DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.022

3 讨论

维生素 B_1、B_2在体内以焦磷酸硫素(TPP)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的形式作为辅酶参与机体的能量代谢和氧化呼吸链的电子传递。机体在高原缺氧条件下,代偿反应导致 V_{B_1}和 V_{B_2}的需要量增加[4],以提高细胞内丙酮酸脱羧和氧化还原反应的效率。本实验测定以 TPP为辅酶的红细胞转羟乙醛酶和以 FAD为辅酶的谷胱甘肽还原酶的活性系数,直接反映了在不同缺氧条件下 FAD和 TPP的变化情况。结果表明,随模拟高度的上升,TPP和 FAD的缺乏程度越来越大。较以前采用测用尿中 V_{B_1}和 V_{B_2}排出量得出的结论更加精确[5]。并进一步说明了用 V_{B_1}和 V_{B_2}预防缺氧效应、提高缺氧耐力的可行性。

本实验采用自身能合成 Vc的大鼠为对象,在不同模拟高度下,大鼠全面 Vc含量随高度上升呈递减趋势,并在上升到 8 000 m时,与 0 m比较差异显著。说明了缺氧的程度与 Vc的需要量相关,同时对大鼠 Vc合成能力有损害作用。可能与缺氧条件下脂质过氧化增强有关[6]。

V_E的主要生理作用是抗氧化和维持生物膜的正常功能。高原缺氧条件下 V_E含量的降低,说明缺氧条件下机体对 V_E的需要量是增大的,这也与缺氧导致机体脂质过氧化增强有关,因为 V_E具有消除自由基和脂质过氧化物的功能。

Zn、Cu、Fe和 Mn是机体内多种金属酶的组成成分和激活因子。本结果显示,机体缺氧时,体内 Zn和 Fe水平下降较为显著,Zn水平的降低可能与机体脂质过氧化增强有关,因为锌对机体的脂质过氧化反应有抑制作用[7],机体缺氧时,组织的脂质过氧化作用增强,这促使 Zn从血液向组织的转移。Fe水平的降低可能是:① 缺氧导致 Hb代偿性的合成增强,需要大量的 Fe供给;② 一些与能量代谢密切相关的酶代偿性的活性增高,而这些酶的成分含有 Fe,如细胞色素氧化酶和琥珀酸脱氢酶。

Cu的水平在急性缺氧下无明显变化,而 Mn的水平随缺氧程度加重呈升高趋势,这种变化趋势的原因尚不清楚,可能的解释是:急性高原缺氧对机体主要影响是能量代谢障碍和脂质过氧化增强,在代偿反应过程中,含 Zn和 Fe的酶对氧的反应较快,而以 Cu和 Mn为辅基的酶(如铜蓝蛋白、Mn-SOD酶)反应较慢,因此 Cu的水平在急性缺氧变化不明显,Mn的升高可能是组织中的 Mn向血中转移所致。

关键词 模拟高原;营养状态
中图法分类号 R153.4

参考文献

1 Belakorskii M S. Vitamins in the process of adaptation to high altitude. Kosm Biol Aoiakosm Med, 1984, 18(3): 4
2 顾景范,陈玉珍,王宗印,等.血清谷胱甘肽还原酶活性系数 LGBR-AC值测定方法.营养学报, 1982, 4(1): 59
3 华西医科大学主编.营养与食品卫学实验教程.成都:华西医科大学出版社, 1986. 75~77
4 方允中,顾景范 编.高原营养.北京:解放军出版社, 1989. 105~109
5 于志琛,顾景范 编.特殊营养学.北京:科学出版社, 1991. 62~71
6 陈东升,杨家驹,朱俊东,等.急性缺氧对大鼠血清 MDA和多核粒细胞活性氧产生的影响及补充 V_E的效应.营养学报, 1997, 19(1): 28
7 Sutkovoi D A. Lipid peroxidation and atpha-tocopherol concentration of the blood in hypoxiadapted rabbits uneryoing acute decompression. Fiziol Zh, 1994, 38(4): 93

(收稿: 1998-03-27;修回: 1998-09-27)
(编辑 汪勤俭)

一种改良幽门螺杆菌液体培养方法*

An improved culture method of Helicobacter pylori in liquid media

郭 刚** 邹全明 张卫军 解庆华 (第三军医大学医学检验系临床微生物学教研室)重庆, 400038

提 要 目的:探索一种简便的液体培养方法培养幽门螺杆菌(Hp)。方法:采用组织培养瓶,装少量含有 10%小牛血清、0.5%淀粉、10 mg/L万古霉素和 2 500 U/L多粘菌素 B的脑心浸液肉汤,在厌氧罐中通

* 国家重点科技攻关计划项目,No. 96-901-01-54
** 郭 刚,男,29岁,讲师,硕士

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

过抽气换气建立微需氧环境,37℃振荡培养,平板菌落计数法检测生长情况。结果:培养 24~48 h,液体中活菌水平超过 10^8 CFU/ml,涂片染色细菌形态典型。结论:此 Hp液体培养方法简便可行,细菌生长良好,能满足对 Hp的毒力因子、菌体成分的研究需要。

目前幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)已被公认为是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因,并且与胃癌的发生密切相关[1]。Hp的检测技术发展很快,但是 Hp的液体培养问题一直未彻底解决。虽然国外报道了几种方法用于 Hp的液体培养[2,3],但操作复杂,国内未见该方面的报道。为此,我们在国外报道方法的基础上进行改良,建立了一种生长良好且简便实用的 Hp液体培养方法。

1 材料与方法

1.1 菌种

幽门螺杆菌 Hp 971004、Hp 980403及 Hp 980406株均由我室从临床胃病患者的胃镜活检组织分离培养所得,经染色、脲酶试验以及 PCR鉴定,液氮保存。胃镜标本来自我校附属医院胃镜室。

1.2 方法

1.2.1 Hp的固体培养　菌株分别接种于脑心浸液血琼脂平板,培养基含 TMP 5 mg/L,万古霉素 10 mg/L,多粘菌素 B 2 500 U/L,接种后置玻璃厌氧罐,采用抽气换气法建立微需氧环境(10% CO_2, 5% O_2, 5% H_2 以及 80% N_2),37℃孵箱培养。

1.2.2 液体培养及检测　将已培养 48 h的 Hp平板取出刮取菌苔,混悬于无菌生理盐水,以麦氏标准比浊管第一管为标准配成浓度 3×10^8/ml的菌悬液,迅速取 10μl转种于装有 10 ml液体培养基(脑心浸液肉汤,含 10%小牛血清、0.5%淀粉以及 100 mg/L的万古霉素和 2 500 U/L 的多粘菌素 B)的 100 ml组织培养瓶,轻微塞上棉塞,水平放入厌氧罐并抽气换气建立微需氧环境,然后将罐子放入盖子稍经改良的恒温振荡培养箱(THZ-C,江苏太仓实验设备厂),37℃振荡培养(100 r/min),每天开罐抽气换气,并涂片行革兰氏染色镜检以及采用平板菌落计数法[4]检测细菌活菌数,监测生长情况。

2 结果

三株细菌均在此液体培养基中生长良好,其中 Hp 971004和 Hp 980406两株经 24 h的振荡培养即已达到较高活菌浓度(> 10^8 CFU/ml),Hp 980403株经 48 h培养活菌浓度也达到此水平,见图 1。此时涂片染色见细菌形态典型,呈螺杆状,偶见长条细丝状。活菌水平维持 2~3 d后开始下降,涂片染色见部分菌体形态不典型,着色较淡,有革兰氏阴性球形体出现,见图 2。随着培养天数的增加活菌数的减少,球形体数量开始增多。

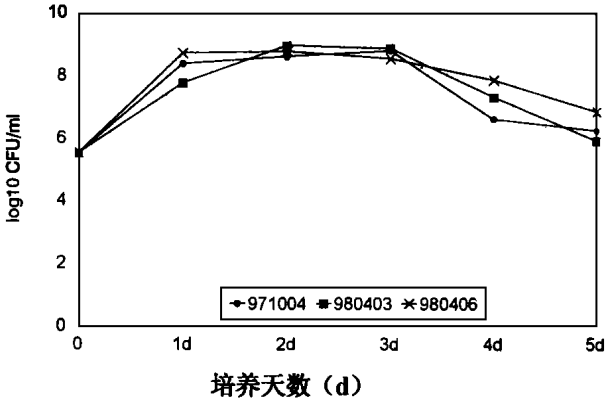


图 1　三株幽门螺杆菌在脑心浸液肉汤中的生长曲线

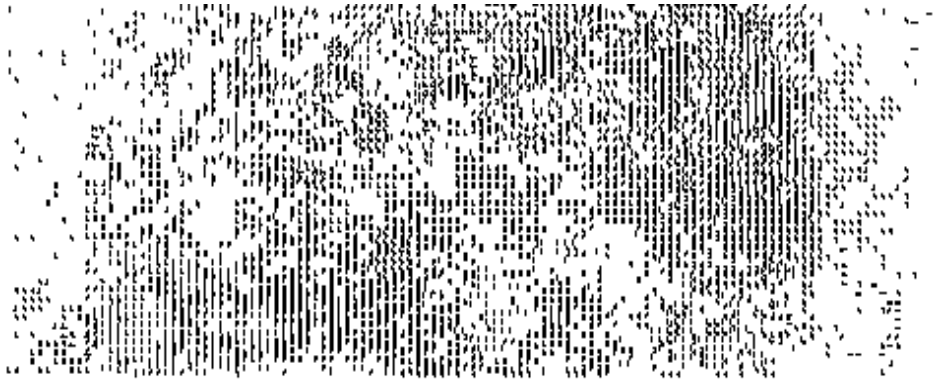


图 2　幽门螺杆菌液体培养细菌形态　(革兰氏染色× 1 000)

a.培养 2 d后的细菌形态典型,呈螺杆状;b.培养 4 d后的细菌着色淡,形态不典型,有球形体出现

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

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