

C₅₇BL/6小鼠幽门螺杆菌感染动物模型的建立

田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕

田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕, 中南大学湘雅医院传染科, 湖南省长沙市 410008
田雪飞, 男, 1973-01-26 生, 湖南省桑植县人, 土家族, 2001 年湖南中医药大学博士, 2002 年中南大学湘雅医院博士后流动站, 主要从事幽门螺杆菌方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271171
国家教育部骨干教师基金资助项目, No. 教技司 2000-65
湖南省自然科学基金资助项目, No.01jyy2114
湖南省卫生厅科研基金资助项目, No. 00022
项目负责人: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院传染科. xgfan@hotmail.com
电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-02-24

Establishment of a mouse model colonized by *Helicobacter pylori*

Xue-Fei Tian, Xue-Gong Fan, Yan Zhang, Yan Huang

Xue-Fei Tian, Xue-Gong Fan, Yan Zhang, Yan Huang, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30271171, Teacher Foundation of the National Ministry of Education, No.2000-65, Nature Scientific Foundation of Hunan Province, No. 01jyy2114 and the Scientific Research Foundation of Health Bureau of Hunan Province No. 00022.

Correspondence to: Dr. Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2004-02-11 Accepted: 2004-02-24

Abstract

AIM: To establish a mouse model of *H pylori* infection.

METHODS: C57BL/6 strain mouse, used as an experiment animal, was inoculated orally *H pylori* SS1 strain and fed in laminar flow cabinet. Inoculated mouse examined by HE stain, carbolic acid- basic fuchsin stain, immunohistochemical stain, urease test and bacteria cultivation. Both bacteria DNA from gastric tissue and *H pylori* isolated from stomach were analyzed by PCR and gene sequencing.

RESULTS: The bacteria isolated from stomach had the identical shape and character compared with inoculated bacteria. Bacteria colonizing in antrum crypt and infiltration of inflammatory cells in gastric submucosa were observed. *H pylori* 16SrRNA and *cagA* gene were amplified successfully from gastric tissue DNA, gene sequencing results showed the complete concordance.

CONCLUSION: After inoculated into C57BL/6 mouse 2 months, *H pylori* SS1 can colonize successfully the mouse stomach and cause chronic gastritis.

Tian XF, Fan XG, Zhang Y, Huang Y. Establishment of a mouse model colonized by *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(6):1313-1316

摘要

目的: 建立幽门螺杆菌(*H pylori*)小鼠感染模型。

方法: 以 C₅₇BL/6 小鼠为实验动物, 经口感染接种 *H pylori* 悉尼株(SS1), 置层流柜中饲养。用 HE 染色、石炭酸-碱性品红染色、免疫组织化学染色、尿素酶实验、细菌培养等方法检测接种小鼠, 并用 PCR、基因测序方法对胃组织细菌、胃组织分离培养细菌 DNA 进行分析。

结果: 小鼠胃组织分离培养的细菌与接种细菌形态及特性相同。胃窦隐窝可观察到细菌定植, 胃黏膜下层可见炎症细胞浸润。胃组织 DNA 中成功扩增出 *H pylori* 16SrRNA 及 *cagA* 基因的目的片段, 基因测序结果显示与接种菌株序列完全一致。

结论: *H pylori* SS1 经口接种 C₅₇BL/6 小鼠 2 mo 后可成功在胃内定植并导致慢性胃炎。

田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕. C₅₇BL/6 小鼠幽门螺杆菌感染动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1313-1316

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1313.asp>

0 引言

研究者一直在探索与人类病理变化类似的幽门螺杆菌(*H pylori*)感染动物模型, 1987 年首次用限菌小猪建立实验性 *H pylori* 感染模型以来, 已有猕猴、小鼠、蒙古沙鼠、大鼠、猪、犬、猫等多种动物应用于模型^[1-9]。虽然与人类感染 *H pylori* 的病理变化有一定差距, 但在 *H pylori* 致病机制、疫苗筛选、新药疗效考察等研究中, 动物模型仍发挥了重要作用。目前国内应用较多的模型为沙土鼠感染模型, 而小鼠动物模型尚不成熟, 为此, 我们采用 C₅₇BL/6 小鼠为研究对象进行了 *H pylori* 的感染模型制作。

1 材料和方法

1.1 材料 14 只 C₅₇BL/6 小鼠(SPF), 6-8 周龄, ♂, 体质 25-30 g. *H pylori* 使用悉尼株(SS1). 兔抗 *H pylori* 多克隆抗体购自丹麦 Dako 公司, SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司, PCR 相关试剂为大连宝生物工程有限公司产品. PCR 以接种的 *H pylori* 悉尼株为阳性对照细菌, 阴性对照细菌为购自中国预防医学科学院流行病学微生物研究所的空肠弯曲菌(Lior₄₈87519), 阴性对照为灭菌双蒸水。

1.2 方法 H pylori 培养按我研究组建立的 H pylori 培养方法进行^[10]。造模方法参照 Lee et al^[11]方法: 将 C₅₇BL/6 小鼠完全随机分为模型组与正常对照组, 接种前禁食 24 h。H pylori 培养 72 h 收获, 刮取菌落, 灭菌 0.01 mmol/L PBS 混悬, 浓度 3×10^8 CFU/L, 0.5 mL/只灌胃接种, 隔日 1 次, 共 3 次。对照组给予等量灭菌 PBS。接种后将动物置层流柜中饲养, 2 mo 后处死。样本获取及检测方法: 取全胃沿胃大弯剪开, 生理盐水漂洗去除胃内容物, 一半胃组织 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋切片, 病理切片包括 HE 染色, 免疫组织化学染色及石炭酸 - 碱性品红染色^[12]。H pylori 的定植水平等级评分标准参照迟晶方法制订^[13]。免疫组织化学染色一抗采用兔抗 H pylori 多克隆抗体, SABC 法, DAB 显色, 苏木素轻度复染。一半胃组织用于细菌培养以及 PCR 检测, 组织及细菌 DNA 提取参照彭小宁等方法^[14]。PCR 引物设计^[15]: 16SrRNA 基因上游引物 5' -GTC ATG ACG GGT ATC C-3', 下游引物: 5' -GAT TTT ACC CCT ACA CCA-3', 扩增出 400 bp 片段, 55 °C 退火 1 min 30 s, 72 °C 延伸 2 min; cagA 基因上游引物 5' -ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A-3', 下游引物: 5' -TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T-3', 扩增出 297 bp 片段, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s; 16SrRNA, cagA PCR 产物纯化后基因测序, 大连宝生物工程技术有限公司完成。

2 结果

2.1 胃黏膜细菌培养 从胃黏膜分离培养的 H pylori 在培养平板上可见清晰的针尖样菌落, 尿素酶试纸检测呈强阳性, 革兰染色阴性, 形态与原始接种细菌无差别, 光镜下均为弯曲杆状(图 1A), 免疫组织化学染色结果菌体为棕黄色(图 1B)。

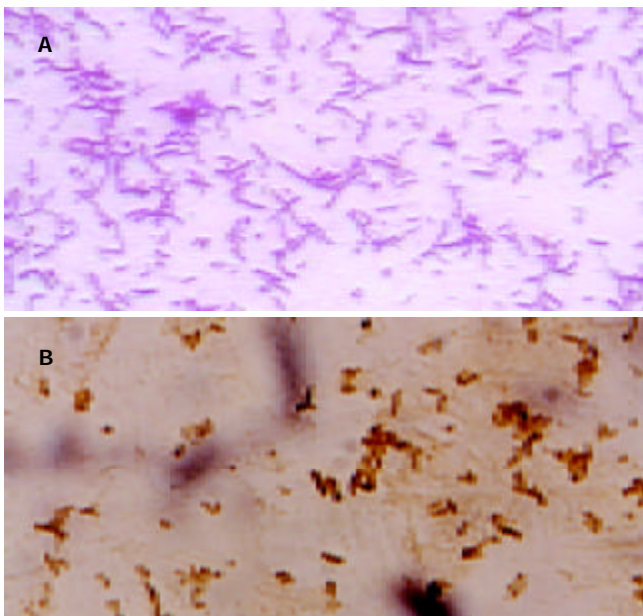


图 1 小鼠胃黏膜分离培养 H pylori × 1 500, A: 红色弯曲杆状(Gram); B: 深棕色呈弯曲杆状(SABC)。

2.2 定植与分布 在 8 wk H pylori 胃贲门部(1.17 ± 0.41), 胃体部(0.17 ± 0.41)及胃窦部位(2.33 ± 0.52)都可观察到细菌的定植, 以胃窦部位的黏膜腺体观察到的定植细菌最多($P < 0.05$), 大量细菌分布于胃窦隐窝, 胃体部相对少, 仅见少量细菌散在分布, 有的动物甚至未观察到。在胃腺体表面及上层黏液中可见大量细菌(图 2A), 油镜下观察呈清晰的 S 状或螺旋状(图 2B), 与人类感染类似, 光镜下可见一些细菌紧密黏附于小鼠胃上皮细胞。细菌免疫组织化学结果进一步证实了定植细菌为 H pylori, 菌体染色为棕黄色或深棕色(图 2C)。

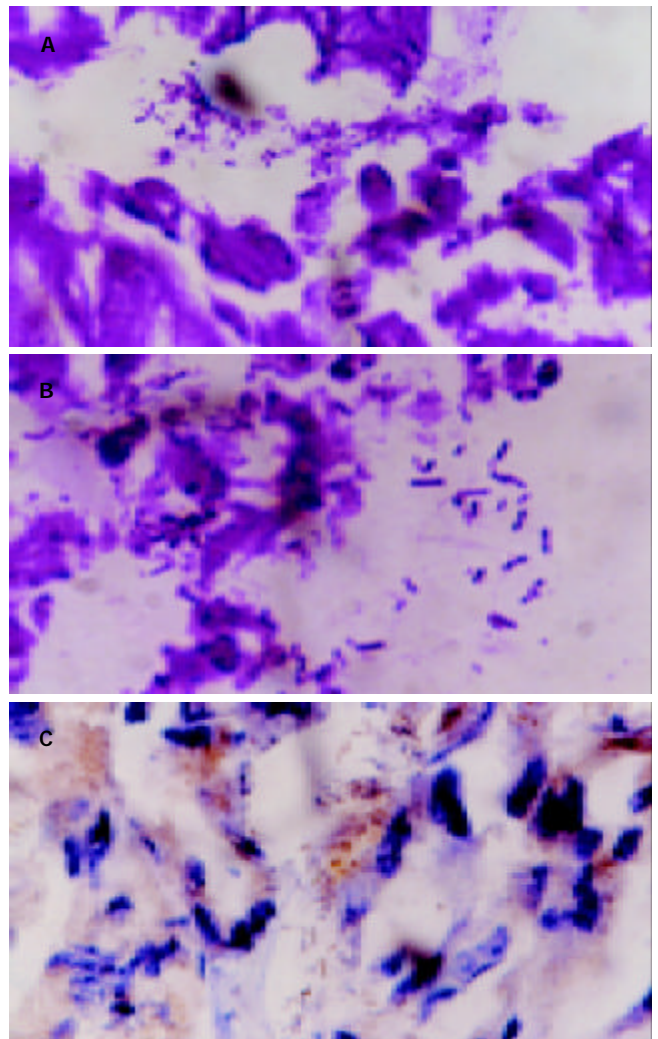


图 2 胃黏膜上可见大量 H pylori。A: 石炭酸 - 碱性品红染色 × 600; B: S 形或螺旋形, 石炭酸 - 碱性品红染色 × 1 500; C: SABC × 600。

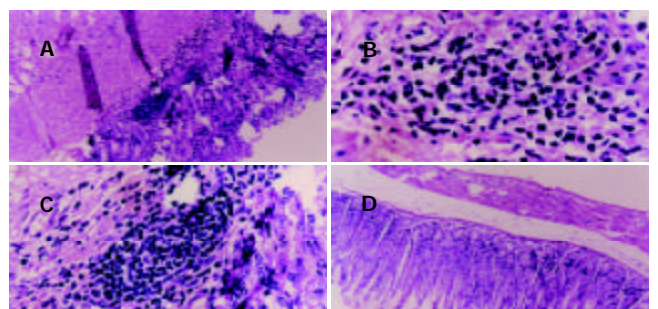


图 3 小鼠胃黏膜(HE)。A: 连续性破坏 × 300; B: 黏膜下层出现淋巴细胞浸润为主的炎症反应 × 600; C: 出现淋巴滤泡 × 600; D: 正常 × 300。

2.3 胃黏膜病理改变 小鼠经过细菌接种 2 mo 后均出现与人类类似的慢性活动性胃炎的病理改变, 出现炎症细胞浸润. 胃黏膜的完整性与连续性受到破坏, 黏膜下层可见大量淋巴细胞浸润并形成淋巴滤泡, 中间夹杂少量中性粒细胞浸润(图 3A-D).

2.4 PCR 及测序结果 在 7 例感染小鼠胃组织 DNA 标本中全部扩增出 400 bp (16S rRNA) 与 297 bp (cagA) 目的片段, 对照细菌及阴性对照未扩增出条带. 取 2 个阳性标本与接种 H pylori SS1 株的 PCR 产物进行序列分析, 用 16SrRNA、cagA 引物进行正向及反向测序, 结果与接种 H pylori SS1 株进行比较, 发现具有 100% 的同源性, 证实成功定植的细菌与原始接种的 H pylori SS1 属于同一株细菌(图 4, 5).

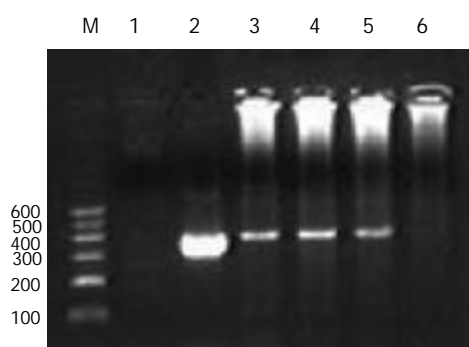


图4 PCR 扩增 H pylori 16SrRNA 基因. M: M₁ 标准; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照细菌(SS1); 3, 4, 5: 阳性组织; 6: 阴性对照细菌(Lior₄₈ 87519).

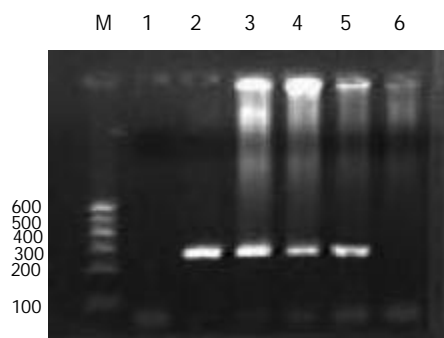


图5 PCR 扩增 H pylori cagA 基因. M: M₁ 标准; 1: 阳性对照; 2: 阳性对照细菌(SS1); 3, 4, 5: 阳性组织; 6: 阴性对照细菌(Lior₄₈ 87519).

3 讨论

迄今已有许多动物被用来接种 H pylori 期望制作出类似于人类细菌感染的动物模型. 1997 年 Lee et al^[11] 鉴定的 H pylori 悉尼株(SS1)目前已被认为是理想的动物模型接种菌株, 经口接种沙土鼠后, 8 mo 可出现炎症细胞浸润、黏膜腺体的异型性增生、肠上皮化生、黏膜萎缩等病理改变^[16]. 我们也采用 SS1 株经口接种, 结果表明 C₅₇BL/6 小鼠的易感性好, 成功率高, 在小鼠胃内定植具有部位选择性, 以胃窦部最多, 这与人类 H pylori 感染胃内定植部位类似. 与人类感染相同, 细菌分布在胃黏膜上皮细胞表层黏液及腺窝内, 甚至侵入上皮细胞间或黏膜固有层内. 此前, 我们曾以临床分离株及

SS1 株接种过中国昆明种小白鼠, 因定植效果太差而放弃. 小鼠接种 2 mo 后虽然未出现溃疡及萎缩性病理改变, 但出现以淋巴细胞浸润为主的慢性炎症反应, 且出现淋巴滤泡, 而淋巴滤泡是 MALT 淋巴瘤的重要病理学改变之一^[17-21]. 已有研究表明, 人 MALT 淋巴瘤的发生与 H pylori 感染具有相关性^[22-27], 增多的淋巴细胞以 B 淋巴细胞为主, 这与 H pylori 感染后 T 淋巴细胞活化引起 B 淋巴细胞增生有关^[28-30]. 为了确证定植细菌来源于经口接种而非外源污染所致, 我们将小鼠胃组织内成功定植的细菌与接种细菌 DNA 进行 PCR 扩增并行测序对比分析, 结果显示成功定植的细菌来源于原始接种菌株, 表明了模型的可靠性. 该动物模型与其他模型相比较, 定植成功率更高, 并且价格便宜, 容易饲养, 具有良好的推广应用前景.

4 参考文献

- Nozaki K, Shimizu N, Tatematsu M. Eradication model employing Mongolian gerbils treated with chemical carcinogen and infected with *Helicobacter pylori*-implications for human cancer prevention. *Nippon Rinsho* 2000;58:1927-1934
- Guo BP, Mekalanos JJ. Rapid genetic analysis of *Helicobacter pylori* gastric mucosal colonization in suckling mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8354-8359
- Wang X, Willen R, Andersson C, Wadstrom T. Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *APMIS* 2000;108:503-508
- Solnick JV, Hansen LM, Canfield DR, Parsonnet J. Determination of the infectious dose of *Helicobacter pylori* during primary and secondary infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immun* 2001;69:6887-6892
- Simpson KW, Strauss-Ayali D, Straubinger RK, Scanziani E, McDonough PL, Straubinger AF, Chang YF, Esteves MI, Fox JG, Domeneghini C, Arebi N, Calam J. *Helicobacter pylori* infection in the cat: evaluation of gastric colonization, inflammation and function. *Helicobacter* 2001;6:1-14
- Rossi G, Fortuna D, Pancotto L, Renzoni G, Taccini E, Ghiara P, Rappuoli R, Del Giudice G. Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2000;68:4769-4772
- Li H, Andersson EM, Helander HF. Reactions from rat gastric mucosa during one year of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 1999;44:116-124
- Oda T, Murakami K, Nishizono A, Kodama M, Nasu M, Fujioka T. Long-term *Helicobacter pylori* infection in Japanese monkeys induces atrophic gastritis and accumulation of mutations in the p53 tumor suppressor gene. *Helicobacter* 2002;7:143-151
- Poutahidis T, Tsangaris T, Kanakoudis G, Vlemmas I, Iliadis N, Sofianou D. *Helicobacter pylori*-induced gastritis in experimentally infected conventional piglets. *Vet Pathol* 2001;38:667-678
- Fan XG, Peng XN, Huang Y, Yakoob J, Wang ZM, Chen YP. *Helicobacter* species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of Chinese patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Infect Dis* 2002;35:1555-1557
- Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386-1397
- 颜亚辉, 沈明, 蔡长美. 石碳酸-碱性品红法检测胃幽门螺杆菌. *临床与实验病理学杂志* 1996;12:345
- 迟晶, 傅宝玉, 九岛亮治, 中岛滋美, 服部隆则. 沙土鼠幽门螺杆菌感染胃炎、胃溃疡动物模型的建立及除菌治疗前后炎症和细胞增生的变化. *世界华人消化杂志* 1999;7:557-560

- 14 彭小宁, 范学工, 黄燕, 王志明, 陈永平. 螺杆菌感染与肝癌关系的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:902-906
- 15 黄燕, 范学工, 陈永平, 李宁, 汤立军. 肝癌组织中螺杆菌16S rRNA基因的检测. *世界华人消化杂志* 2002;10:877-882
- 16 迟晶, 傅宝玉, 宋敏, 展广智, 吴利波, 服部隆则. 砂土鼠胃黏膜幽门螺杆菌长期感染的病理改变. *世界华人消化杂志* 2002;10:415-417
- 17 Zucca E, Bertoni F, Cavalli F. Pathogenesis and treatment of extranodal lymphomas: the fascinating model of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Haematologica* 2003; 8:841-844
- 18 Fukui T, Okazaki K, Tamaki H, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M, Nishi T, Uchida K, Iwano M, Ohana M, Hiai H, Chiba T. Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest* 2004;84:485-492
- 19 Ohkura Y, Furihata T, Kawamata H, Tabuchi M, Kubota K, Terano A, Sakai T, Fujimori T. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis using an image analysis processor. *Gastric Cancer* 2003;6:49-54
- 20 Sepulveda A, Peterson LE, Shelton J, Gutierrez O, Graham DY. Histological patterns of gastritis in *H pylori*-infected individuals with a family history of gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1365-1370
- 21 Konturek JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:23-41
- 22 Lee SK, Lee YC, Chung JB, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS, Suh CO, Yang WI. Low grade gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: Treatment strategies based on 10 year follow-up. *World J Gastroenterol* 2004;10:223-226
- 23 Al-Akwaa AM, Siddiqui N, Al-Mofleh IA. Primary gastric lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:5-11
- 24 Perng CL, Lin HJ, Lo WC, Tseng GY, Sun IC, Ou YH. Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *World J Gastroenterol* 2004;10:602-605
- 25 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with *Hp-cagA* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 26 Morgner A, Miehke S, Stolte M, Neubauer A, Alpen B, Thiede C, Klann H, Hierlmeier FX, Ell C, Ehninger G, Bayerdorffer E. Development of early gastric cancer 4 and 5 years after complete remission of *Helicobacter pylori* associated gastric low grade marginal zone B cell lymphoma of MALT type. *World J Gastroenterol* 2001;7:248-253
- 27 Makinen JM, Niemela S, Kerola T, Lehtola J, Karttunen TJ. Epithelial cell proliferation and glandular atrophy in lymphocytic gastritis: Effect of *H pylori* treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2706-2710
- 28 Umehara S, Higashi H, Ohnishi N, Asaka M, Hatakeyama M. Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 2003;51:8337-8342
- 29 Iyengar P, Deodhare S. Primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type of the endometrium. *Gynecol Oncol* 2004;93:238-241
- 30 Tiemann M, Haring S, Heidemann M, Reichelt J, Claviez A. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in the conjunctiva of a child. *Virchows Arch* 2004;444:198-201

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的和与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.