

# 圆球形幽门螺杆菌生物学性状的研究

邓朝晖 许春娣 陈舜年 奚容平

**【摘要】** 目的 通过改变幽门螺杆菌(*Hp*)体外培养的温度条件,诱导 *Hp* 从螺旋形转变为圆球形,研究圆球形 *Hp* 生物学性状并阐明其致病性。方法 取临床患儿胃黏膜进行 *Hp* 分离培养、鉴定和纯培养,随后洗脱纯种 *Hp* 进行液体培养。根据不同的温度条件,分为 3 组:①常温组:液体培养温度 37℃、微需氧、pH 7、震荡(120 r/min)并加小牛血清,获得的细菌为正常弯曲形 *Hp*;②高温组:液体培养温度 40℃,其余条件同常温组;③低温组:液体培养温度 25℃,其余条件同常温组。研究培养获得细菌的形态及其超微结构,检测圆球形 *Hp* 的尿素酶活性和尿素酶基因。结果 常温液体培养的 *Hp* 呈螺旋形,高温或低温液体培养的细菌呈圆球形。圆球形 *Hp* 光镜下为圆球形或粗短杆状,电镜下可分 2 类,一类细胞体积较大,细胞膜完整,胞质疏松,鞭毛脱落;另一类细胞较小,有完整的细胞膜且有鞭毛。圆球形 *Hp* 尿素酶活性为阴性,411 bp 尿素酶 A 基因的 PCR 为阳性。结论 圆球形 *Hp* 是适应外部不良条件的一种生存方式,完整的细胞结构是维持细胞新陈代谢的基础,鞭毛和尿素酶基因的存在可能是其具备致病性的基础。

**【关键词】** 幽门螺杆菌;圆球形;生物学;致病性

**Study on biological characteristics of coccoid form *Helicobacter pylori*** DENG Zhaohui, XU Chundi, CHEN Shunian, et al. Department of Pediatrics, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

**【Abstract】 Objective** Coccoid form *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is now believed to play a role in the transformation of *H. pylori* and in relapses after antibiotic therapy, however its biological characteristics remain controversial. In this study, we induced morphological conversion of *H. pylori* from spiral to coccoid form by different culture temperatures and studied its biological characteristics and pathogenetic mechanism. **Methods** The *H. pylori* strain used in this study was isolated from gastric antrum of patients. The cells were grown in solid culture (Campylobacter agar medium, 10% vol/vol sheep blood and Skirrow's supplement) at 37℃ under microaerophilic conditions (5% O<sub>2</sub>, 7% CO<sub>2</sub>, 8% H<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>). Subsequent assay and subculture were performed. Pure culture was harvested and suspended in liquid medium (brain-heart infusion, 10% calf serum, Skirrow's supplement). Liquid culture was divided into three groups in different terms of culture temperatures: ① normothermic group: it was supplemented with calf serum at 37℃ under microaerophilic conditions, pH 7 and agitation (120 r/min) to obtain spiral-shaped bacterium; ② hyperthermic group: the culture temperature was 40℃, and the other conditions were the same as those of the normothermic group; ③ hypothermic group: culture temperature 25℃ and the other conditions were the same as those of the normothermic group. We observed the morphology and ultrastructure by light microscopy and electronmicroscopy. Detection of the activities of urease was taken by rapid urease reagent and the gene variety of urease A (411 bp UreA, ureA<sub>1</sub> 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3' UreA<sub>2</sub> 5'-CTCCTTAATTGTTTTAG-3') by PCR. **Results** The coccoid *H. pylori* were transformed from spiral form by hyperthermia and hypothermia. Coccoid forms were observed under light microscopy. Under electronmicroscopy, some coccoid *H. pylori* exhibited as small cells with intact cellular membranes and flagella, others presented as large cells without flagella. The urease reaction was negative for coccoid forms. 411 bp UreA in coccoid *H. pylori* were shown to be positive by PCR. **Conclusion** Extremely high or low temperatures during culture may be considered as a necessary environment for *H. pylori* transformation. The morphological conversion of *H. pylori* from spiral to coccoid form was the expression of adaptation to an unsuitable environment. Intact cellular structures may be necessary for its metabolism. Flagella and urease genes may be prerequisite for its patho-

genetic mechanism. (Shanghai Med J, 2003, 26 309-311)

**【Key words】** Helicobacter pylori; Coccoïd form; Biology; Pathogenesis

幽门螺杆菌(*Hp*)是成人慢性活动性胃炎、消化性溃疡及胃癌的重要致病因素。近年来,*Hp*感染在小儿消化系统疾病中的作用也逐渐被临床医师重视。业已证明,*Hp*存在螺旋形和圆球形2种形态。感染期*Hp*多以螺旋形存在于宿主胃黏膜层,但在人体胃黏膜中也发现圆球形*Hp*<sup>[1]</sup>。*Hp*从螺旋形转变为圆球形的原理、圆球形*Hp*的生物学本质及其作用至今尚无定论。本研究通过改变*Hp*体外培养的温度,诱导*Hp*从螺旋形转变为圆球形,并进一步研究其生物学性状,旨在阐明圆球形*Hp*在疾病传播和复发中的作用。

### 材料与方法

#### 一、材料

(一) 菌株 ① 实验菌株:上海第二医科大学附属瑞金医院小儿胃镜室患儿临床分离株;② 标准菌株:NCTC11637(上海生物制品所)。

(二) 培养基 ① 固体培养基:弯曲菌琼脂培养基(Oxoid公司)+10%(v/v)新鲜羊血+*Hp*选择抗生素(Skirrow选择抗生素);② 液体培养基:脑心浸液(Difco公司)+10%(v/v)小牛血清+*Hp*选择抗生素(Skirrow选择抗生素)。

#### 二、方法

(一) *Hp*培养和球形诱变 选择消化性溃疡患儿的胃窦黏膜标本,置于固体培养基,37℃微需氧环境(5% O<sub>2</sub>、7% CO<sub>2</sub>、8% H<sub>2</sub>、80% N<sub>2</sub>)培养5~7 d,然后取经过鉴定的*Hp*菌落进行纯培养,再用脑心浸液洗下细菌,分2份置于液体培养基培养。根据液体培养温度条件的不同分为3组:① 常温组:温度37℃、微需氧(5%)、pH 7、震荡(120 r/min)并加小牛血清;② 高温组:温度40℃,其余条件与常温组相同;③ 低温组:温度25℃,其余条件与常温组相同。

(二) *Hp*形态观察 光镜观察:细菌涂片革兰染色,高倍镜下观察圆球形*Hp*形态。电镜观察:1 ml细菌培养液中加入1%戊二醛固定30 min, PBS洗2次,2%磷钨酸负染1 min, HITACHI扫描电镜观察细菌形态。

(三) 尿素酶活性测定 快速尿素酶测定试剂由上海惠泰医疗科技公司提供。试剂颜色<5 min

变红为尿素酶实验阳性,>5 min变红为弱阳性,>24 h仍未变色为阴性。

(四) 尿素酶基因PCR 扩增尿素酶A基因的引物为:ureA<sub>1</sub>:5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3';ureA<sub>2</sub>:5'-CTCCTTAATTGTTTTTAG-3';扩增片段长度为411 bp,按方法制备模板,DNA扩增条件参照文献。扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 结 果

#### 一、圆球形*Hp*形态

常温组液体培养的细菌呈螺旋形,高温组和低温组液体培养的细菌呈圆球形。光镜下圆球形*Hp*为圆球形或粗短杆状(图1,见插页)。电镜下圆球形*Hp*直径为0.3~0.8 μm,可分为2类,一类细胞体积较大,细胞膜完整,胞质疏松,鞭毛脱落(图2,见插页);另一类细胞较小,有完整的细胞膜,且有鞭毛(图3,见插页)。

#### 二、尿素酶活性测定

圆球形*Hp*尿素酶反应均为阴性。

#### 三、PCR结果

诱变产生的圆球形*Hp*尿素酶A基因片段扩增为阳性,基因片段未缺失(图4)。



M: 标记;泳道1:标准菌株 NCTC11637 扩增产物;泳道2:阴性对照组;泳道3~6:圆球形*Hp*扩增产物

图4 尿素酶A基因PCR扩增片段凝胶电泳结果

### 讨 论

圆球形*Hp*的生物学特征及其意义目前尚存在争论。由于圆球形*Hp*不能在体外进行传代培养,在螺旋形转变为圆球形过程中无需蛋白质合成,因此其被认为是一种退化、衰老甚至死亡的形式<sup>[2,3]</sup>。然而更多的研究表明,圆球形*Hp*是*Hp*暂时性适应不适宜环境的一种表现形式,是*Hp*的休

眠期<sup>[4]</sup>。

在实验条件下,控制不同的培养条件如氧气、pH 值、温度、营养成分、延期培养或抗生素诱变等,可诱导圆球形 *Hp* 的形成<sup>[5]</sup>。Bode 等<sup>[6]</sup>用抗生素诱变产生圆球形 *Hp*,并观察到圆球形 *Hp* 具有完整的细胞结构,如细胞壁、细胞膜、细胞浆、鞭毛、磷酸盐,而完整的细胞结构是维持细胞新陈代谢的基础,细胞中的磷酸盐能维持代谢水平。Kusters 等<sup>[2]</sup>研究发现,螺旋形 *Hp* 向圆球形 *Hp* 转变过程中,细菌的一端形成泡状结构,由于泡状结构逐渐变大,使细菌弯曲成 U 形,最终完全形成圆球形,圆球形 *Hp* 没有清晰的原浆柱(protoplasmic cylinder),细菌膜的完整性也丧失。本研究观察到,在升高或降低液体培养温度后,*Hp* 可由杆状转变成圆球形,同时发现圆球形也存在多种形态,典型表现为 2 种,一种细胞较小,有完整的细胞膜且有鞭毛,另一种细胞体积较大,胞质疏松,鞭毛脱落。前一种可能是球形变的早期,而后一种可能为球形变的晚期。

国内外研究发现,圆球形 *Hp* 具有酶的活性。Hua 等<sup>[7]</sup>通过延期培养诱导产生圆球形 *Hp*,发现延期培养 14 d 的圆球形 *Hp* 尿素酶活性水平与螺旋形 *Hp* 相同。本研究中圆球形 *Hp* 尿素酶活性消失可能与不同的诱导条件有关<sup>[8]</sup>。尽管尿素酶活性消失,但 PCR 检测圆球形 *Hp* 尿素酶 A 基因为阳性结果,提示 *Hp* 球形变后与定居毒力有关的基因片段未发生缺失,这使圆球形 *Hp* 在适宜的条

件下,能回复毒力导致疾病复发。

本研究表明,圆球形 *Hp* 是 *Hp* 适应外部不良条件的一种生存方式,它在临床 *Hp* 的传播、致病或复发中可能具有重要意义。

#### 参 考 文 献

- 1 Chan WY, Hui PK, Leung KM, et al. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol*, 1994, 102: 503-507.
- 2 Kusters JG, Gerrits MM, van Strijp JA, et al. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*, 1997, 65: 3672-3679.
- 3 Eaton KA, Catrenich CE, Makin KM, et al. Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis*, 1995, 171: 459-462.
- 4 Andersen AP, Elliott DA, Lawson M, et al. Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 2918-2922.
- 5 Catrenich CE, Makin KM. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand J Gastroenterol*, 1991, 181(suppl): 58-64.
- 6 Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect*, 1993, 111: 483-490.
- 7 Hua J, Ho B. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? *Microbios*, 1996, 87: 103-112.
- 8 Gibbon LT, Barer MR. Oxidative metabolism in non-culturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* cells studied by substrate enhanced tetrazolium reduction and digital image processing. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3379-3384.

(收稿日期: 2002-06-28)

(本文编辑: 唐清蓉)

## 《上海医学》2003 年第 7 期要目

类风湿性关节炎治疗的现状及展望 .....	鲍春德
白介素 10 启动子区域基因变异与中国人狼疮发病相关 .....	沈南等
小剂量激素合并霉酚酸酯治疗狼疮性肾炎 .....	戴岷等
系统性红斑狼疮合并急性冠状动脉综合征 4 例报道及文献复习 .....	吕良敬等
类风湿因子三种检测方法对类风湿性关节炎诊断价值的研究 .....	章菲菲等
X-连锁无丙种球蛋白血症合并幼年特发性关节炎 .....	王晓川
粘弹性物补充疗法及关节灌洗术的现状 .....	施治青等
发热、全血细胞减少、多浆膜腔积液 .....	郭强等

## 宫颈上皮内瘤变及鳞癌中钙粘附素的表达研究

陶雯琪等 (正文见 305 页)

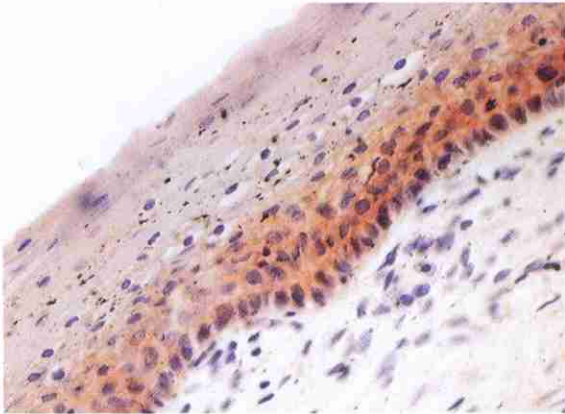


图1 正常宫颈上皮的 E-cadherin 表达均在鳞状上皮基底层细胞 (免疫组织化学 ABC 法,  $\times 100$ )

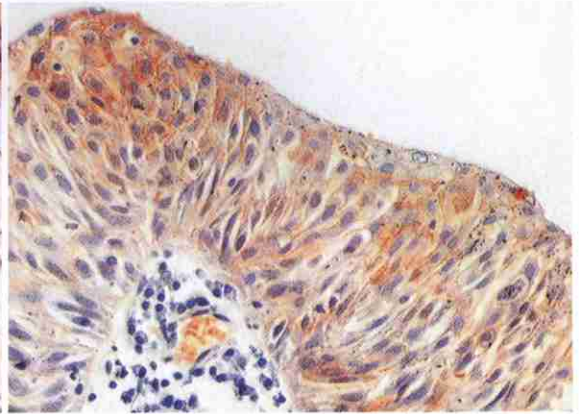


图2 CIN II E-cadherin 表达在中层及表层细胞 (免疫组织化学 ABC 法,  $\times 400$ )

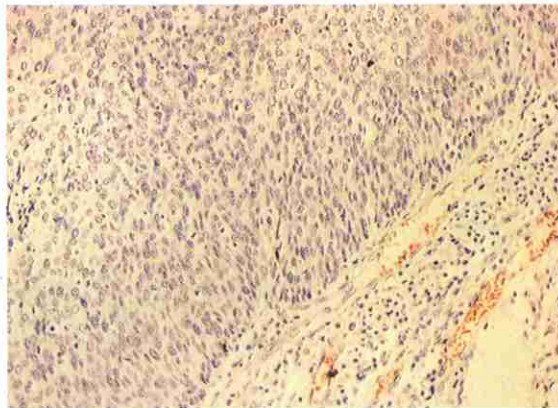


图3 多数宫颈浸润性鳞癌 E-cadherin 无表达 (免疫组织化学 ABC 法,  $\times 40$ )

## 圆球形幽门螺杆菌生物学性状的研究

邓朝晖等 (正文见 309 页)



图1 光镜下圆球形 Hp 形态 (革兰染色,  $\times 1000$ )

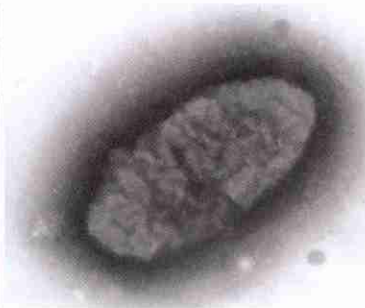


图2 电镜下圆球形 Hp 形态: 细胞体积较大, 细胞膜完整, 胞质疏松, 鞭毛脱落 ( $\times 14000$ )

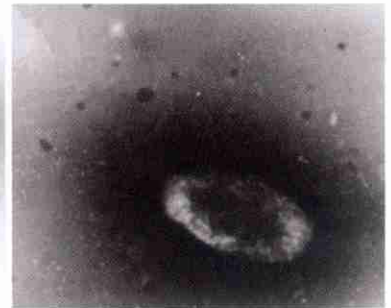


图3 电镜下圆球形 Hp 形态: 细胞较小, 有完整的细胞膜, 且有鞭毛 ( $\times 16000$ )