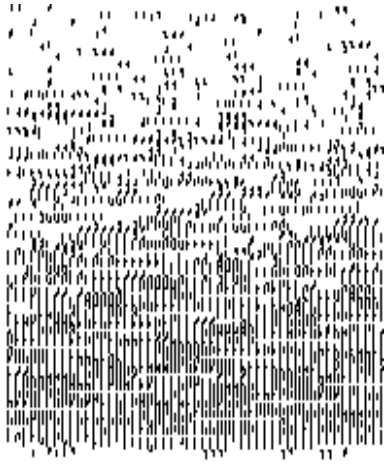


图 1 基因组 DNA及酶切 DNA经 1%琼脂糖电泳结果
M: Marker; 1~7:酶切 DNA; 8 基因组 DNA

2.2 TRF长度杂交结果,见图 2



图 2 胃粘膜 TRF印迹杂交结果

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

图像分析显示,胃粘膜 TRF长度呈年龄递减趋势,60岁以下组供体胃粘膜 TRF长度明显短于 0~ 39岁、40~ 49岁及 50~ 59岁组(4.1± 1.2 *vs* 6.4± 1.8 6.0± 1.0 5.5± 1.1, $P < 0.05$),见图 3 然后以年龄为横坐标,以 TRF为纵坐标作相关分析,发现供体的年龄与胃粘膜 TRF长度呈明显负相关($r= -0.56$, $P= 0.0028$),其回归方程为 Y= 7.188- 0.041X 胃粘膜平均每年丢失约 4± 12bp的端粒重复序列,结果见图 4

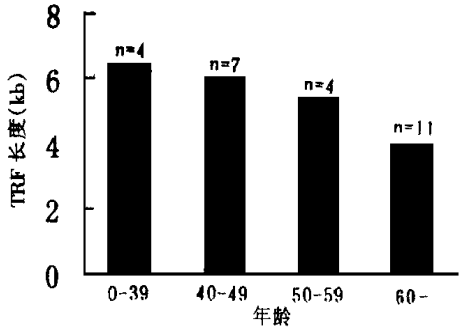


图 3 不同年龄组胃粘膜 TRF长度

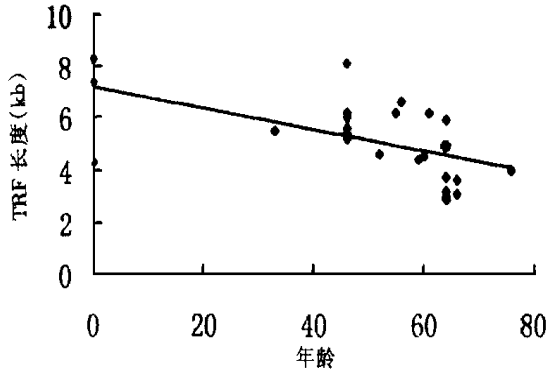


图 4 不同年龄供体胃粘膜 TRF长度与年龄的关系

3 讨论

胃粘膜是人体内更新最快的组织之一,本研究发现,正常胃粘膜 TRF长度有呈年龄递减的趋势,供体年龄组越大,其胃粘膜平均 TRF长度亦逐渐缩短。进一步研究发现,供体的年龄与正常胃粘膜 TRF长度之间呈明显负相关($r= -0.56$, $P= 0.0028$),端粒重复序列每年平均丢失约(4± 12)bp,与文献报告基本一致。由于正常体细胞端粒酶大多处于失活状态,随着年龄的增加,体细胞有丝分裂次数亦增加,端粒重复序列将逐渐丢失,从而导致染色体端粒长度逐渐缩短,当端粒长度短至不足以维持端粒功能时,细胞停止有丝分裂而进入衰老期,因此有学者提出细胞衰老的端粒假说,认为端粒长度的变化可以作为细胞有丝分裂能力的生物钟(Mitotic clock)[1,5,6]。这种假说已为众多的实验所证实。 Harley[1]分析了 0~ 91岁不同供体成纤维细胞端粒长度,发现供体年龄与端粒长度呈明显负相关; Hastie[2]发现不同年龄供体血细胞和结肠粘膜端粒长度随年龄增加而逐渐缩短,平均每年丢失约 33 bp重复序列; Allsopp观察了不同个体体外培养的成纤维细胞端粒初始长度与有丝分裂次数之间的关系,发现端粒初始长度越长,有丝分裂次数亦越多,分裂增殖能力也越强。相反,一些早老性疾病,如 Hutchinson-Gilford综合征患者,其成纤维细胞端粒长度明显短于同龄正常人,体外培养这些细胞,其有丝分裂能力亦明显减弱[3]。

最近,有研究报道,不同年龄供体角膜内皮细胞 TRF长度基本保持不变,而且长期维持在一个较高的水平,但其端粒酶活性为阴性,这可能与人角膜内皮细胞有限的分裂增殖能力有关[7]。因此,研究具有不同分裂增殖能力的体细胞 TRF长度,对进一步阐明细胞衰老的端粒假说可能有重要意义。

关键词 胃粘膜;端粒限制性片段长度;衰老
中图法分类号 R322.44

参考文献

1 Harley C B, Futcher A B, Greider C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature, 1990, 345(6274): 458
2 Hastie N D, Dempster M, Dunlop M G, *et al*. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. Nature, 1990, 346(6287): 866
3 Allsopp R C, Vaziri H, Patterson C, *et al*. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21): 10114
4 Counter C M, Avilion A A, LeFeuvre C E, *et al*. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J, 1992, 11(5): 1921
5 Zakian V A. Telomeres: beginning to understand the end. Science, 1995, 270(5242): 1601
6 Harley C B. Telomere loss: mitotic clock or gentic time bomb. Mutat Res, 1991, 256(3): 271
7 Egan C A, Savre T I, Shay J W, *et al*. Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(3): 648

(收稿: 1998-02-17;修回: 1998-12-04)
(编辑 冷怀明)

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