

文章编号:1000-5404(2012)09-0805-04

论著

幽门螺杆菌感染蒙古沙鼠模型胃黏膜菌群多样性研究

宋阳¹, 胡琳琳², 黄薇薇³, 余抒⁴, 廖亚玲¹, 顾江¹, 任莉¹, 邹全明¹, 郭刚¹ (400038 重庆, 第三军医大学医学检验系临床微生物学教研室¹; 100853 北京, 中国人民解放军总医院微生物科²; 400016 重庆, 重庆医科大学微生物学教研室³; 401311 重庆, 解放军后勤工程学院门诊部⁴)

[摘要] 目的 对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染蒙古沙鼠模型胃黏膜菌群多样性进行研究, 探讨Hp感染与胃内菌群的关系。方法 建立Hp感染的蒙古沙鼠模型, 空白对照组、阴性对照组、直接感染组和预处理感染组各15例, 4周后采集胃黏膜样本, 同时检测HP定植率, 并提取细菌基因组DNA, 采用聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)对黏膜局部菌群进行指纹图谱分析, 并对特异性条带进行测序鉴定分析。结果 预处理感染组感染率(93.3%)与直接感染组感染率(26.7%)有明显差异($P < 0.05$); 各实验组PCR-DGGE指纹图谱分析显示条带数量, 空白对照组(21.6 ± 2.5)、阴性对照组(3.3 ± 1.1)、直接感染组(14.6 ± 2.4)和预处理感染组(7.2 ± 2.2), 经统计学分析, 各组间均有明显差异($P < 0.05$), 提示蒙古沙鼠各组间菌群多样性存在显著的差异性。结论 Hp感染与胃黏膜菌群结构的变化密切相关。

[关键词] 胃内菌群; 幽门螺杆菌感染; 聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳技术

[中图分类号] R372; R377; R573

[文献标志码] A

Diversity of gastric flora in Mongolian gerbil model with *Helicobacter pylori* infection

Song Yang¹, Hu Linlin², Huang Weiwei³, Yu Shu⁴, Liao Yaling¹, Gu Jiang¹, Ren Li¹, Zou Quanming¹, Guo Gang¹ (¹Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; ²Department of Clinical Microbiology, General Hospital of PLA, Beijing, 100853; ³Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; ⁴Department of Out-patient, Logistics Engineering University, Chongqing, 401311, China)

[Abstract] **Objective** To clarify the relationship between the diversity of gastric flora and *Helicobacter pylori* (Hp) infection in the stomach in the Hp-infected Mongolian gerbil. **Methods** A total of 60 Mongolian gerbils were divided into 4 groups, blank control, negative control, direct infection group and pretreatment infection group, with 15 animals in each group. The gerbils in the later group was induced to Mongolian gerbil model with Hp infection by gastric gavage of Hp stain M12, with or without pretreatment of 0.3 ml 50% ethanol and 0.3 ml antibiotics suspension. The gastric mucosa samples were collected in 4 weeks later, and the infection rates of Hp were counted at the same time. Total bacterial genomic DNA was collected from the Mongolian gerbils from 4 groups. Samples were analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and specific bands on fingerprints were sequenced. **Results** There was a significant difference in the infection rates of Hp between the pretreatment infection group (93.3%) and the direct infection group (26.7%) ($P < 0.05$). The average number of bands was 21.6 ± 2.5 in blank control group, 3.3 ± 1.1 in negative control group, 14.6 ± 2.4 in direct infection group, 7.2 ± 2.2 in pretreatment infection group, and there were significant differences among them ($P < 0.05$), which suggested there were significant diversities in gastric flora among 4 groups. **Conclusion** Hp infection is closely related to the changes of composition of gastric flora.

[Key words] gastric flora; *Helicobacter pylori* infection; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070445). Corresponding author: Guo Gang, E-mail: gangguo7001@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(31070445)

[通信作者] 郭刚, E-mail: gangguo7001@163.com

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *Hp*) 感染作为慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等疾病的重要致病因素已被公认,胃内 pH 值一般处于 2.0 左右,可以抑制大部分细菌的生长^[1]。深入研究发现胃内独特的菌群结构,这个菌群结构和其他的理化因素一起构成了胃部微环境。研究发现在胃溃疡的形成过程中,*Hp* 感染与其造成的胃部菌群变化之间可能有着密切的关系^[2],说明胃内菌群的变化在 *Hp* 感染及其引起的相关疾病中可能起着重要作用,因此深入研究 *Hp* 感染和胃内菌群结构之间的关系对了解 *Hp* 致病的条件和机制有重要意义。本实验拟探讨 *Hp* 蒙古沙鼠感染模型的发生、发展过程中胃部菌群结构的变化,以期从微生态的角度阐明 *Hp* 相关疾病和胃内菌群之间的相互关系,为 *Hp* 感染及其相关疾病提供新的微生态调节思路。

1 材料与方法

1.1 材料

由本室鉴定并保存的蒙古沙鼠适应株(菌株编号:M12)。蒙古沙鼠 60 只,雄性,8~9 周龄,体质量 50~60 g,由浙江省实验动物中心提供,随机分为 4 个实验组(表 1)。试剂和仪器:聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳技术(PCR-DGGE)仪器及相关配套设备和 30% 的丙烯酰胺预混液购自 Bio-Rad 公司,*Hp* 脑心浸液培养基和抽气换气培养罐均由本室自行研制,灌胃针(Φ0.9×L 50 mm)购自上海茂生生物科技公司,mini-beadbeater 16 磁珠研磨仪购自 BioSpec 公司,基因组提取试剂盒有北京天根生物科技有限公司提供,PCR 相关试剂(TaKaRa)购自大连宝生生物科技有限公司,*Hp* 16S rDNA 特异引物和原核生物 16S rDNA V6 区通用引物由上海英骏生物科技有限公司合成。

表 1 蒙古沙鼠分组情况

组别	n	预处理		实验灌胃	
		生理盐水	预处理液	<i>Hp</i> 液体培养基	M12 菌液
空白对照组(A组)	15	是	否	是	否
阴性对照组(B组)	15	否	是	是	否
直接灌胃组(C组)	15	是	否	否	是
预处理灌胃组(D组)	15	否	是	否	是

1.2 方法

1.2.1 *Hp* 蒙古沙鼠感染模型的建立 将各组蒙古沙鼠禁食禁水,24 h 后用灌胃针对 B 组和 D 组蒙古沙鼠行预处理液 0.6 ml(50% 乙醇 0.3 ml + 抗生素混悬液 0.3 ml)灌胃,A 组和 C 组用高压灭菌生理盐水代替预处理液灌胃 0.6 ml;24 h 后用灌胃针对 C、D 2 组蒙古沙鼠每只灌胃 0.6 ml *Hp* 菌液(1×10⁹)/次,A、B 组用高压灭菌 Skirrow 液体培养基 0.6 ml 代替 M12 菌液灌胃,上下午各 1 次,共 2 d,4 次,最后 1 次灌胃后 12 h 恢复食水(饲料由本校动物中心提供,水为本室统一配制的蒸馏水)。

1.2.2 胃黏膜基因组 DNA 的抽提 于最后 1 次灌胃后 4 周对各组蒙古沙鼠行脱臼处死,将腹部外科消毒,开腹取胃,延胃大弯剖开,用无菌生理盐水冲洗掉胃内残留物。取胃窦部黏

膜,同时进行 *Hp* 培养鉴定和尿素酶实验。将 1/2 胃窦部黏膜放入高压灭菌的研磨管中,用 mini-beadbeater 16 磁珠研磨仪进行研磨,将得到的混悬液从研磨管移至 EP 管中,离心取沉淀,用于提取全基因组。

1.2.3 *Hp* 定植检测和判断标准 细菌培养、快速尿素酶试验、PCR 鉴定中任 2 项阳性或单独细菌培养阳性判断为 *Hp* 定植。用 *Hp* 16S rDNA 特异引物(*Hp* 反义链:5'-TTTGTAGAG-AAGATAATGACGGTATCTAAC-3',正义链:5'-CATAGGATTTCA-CACCTGACTGACTATC-3')对抽提到的基因组进行扩增,用 M12 菌株基因组作阳性对照,洗脱试剂 EB 作阴性对照。扩增条件:预变性 95 °C 10 min,变性 95 °C 30 s,退火 60 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,30 个循环后复延伸 72 °C 10 min,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳用于检测 *Hp* 定植。*Hp* 培养鉴定:取胃黏膜匀浆液 100 μl,接种于脑心浸液血琼脂平板上,37 °C 微需氧环境(85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂)培养 48 h,观察菌落形态,对疑似 *Hp* 的菌落进行革兰染色镜检。快速尿素酶试验:取胃黏膜组织少许,用无菌生理盐水 500 μl 研磨成匀浆,取 50 μl 置于尿素酶试剂中,室温下观察 5 min,指示剂变为红色为阳性。

1.2.4 PCR-DGGE 分析 以抽提得到的基因组为模板,用原核生物 16S rDNA V6 区(含 GC 夹)(V6GC 反义链:5'-CGGT-GTGTACAAGACCC-3',正义链:5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGG-GCGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAGAACCCTTAC-3')通用引物分别扩增,扩增条件:预变性 95 °C 10 min,变性 95 °C 30 s,退火 56 °C 1 min,延伸 72 °C 1 min,30 个循环后复延伸 72 °C 10 min,将 V6~V8 区引物扩增产物用于 PCR-DGGE 检测;采用 D-code 系统(Bio-Rad)灌胶,用垂直电泳(变性梯度为 0%~80%)确定水平电泳的凝胶变性梯度为 40%~60%。再进行水平电泳,每个样本上样 5 μl,条件:电泳液恒温 60 °C、恒压 85 V、16 h,电泳完毕后行硝酸银染色,并拍照留存。

1.2.5 DGGE 图谱及条带测序分析 用 Quantity One 1-D Analysis software (Version 4.6.2; Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA)对 DGGE 染色得到的结果进行标准化处理,并进行相似性分析,以平均光密度值 50 为 cut-off 值^[3],统计各实验组平均条带数量,应用 χ^2 检验进行分析。确定并切取组间差异条带(图 1),放入研磨管中,加入 30 μl 高压灭菌蒸馏水,4 °C 24 h,以充分洗脱条带中的 DNA。取 2 μl 为模板,用原核生物 16S rDNA V6~V8 区(不含 GC 夹)(引物序列:V6 反义链:5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3',正义链:5'-AACGCGAAGAACCCTTAC-3')通用引物分别扩增,扩增条件同 1.2.3。回收扩增产物,送上海英骏生物科技有限公司测序,测得的 DNA 序列用 BLAST 进行序列比对。

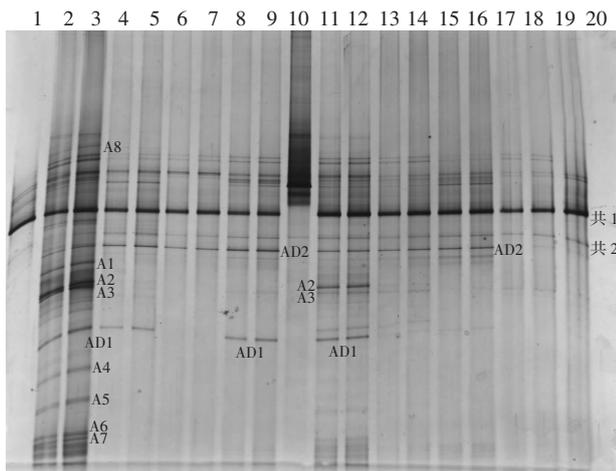
2 结果

2.1 动物模型 *Hp* 定植情况

根据 *Hp* 定植判断标准发现经过预处理液处理过的蒙古沙鼠 *Hp* 定植率明显高于未处理直接用 *Hp* 灌胃组。A、B 2 组均无定植阳性个例,C 组有 4 只定植阳性,定植率为 26.7%,D 组有 14 只定植阳性,定植率为 93.3%。C、D 2 组定植率有明显差异($P < 0.05$)。

2.2 PCR-DGGE 分析蒙古沙鼠胃内黏膜局部菌群多样性变化

图1显示的是各实验组中部分蒙古沙鼠胃内菌群 DGGE 图谱,每1条泳道中的条带数量可反映蒙古沙鼠胃内菌种群数,条带灰度可反映不同种细菌在经过 PCR 扩增后相对量的趋势。其中 A 组可见菌群结构最为复杂,由多种细菌组成,这些菌群大部分是不可培养的细菌,在应用传统的细菌培养和鉴定方法研究肠道微生态变化中是无法得到的。各实验组条带数量:A 组(21.6 ± 2.5),B 组(3.3 ± 1.1),C 组(14.6 ± 2.4),D 组(7.2 ± 2.2),其中 C 组统计的为定植阳性的标本,经统计学分析,各组间在条带数量上均有明显差异($P < 0.05$)。



2,3:A 组;1,17~19:B 组;8,9,11,12:C 组;4~7,13~16:D 组;10: M12 菌株基因组;20:PCR 扩增试剂阴性对照;A1~A8、AD1、AD2、共1、共2:特异条带

图1 各实验组中部分蒙古沙鼠胃内菌群 DGGE 图谱

2.3 特异条带测序

以平均光密度值 50 为 cut-off 值,通过平行对位比较,切取各组间差异条带和共同条带,见图 1。A1~A8 为 A 组主要或独有带,AD1、AD2 为 A 组与 D 组共有带,共 1 和共 2 为 4 个实验组共有带。将上述条带扩增回收后,送予测序,测得序列用 BLAST 进行序列比对,结果见表 2。从目前已知情况和比对结果发现,正常蒙古沙鼠胃内的菌群结构主要是以肠杆菌属为主要优势菌群,它与乳杆菌属以及其他一些不可培养的细菌共同组成。

表2 特异条带比对结果

编号	比对结果	Max ident
A1	乳杆菌属	98%
A2	不可培养的细菌	95%
A3	乳杆菌属	97%
A4	不可培养的细菌	98%
A5	罗氏菌属	96%
A6	不可培养的细菌	93%
A7	不可培养的细菌	95%
A8	不可培养的细菌	97%
AD1	不可培养的细菌	96%
AD2	不可培养的细菌	98%
共1	肠杆菌属	99%
共2	不可培养的细菌	99%

3 讨论

胃肠道微生态系统是机体微生态系统的重要组成部分,目前研究主要集中在肠道微生态上,对胃内微生态的研究还处于起步阶段。而胃内存在大量微生物对机体免疫应答和生物屏障方面都有影响^[4],胃内有不同于肠道的局部微环境和菌群结构,因此研究胃内菌群结构及其与胃部致病菌 *Hp* 感染之间的相互作用,可以为胃部疾病的防治提供新策略^[5]。

目前,对于胃肠道菌群组成结构的检测方法主要有这几大类:①细菌涂片检测法;②细菌培养鉴定法;③分子生物学技术。前 2 种方法对于体外培养只能培养出总数 10%~50% 的胃内菌群而言,存在着较大的局限性。分子生物学方法近年来被广泛应用于微生物学方面的研究,弥补传统的菌群研究方法的缺点,可以更加准确、直观地对特定微生态系统中的细菌组成,进行分类鉴定和菌群结构的分析^[6]。PCR-DGGE 通过对 DGGE 图谱进行多样性分析,能更加准确和全面地检测到样品中的菌种组成和优势菌种^[7],但目前该方法对于胃内菌群结构的研究还处于初始阶段,本研究将 PCR-DGGE 方法应用到胃内菌群结构的研究中,分析 *Hp* 定植对胃内菌群结构的影响,以期探明 *Hp* 相关疾病和胃内菌群之间的相互关系。

Hp 的唯一天然宿主是人类,本室经过多年研究,建立了成熟的 *Hp* 蒙古沙鼠感染定植模型。由于蒙古沙鼠胃内 pH 值较人更高^[8],达到了 3~4,导致杂菌种类较人胃多,直接感染 *Hp* 定植较为困难,因此先用一定剂量的预处理液对实验蒙古沙鼠胃内进行预处理,造成胃内菌群结构改变,模拟人胃内微环境,从而有利于 *Hp* 的定植^[9-10]。DGGE 图谱显示 A、B 2 组的指纹图谱存在差异,提示预处理液对沙鼠胃内菌群结构有明显的影响,一方面可能是由于预处理液对胃内菌群有直接的杀灭作用,另一方面则预处理液可能改变了胃内微环境,引起胃内如 pH 值等理化因素的变化,从而出现与空白对照组不同的指纹图谱。A 组与 C 组、B 组与 D 组在图谱上的差异,说明无论是正常胃内微环境下,还是经过预处理液预处理后的胃内微环境情况下,*Hp* 的定植都会对胃内微环境产生影响,抑制或促进部分细菌的定植和生长,从而影响菌群结构,而不仅仅是以前报道的主要是竞争性抑制其他细菌的生长^[11-12],这也从侧面说明 *Hp* 的定植对整个菌群结构的影响不仅仅是直接作用^[2,13],更多是通过定植后改变微环境而产生的间接作用。

对于 A1 和 A3 这 2 个条带代表的细菌经过后期

的测序比对为乳杆菌属(表3),一方面说明蒙古沙鼠胃内原本就存在乳杆菌的定植^[14],且不止1种乳杆菌;另一方面从图1可看出从C组(不预处理直接Hp灌胃)抽出的4个标本虽然都有Hp的定植,在A1处无条带,在A3处有条带,但不如A组的A3条带灰度高,这说明Hp的定植对蒙古沙鼠胃内乳杆菌的种类和数量都会有一定的影响。

对于AD1和AD2,只要有Hp定植的样本,均有这2种条带出现,而在B组中没有这2种条带出现,可以认为预处理液将其清除或让其存在的状态和水平降至很低以至于无法检测,经过后期的测序比对,这2种细菌均是不可培养的细菌(表3),但其能在D组被检测到,我们可理解为其恢复定植或存在的状态和水平得以恢复,这种现象应该与Hp的定植有一定的相关性。D组的菌群数量与B组之间的差异,说明预处理会大面积杀灭胃内杂菌,严重改变胃内微环境,但此时经过Hp灌胃定植,会再一次改变胃内的微环境,进而再一次改变胃内菌群结构。

综上所述,本研究一定程度上发现在动物模型中Hp的定植会引起胃内菌群的改变,正常胃内环境的pH值较低,这可以抑制大多数细菌的生长,在局部形成一个相对均衡的菌群结构。而Hp的定植和感染可能会打破这一平衡,引起局部菌群种类和结构的改变。这种改变主要体现在以下2个方面:①在本实验所使用的Hp灌胃数量级下,虽不会影响胃内主要菌种(图1共1、共2等)的主导地位,但其定植会竞争性抑制一部分种类的细菌,从而引起菌群结构改变,其中以乳杆菌属较为明显,从种类和数量上都会受到因Hp定植带来的抑制影响;②经过预处理液处理过的胃内环境遭到破坏,菌群种类和数量大幅度减少,有利于Hp的定植,但同时其定植又会在一定程度上改变胃内微环境,会对原本被预处理液清除的一些菌种(AD1和AD2)起一个促进恢复的作用。以上2个方面可以理解为Hp的定植对胃内菌群的影响主要是抑制和促进作用,但这2个作用是相互的还是单方面的?特别是对于乳杆菌而言,它和Hp之间的作用到底仅仅是Hp对乳杆菌单方面产生抑制,还是相互抑制?这也是此项研究下一步将要进行的工作。

参考文献:

[1] Marshall B J, Warren J R. Unidentified curved bacilli in the stomach

of patients with gastritis and peptic ulceration [J]. Lancet, 1984, 1 (8390): 1311-1315.

- [2] Jonkers D, Gisbertz I, de-Bruine A, et al. *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* bacterial flora in gastric mucosal and tumour specimens of patients with primary gastric lymphoma [J]. Eur J Clin Invest, 1997, 27(11): 885-892.
- [3] Jiang Y, Gao F, Xu X, et al. Changes in the composition of the bacterial flora on tray-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE and real-time PCR [J]. J Food Sci, 2011, 76(1): M27-M33.
- [4] Lofgren J L, Whary M T, Ge Z, et al. Lack of commensal flora in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia [J]. Gastroenterology, 2011, 140(1): 210-220.
- [5] Konturek P C, Konturek S J, Brzozowski T. *Helicobacter pylori* infection in gastric cancerogenesis [J]. J Physiol Pharmacol, 2009, 60(3): 3-21.
- [6] Fushuku S, Fukuda K. Gender difference in the composition of fecal flora in laboratory mice, as detected by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [J]. Exp Anim, 2008, 57(5): 489-493.
- [7] Fushuku S, Fukuda K. Inhomogeneity of fecal flora in separately reared laboratory mice, as detected by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [J]. Exp Anim, 2008, 57(2): 95-99.
- [8] Watanabe T, Tada M, Nagai H, et al. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils [J]. Gastroenterology, 1998, 115(3): 642-648.
- [9] 郭刚, 王毅超, 邹全明, 等. 幽门螺杆菌长期感染蒙古沙鼠模型的建立 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(6): 683-684.
- [10] 刘开云, 郭刚, 解庆华, 等. 沙鼠感染幽门螺杆菌后胃黏膜 INF- γ 、IL-4 及 IL-12p40 表达水平的分析 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(13): 1320-1322.
- [11] Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria [J]. Microbes Infect, 2002, 4(3): 319-324.
- [12] 郭刚, 童文德, 邹全明, 等. HP0318 基因在幽门螺杆菌适应性定植中的作用研究 [J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(11): 1006-1009.
- [13] Monstein H J, Tiveljung A, Kraft C H, et al. Profiling of bacterial flora in gastric biopsies from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis and histologically normal control individuals by temperature gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis [J]. J Med Microbiol, 2000, 49(9): 817-822.
- [14] Ohkusa T, Okayasu I, Miwa H, et al. *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils [J]. Gut, 2003, 52(6): 797-803.

(收稿:2012-01-14;修回:2012-02-29)

(编辑 邓强庭)