



# PCR 检测实验恒河猴和食蟹猴群体中 幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染

王立鹏, 李永旺, 郭连香, 时长军

(苏州西山生物技术有限公司, 江苏 215123)

**【摘要】** 目的 调查国内实验恒河猴和食蟹猴中幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染情况。方法 参考文献中的螺杆菌属 16S rRNA 和幽门螺杆菌 16S rRNA 的引物序列, 和新设计的“猕猴螺杆菌”16S rRNA 特异性引物, 在人工养殖的 45 只成年恒河猴和 90 只成年食蟹猴粪便样本中, 通过 qPCR 或常规 PCR 检测来初步调查这两种猕猴中两种螺杆菌的感染情况。结果 在恒河猴中幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染率均为 100%, 在食蟹猴中幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的感染率分别为 100% 和 97.8%。结论 证实我国人工繁育饲养的恒河猴和食蟹猴普遍存在“猕猴螺杆菌”感染。幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”几乎同时存在于所有人工繁育的实验猴个体中, 可能会对这两种猕猴的健康以及相关动物实验结果的准确性存在不利影响。

**【关键词】** 恒河猴; 食蟹猴; 幽门螺杆菌; 猕猴螺杆菌; 感染; 诊断

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0061-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.012

## PCR test of *Helicobacter pylori* and “*Helicobacter macacae*” infections in rhesus and cynomolgus monkey breeding colonies

WANG Li-peng, LI Yong-wang, GUO Lian-xiang, SHI Chang-jun  
(Suzhou Xishan Biotechnology Inc., Suzhou Jiangsu 215123, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the status of *Helicobacter pylori* and “*Helicobacter macacae*” infection in rhesus and cynomolgus monkeys in China. **Methods** With the use of 16S rRNA specific primers for *Helicobacter* spp and *Helicobacter pylori* (HP) from published literatures, and new 16S rRNA specific primers designed for “*Helicobacter macacae*” (HM), we investigated the infection status of these two *Helicobacter* spp in both of 45 rhesus and 90 cynomolgus monkeys by qPCR or conventional PCR on stool samples. **Results** All three primer sets for 16S rRNA exhibited excellently sensitivity and specificity. Both the infection rates of HP and HM were 100% among 45 young adult rhesus monkeys. The infection rate of HP and HM in 90 young adult cynomolgus monkeys were 100% and 97.8%, respectively. **Conclusions** *Helicobacter pylori* and “*Helicobacter macacae*” are present in almost every artificially bred adult rhesus and cynomolgus individuals which may adversely affect the health of laboratory monkeys and the accuracy of related animal experiments.

**【Key words】** Rhesus monkey; Cynomolgus monkey; *Helicobacter pylori*; “*Helicobacter macacae*”; Infection; Diagnosis

[作者简介] 王立鹏(1989-), 男, 硕士。Email: wlpburry@126.com。

[通讯作者] 时长军(1953-), 男, 博士。Email: changjun.shi@vrl.net。

Warren 和 Marshall 在 1983 年从胃炎患者胃粘膜活检标本中首次分离出幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP), 此后以该细菌为代表菌建立了螺杆菌属。目前, 螺杆菌属已有 23 个种<sup>[1]</sup>。幽门螺杆菌, 螺旋形弯曲, 革兰氏染色阴性, 长 2~4  $\mu\text{m}$ , 直径 0.4  $\mu\text{m}$ , 菌体一端有 4 条鞭毛<sup>[2]</sup>。在人体内, 幽门螺杆菌主要定居于胃窦粘膜, 会导致胃炎和胃溃疡, WHO 已将其定为胃癌的第一类致癌因子<sup>[3]</sup>。体外研究表明幽门螺杆菌对多种抗生素敏感, 但是在体内应用发现感染人群的许多幽门螺杆菌对抗生素具有抗性。为了研究出更有效的根治幽门螺杆菌的药物或疫苗, 预防胃癌的发生, 需要构建能够感染幽门螺杆菌的动物模型<sup>[4]</sup>。目前, 只有家猫和非人灵长类是幽门螺杆菌的自然宿主动物<sup>[5]</sup>。

1987~1990 年期间的 5 篇研究报告表明, 在恒河猴 (rhesus monkey) 和南方豚尾猕猴 (Southern pig-tailed macaque) 中存在幽门螺杆菌的自然感染; 而在食蟹猴 (cynomolgus monkey) 中则既没有发现自然感染, 人工感染幽门螺杆菌也无效<sup>[2,6-9]</sup>。1993 年, Takahashi 的团队用人源和恒河猴源的幽门螺杆菌人工感染食蟹猴, 结果证明食蟹猴可以被人工感染幽门螺杆菌<sup>[10,11]</sup>。1999 年, Reindel 等首次发现食蟹猴也存在幽门螺杆菌的自然感染<sup>[12]</sup>。目前, 国内仍未见对猴群中幽门螺杆菌自然感染情况的调查研究。

2001 年, Fox 等学者从恒河猴结肠组织中分离培养出一种新的螺杆菌, 暂时命名为“猕猴螺杆菌” (*Helicobacter macacae*)。“猕猴螺杆菌”, 螺旋形弯曲, 革兰氏染色阴性, 长 2~3  $\mu\text{m}$ , 直径 0.2  $\mu\text{m}$ , 菌体两端各有 1 条带鞘的鞭毛<sup>[13]</sup>。该菌长期存在于肠道中, 可能与结肠炎的发生有关, 引发慢性痢疾、体重下降和脱水等症状<sup>[14]</sup>。目前, 国内尚未有对猴群中该种螺杆菌感染情况的调查研究。

本研究用螺杆菌属 16S rRNA 特异性引物的普通 PCR 方法, 对我国人工繁育的两种猕猴群中的螺杆菌流行情况进行初步调查。确认螺杆菌在猴群中有感染后, 进一步以幽门螺杆菌 16S rRNA 特异性引物实时荧光定量 PCR 方法 (qPCR) 对养殖场恒河猴和食蟹猴的幽门螺杆菌感染进行调查。针对“猕猴螺杆菌” 16S rRNA 特异性保守区域设计引物, 通过 PCR 方法检测我国猕猴和食蟹猴中是否存在“猕猴螺杆菌”感染。由于“*Helicobacter macacae*” (“猕猴螺杆菌”) 尚未被原核生物命名国际委员会

(ICSP) 正式采用, 因此本文用引号标记以示区别。

## 1 材料和方法

### 1.1 猕猴粪便样本

45 只 2~4 岁的雄性恒河猴和 90 只雌雄各半的 4 岁左右食蟹猴的新鲜粪便样本分别采集自不同实验猴人工繁育场, 样本冷藏空运至本公司, -20℃ 保存待用。

### 1.2 粪便样本 DNA 提取

取恒河猴或食蟹猴的粪便样本 200 mg, 用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (天根, 货号#DP328) 提取核酸, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。最终用 100  $\mu\text{L}$  无菌水洗脱, -20℃ 保存待用。

### 1.3 幽门螺杆菌阳性对照制备

*Helicobacter pylori* 株 (ATCC 43504), 用含有血琼脂和 7% 马血等的弯曲杆菌选择性血琼脂培养基, 在 37℃ 微需氧环境下培养。之后用无菌棉棒刮取部分菌落, 计数并稀释至  $10^9$  CFU/mL, 10 倍梯度稀释至  $10^0$  CFU/mL。经 PCR 测试,  $10^3$  CFU/mL 菌液提取的 DNA 模板可作为 PCR 反应的阳性对照。

### 1.4 其他细菌 DNA 样本

从肺炎克雷伯氏杆菌 CVCC3699, 大肠埃希氏菌 CMCC44102, 嗜肺巴斯德杆菌 ATCC35149, 假结核耶尔森 CMCC53504, 乙型溶血性链球菌 CMCC32210, 肺炎链球菌 ATCC49619, 多杀巴斯德杆菌 CVCC458, 金黄色葡萄球菌 CMCC26003, 鸡白痢沙门氏菌 CVCC528, 志贺氏菌 CMCC51252, 小肠结肠耶尔森氏菌 GIM1.265 及空肠弯曲杆菌 ATCC33291 中提取基因组 DNA, 用于 3 种引物的特异性实验。

### 1.5 引物及质粒合成

引物和质粒的合成均由苏州金唯智生物技术有限公司合成和构建。螺杆菌属 16S rRNA 特异性上游引物 HSP767 F: GGCTATGACGGGTATCCG GC, 下游引物 HSP767 R: GCCGTGCAGCACCT GTTTTC<sup>[15]</sup>; 幽门螺杆菌 16S rRNA 特异性上游引物 HP-P1 F: TTTGTTAGAGAAGATAATGACGGTATCTA AC, 下游引物 HP-P1R: CATAGGATTTACACCT GACTGACTATC<sup>[4]</sup>; “猕猴螺杆菌” 16S rRNA 特异性引物 H. M8F: GGGATGCTCTTAGAAATGC, H. M8R: GCTCTTTACGCCAGTGATT, 为本公司设计。HSP767 F/HSP767 R、HP-P1F/HP-P1R 和 H. M8F/H. M8R 的靶序列人工合成后分别连接到

pUC57 载体上,即为 pc12、pc16 和 pc20。

### 1.6 普通 PCR 反应

PCR 仪为 Eppendorf 6321。反应体系包含 10 mM Tris-Cl(pH 8.3),50 mM KCl 和 2 mM MgCl<sub>2</sub>,4 种 dNTP 各 0.2 mM,上下游引物各 0.4 μM,1U rTaq DNA 聚合酶(Takara,#KA201A),5 μL 粪便样本提取的 DNA 模板,总体积为 25 μL。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,进行 35 个循环,之后 72℃ 延伸 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳,5 V/cm,100 bp DNA marker(天根,#BSA22S1)4 μL,凝胶中掺入 0.01% GeneRed(博美达,#41003-0.5 mL)作为荧光染料,由凝胶成像分析仪(上海勤翔,Genosens1560)采集电泳结果。每次实验中,均设置质粒阳性对照和模板空白对照,所有测试组均重复 2 次。

### 1.7 实时荧光定量 PCR 反应

PCR 仪为 ABI 7500 Real-Time PCR System。反应体系为 20 μL,含 2 × Premix Ex Taq(SYBR)10 μL,ROX(50 ×)0.4 μL,上下游引物各 0.2 μM,补加无菌水至 20 μL。反应条件为 95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火延伸 31 s,采集信号,40 个循环;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火延伸 1 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 15 s 绘制溶解曲线。每次实验中,均设置质粒阳性对照和模板空白对照,所有测试组均重复 2 次。

### 1.8 扩增产物测序与比对

部分 PCR 产物送交苏州金唯智生物技术有限公司测序。序列比对分析软件为 DNAMAN 6.0。

## 2 结果

### 2.1 PCR 方法建立

以各自相应的质粒为模板,10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-12</sup> 做系列梯度稀释,用于 3 种引物的敏感性实验,结果表明

HSP767 和 H. M8 的普通 PCR 检测下限为 1 132 拷贝/5 μL,HP-P1 引物的 qPCR 检测下限为 68 拷贝/5 μL。3 对引物均不会扩增鸡白痢沙门氏菌、志贺氏菌、小肠结肠耶尔森氏菌、大肠埃希氏菌及空肠弯曲杆菌等细菌的核酸,表明 3 对引物用于粪便提取核酸的 PCR 特异性好。这一部分的结果未展示。

### 2.2 猕猴中螺杆菌属细菌检测

以 HSP767 引物对恒河猴和食蟹猴的粪便提取 DNA 样本进行 PCR 扩增,45 份恒河猴粪便样本均为螺杆菌阳性;90 份食蟹猴粪便样本中有 89 份为螺杆菌阳性,仅有 1 份样本为螺杆菌阴性。阳性样本扩增产物大小与目的扩增片段相同,为 767 bp。结果见图 1 和图 2。

### 2.3 猕猴中幽门螺杆菌的检测

用 HP-P1 引物对恒河猴和食蟹猴的粪便提取 DNA 样本进行 qPCR 检测,135 份猕猴的粪便样本检测结果全部为幽门螺杆菌阳性,随机选取 3 份样本的扩增产物送交测序并与靶序列进行分析比对,确认扩增产物均为幽门螺杆菌。扩增产物见图 3。

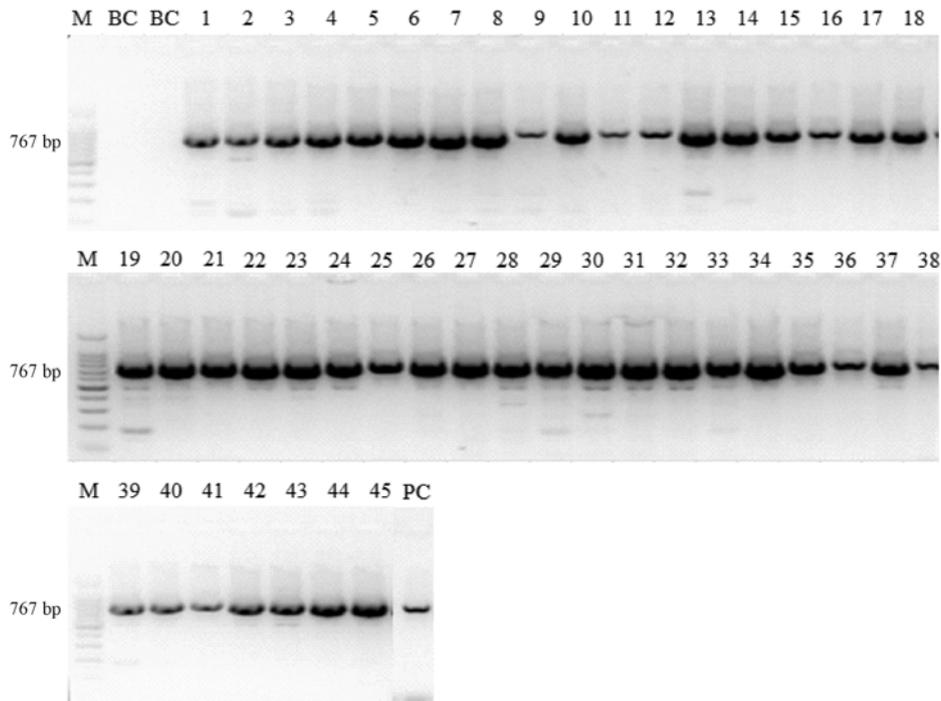
### 2.4 猕猴中“猕猴螺杆菌”的检测

以 H. M8 引物对恒河猴和食蟹猴的粪便提取 DNA 样本进行 PCR 扩增,45 份恒河猴粪便样本均为“猕猴螺杆菌”阳性;90 份食蟹猴样本中,有 88 份为“猕猴螺杆菌”阳性,2 份阴性。阳性样本扩增产物大小与目的片段相同,为 493 bp。随机选取 3 份扩增产物送交测序,结果表明扩增子与靶序列高度相似,确认为“猕猴螺杆菌”。结果见图 4 和图 5。另外,图 4 中展示了这对引物以 *Helicobacter pylori* 菌株 DNA 为模板时,扩增结果是阴性的,表明该引物不扩增幽门螺杆菌。以上六项检测结果的汇总见表 1。

表 1 恒河猴和食蟹猴中螺杆菌感染统计

Tab.1 Statistical analysis of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter macacae* infection in rhesus and cynomolgus monkeys.

检测项目 Test items		阳性数 Positive	阴性数 Negative	感染率 Infection rate
恒河猴 <i>Macaca mulatta</i>	螺杆菌 <i>Helicobacter</i> spp	45	0	100.0%
	幽门螺杆菌 <i>Helicobacter pylori</i>	45	0	100.0%
	“猕猴螺杆菌” <i>Helicobacter macacae</i>	45	0	100.0%
食蟹猴 <i>Macaca fascicularis</i>	螺杆菌 <i>Helicobacter</i> spp	89	1	98.9%
	幽门螺杆菌 <i>Helicobacter pylori</i>	90	0	100.0%
	“猕猴螺杆菌” <i>Helicobacter macacae</i>	88	2	97.8%



M: 100 bp marker ladder; BC: 不含核酸模板的空白对照组;  
PC: 阳性质粒对照 PC12; 泳道 1~45: 为 45 份恒河猴粪便提取 DNA 样本扩增产物

图 1 恒河猴 45 份样本中螺杆菌的检测结果

M, 100 bp marker ladder; BC, blank control without nucleic acid template; PC, positive control with plasmid PC12; Lane 1-45, 45 DNA samples from feces of rhesus macaques.

Fig. 1 PCR results of 45 rhesus macaques stool samples with HSP767 primers for Helicobacter.

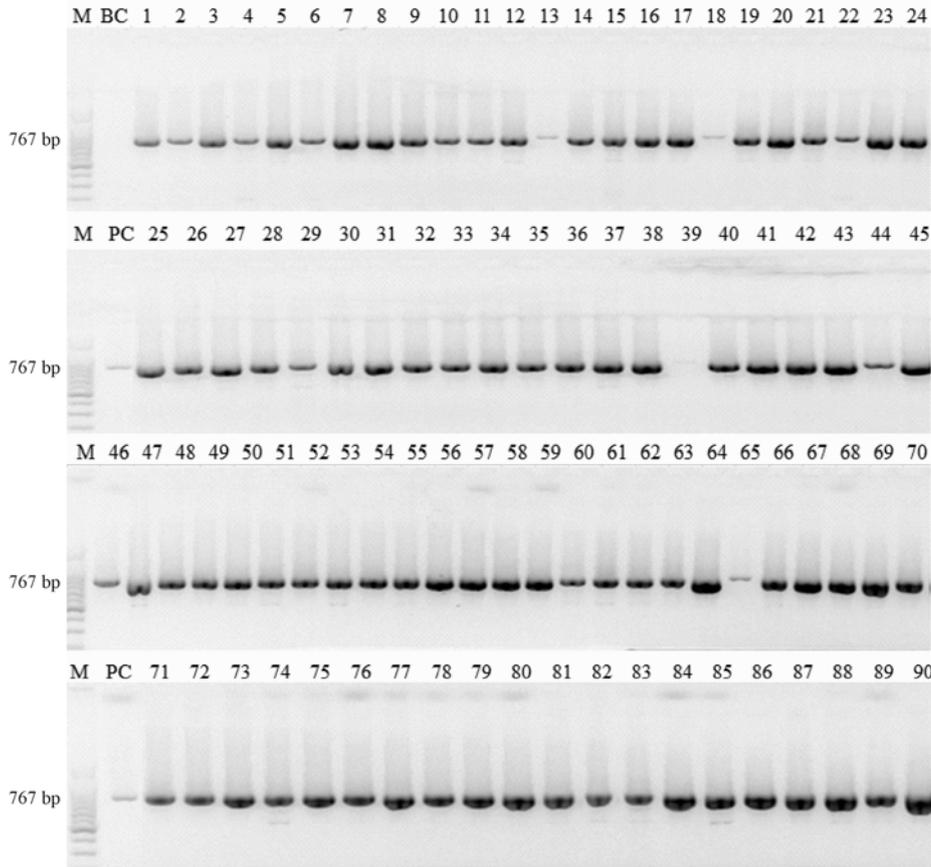
### 3 讨论

本研究建立了 PCR 用粪便样本检测实验猴幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的方法,并证实我国人工繁育的恒河猴和食蟹猴中普遍存在这两种螺杆菌感染。

恒河猴和食蟹猴中自然感染幽门螺杆菌后,通常都不会表现出明显的临床症状。内窥镜检常见胃黏膜红斑、表层粘膜增生及单核细胞浸润等炎症反应,但未见萎缩性胃炎或胃癌的发生<sup>[2,12]</sup>。1988 年, Baskerville 等在 11 只恒河猴中以组织学检查和胃黏膜微生物分离培养法确认其中有 6 只被幽门螺杆菌感染,感染率为 54.5%<sup>[7]</sup>; 1990 年, Arther 等以上述相同的方法在 34 只恒河猴中检测到 12 只被幽门螺杆菌自然感染,感染率为 35.5%<sup>[2]</sup>; 1995 年, Dubios 等用 ELISA 法检测血清中抗幽门螺杆菌 IgG 水平,在 196 只不同年龄段和饲养方式(包括野生)的恒河猴中,发现在 1 岁恒河猴的幽门螺杆菌感染率已达到 50% 以上, 2~6 岁时感染率为 80% 左右,在 7~10 岁时感染率最高,可达到 90% 左右<sup>[16]</sup>;

1997 年, Laurence 等用 PCR 检测了 23 只 1~3 岁中国来源恒河猴的胃部活检组织样本,其中有 21 只幽门螺杆菌阳性,感染率为 91.3%; 而同时用培养的方法检出率仅 52%<sup>[5]</sup>。这些结果表明,血清学或 PCR 方法检测幽门螺杆菌的敏感性远高于组织学检查或微生物培养。本文用 16S rRNA 特异性引物对 45 只恒河猴粪便样本的筛查表明,在 2~4 岁的恒河猴群中,幽门螺杆菌感染率为 100%。此结果说明 PCR 检测粪便样本幽门螺杆菌在实验动物健康监测应用的可行性,并证明我国恒河猴群体中幽门螺杆菌感染的普遍性。

目前,对食蟹猴感染幽门螺杆菌的研究很少<sup>[12]</sup>。由于恒河猴资源有限,而食蟹猴的人工养殖更普遍,生物医药研究中应用更广泛。早期用内窥镜检、胃黏膜样本组织学检查和微生物培养法进行的调查研究认为食蟹猴既不会自然感染幽门螺杆菌,也对人工感染的人源和恒河猴源的幽门螺杆菌不敏感<sup>[2,6]</sup>。相反, Takahashi 等在 1993 年成功地用幽门螺杆菌人工感染了食蟹猴<sup>[10,11]</sup>。Reindel 等 1999 年也报道了与上述相同方法进行的调查,发现

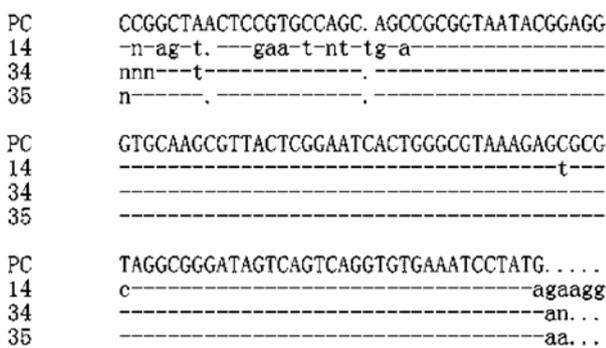


M; 100 bp marker ladder; BC; 不含核酸模板的空白对照组;  
PC: 阳性质粒对照 pc12; 泳道 1~90: 90 份食蟹猴粪便提取 DNA 样本

图 2 食蟹猴 90 份样本的螺杆菌检测结果

M, 100 bp marker ladder; BC, Blank control without nucleic acid template;  
PC, positive control with plasmid pc12; Lane 1-90, 90 DNA samples from feces of cynomolgus monkeys.

Fig. 2 PCR results of the HSP767 primers for Helicobacter in 90 cynomolgus monkeys.



——: 完全一致序列; ....: 空缺序列

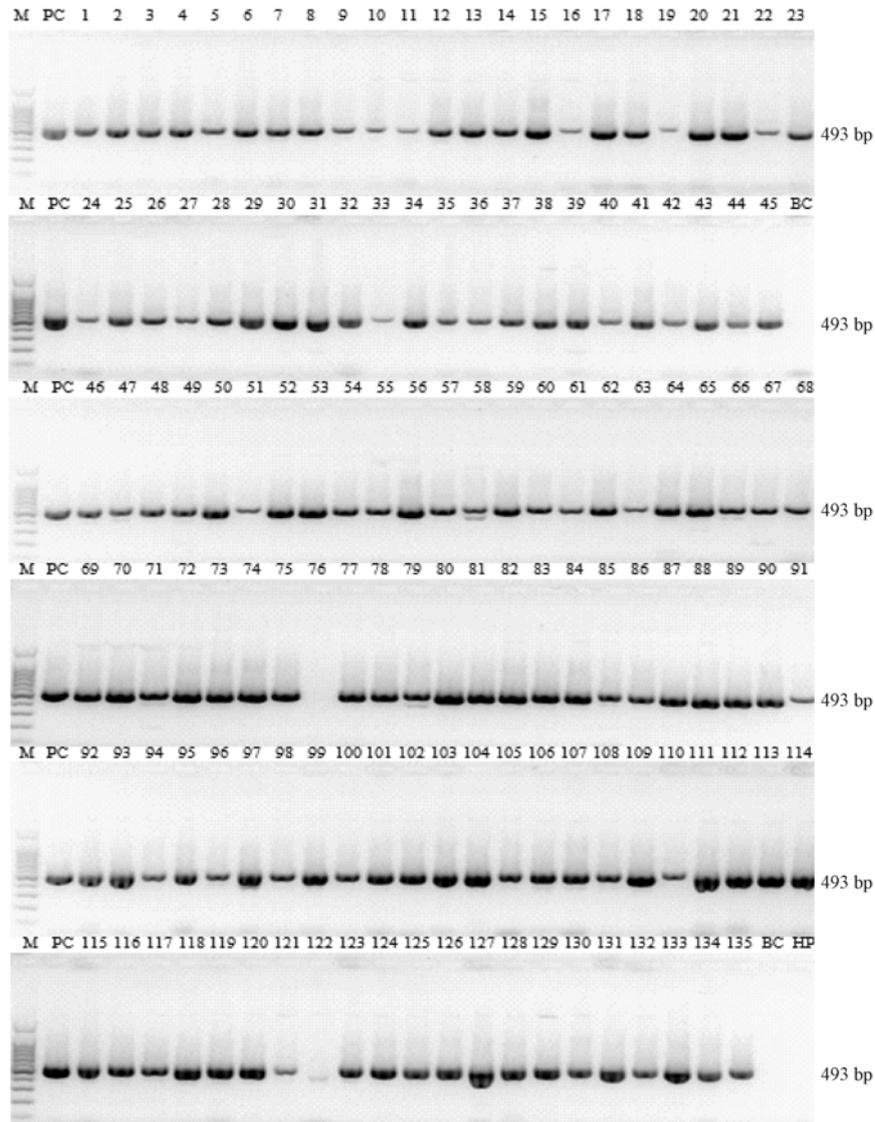
图 3 恒河猴 3 个样本 HP-P1 产物测序结果比对  
“——”: The identical sequence; “....”: Absence of sequence.

Fig. 3 The alignment results of 3 amplicons of  
HP-P1F/ HP-P1R in rhesus macaques

食蟹猴可以自然感染幽门螺杆菌, 在 63 只 2~4 岁的食蟹猴中, 幽门螺杆菌阳性感染率达 69.8%, 病

理研究也确认感染造成组织炎症改变<sup>[12]</sup>。目前, 尚未见有用 PCR 方法对食蟹猴中幽门螺杆菌感染情况的调查。本文首次用 16S rRNA 特异性引物对 90 只雌雄各半的 4 岁食蟹猴的粪便样本进行调查研究, 结果表明幽门螺杆菌感染率为 100%, 比以往国外报道的感染率都高, 与本文中恒河猴群中感染率相同, 而传统的分离培养或血清学方法检测幽门螺杆菌有低敏感性的局限。

Fox 等在 2007 年从一例患有腺癌的恒河猴回肠内容物中分离出一种螺杆菌新种并命名为“猕猴螺杆菌”。此后, 该研究团队对饲养在一起的 26 只患有回结肠炎恒河猴的回肠内容物进行分离培养, 其中有 21 只恒河猴为螺杆菌阳性; 同时对 35 只没有回结肠炎的恒河猴检测发现也有 20 只为螺杆菌阳性<sup>[13,14]</sup>。但是作者仅选择其中少数样本进行 16S rRNA 分析, 因此无法得知该群体中“猕猴螺杆菌”



M: 100 bp marker ladder; BC: 不含核酸模板的空白对照组; PC: 质粒阳性对照 pc20; HP: *H. pylori* 对照; 泳道 1~45: 45 份恒河猴粪便提取 DNA 样本; 泳道 46~135: 90 份食蟹猴提取 DNA 样本

图 4 恒河猴和食蟹猴样本中“猕猴螺杆菌”PCR 产物电泳结果

M, 100 bp marker ladder; BC, blank control without nucleic acid template; PC, positive control with pc20; HP, *H. pylori* DNA; Lane 1-45, 45 DNA samples from feces of rhesus macaques; Lane 46-135, 90 DNA samples from feces of cynomolgus monkeys

Fig. 4 PCR results of the *Helicobacter macacae* in rhesus and cynomolgus monkeys.

感染的实际数量。至今尚未见有关食蟹猴中“猕猴螺杆菌”感染的相关研究报道。文献中猕猴螺杆菌是通过活组织培养,此培养方法有损动物健康;通过粪便培养分离猕猴螺杆菌难度太大,由于粪便中菌群复杂,且猕猴螺杆菌生长环境、形态特征普遍,进一步分纯进行微生物培养鉴定难度大。因此我们针对“猕猴螺杆菌”的 7 个细菌株的 16S rRNA 序列进行比对分析后,设计了特异性引物。实验表明

该引物灵敏度高,且特异性好,与包括幽门螺杆菌在内的数种常见肠道菌无交叉。我们用该引物进行的调查结果表明,在 45 只 2~4 岁的恒河猴中“猕猴螺杆菌”的感染率为 100%;在 90 只食蟹猴中有 88 只为“猕猴螺杆菌”阳性,感染率达 97.8%,证明了我们建立的检测该菌的 PCR 方法的可行性和实验猴感染“猕猴螺杆菌”的普遍性。

在本研究中,有 1 份食蟹猴样本的螺杆菌属特



—: 完全一致序列; ···: 空缺序列

图 5 恒河猴 3 份样本 H. M8 扩增产物测序结果比对

—: The Identical sequence; ···: Absence of sequence.

Fig. 5 The alignment result of the amplicon of H. M8 primers with 3 rhesus macaque samples.

异性引物 PCR 检测结果为阴性,但幽门螺杆菌特异性引物 qPCR 检测结果为阳性。由于 qPCR 比常规 PCR 灵敏度高 20 倍以上,因此该例结果的不符合可能是不同方法的敏感性的差异所致。需进一步建立螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的 qPCR 检测方法可提高检测敏感性。

目前的研究表明,只有家猫和非人灵长类是幽门螺杆菌的自然感染动物宿主<sup>[5]</sup>。非人灵长类与人亲缘关系非常紧密,幽门螺杆菌在非人灵长类中也分布于胃黏膜中,会引发不同程度的持续性胃炎,以及幽门螺杆菌在猴群中广泛存在自然感染的情况,使得非人灵长类成为研究幽门螺杆菌感染人体后的致病机理、药物筛选和疫苗开发的最佳实验动物<sup>[5, 16]</sup>。另一方面,由于幽门螺杆菌感染人群后,会造成胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡甚至胃癌,在实验猴群中广泛存在的幽门螺杆菌污染,可能会对饲养人员和实验人员的身体健康造成威胁,因此应及时发现并清除实验猴中自然感染的幽门螺杆菌<sup>[3]</sup>。而实验猴感染幽门螺杆菌造成的胃炎以及“猕猴螺杆菌”造成的回结肠炎,可能会对使用这些动物进行的药理学或药物毒理学实验造成干扰<sup>[14]</sup>。虽然目前国内外尚未有对实验猴中的幽门螺杆菌感染的监测要求,但有必要建立不携带幽门螺杆菌的 SPF 级实验猴应用于消化道药物临床前研究。

总之,本研究针对螺杆菌属、幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的 16S rRNA 特异性区域建立的 PCR 方

法,检测实验猴粪便样本中这些细菌具有特异、敏感和可行的优势,通过对人工繁育的恒河猴和食蟹猴的螺杆菌感染状况初步调查,表明实验恒河猴和食蟹猴都存在幽门螺杆菌和“猕猴螺杆菌”的复合感染。

参考文献:

[ 1 ] 华杰松, 郑鹏远, 张振华, 等. 螺杆菌属细菌的分类和鉴定 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 1999, 8(2): 83 - 88.  
 [ 2 ] Euler AR, Zurenko GE, Moe JB, et al. Evaluation of two monkey species (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(10): 2285 - 2290.  
 [ 3 ] Duš I, Dobosz T, Manzin A, et al. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research—new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2013, 67: 261 - 268.  
 [ 4 ] Roussel Y, Harris A, Lee MH, et al. Novel methods of quantitative real-time PCR data analysis in a murine *Helicobacter pylori* vaccine model [J]. Vaccine, 2007, 25: 2919 - 2929.  
 [ 5 ] Handt LK, Fox JG, Yan LL, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(1): 165 - 168.  
 [ 6 ] Newell DG, Hudson MJ, Baskerville A. Naturally occurring gastritis associated with *Campylobacter pylori* infection in the rhesus monkey [J]. Lancet, 1987, 2: 1338.  
 [ 7 ] Newell DG, Hudson MJ, Baskerville A. Isolation of a gastric campylobacter-like organism from the stomach of four rhesus monkeys, and identification as *Campylobacter pylori* [J]. J Med Microbiol, 1988, 27(1): 41 - 44.

- [ 8 ] Bronsdon MA, Schoenknecht FD. *Campylobacter pylori* isolated from the stomach of the monkey, *Macaca nemestrina* [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(9): 1725 - 1728.
- [ 9 ] Reed, KD, and Berridge BR. Campylobacter-like organisms in the gastric mucosa of Rhesus monkeys [J]. Lab Anim Sci, 1988, 38: 329 - 331.
- [ 10 ] Takahashi S, Igarashi H, Ishiyama N, et al. Serial change of gastric mucosa after challenging with *Helicobacter pylori* in the cynomolgus monkey [J]. Zentralbl Bakteriell, 1993, 280: 51 - 57.
- [ 11 ] Masubuchi N, Takahashi S, Nakano M, et al. Experimental infection of the cynomolgus monkey with *Helicobacter pylori* [J]. Nippon Rinsho, 1993, 51: 3127 - 3131.
- [ 12 ] Reindel JF, Fitzgerald AL, Breider MA, et al. An epizootic of lymphoplasmacytic gastritis attributed to *Helicobacter pylori* infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Vet Pathol, 1999, 36(1): 1 - 13.
- [ 13 ] Fox JG, Boutin SR, Handt LK, et al. Isolation and characterization of a novel *helicobacter* species, "*Helicobacter macacae*," from rhesus monkeys with and without chronic idiopathic colitis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 4061 - 4063.
- [ 14 ] Marini RP, Muthupalani S, Shen Z, et al. Persistent infection of rhesus monkeys with '*Helicobacter macacae*' and its isolation from an animal with intestinal adenocarcinoma [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(8): 961 - 969.
- [ 15 ] Fatemeh Soghra Abdi, Shahram Jamshidi, Farhad Moosakhani, et al. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the colonic biopsies of stray dogs: molecular and histopathological investigations [J]. Diagn Pathol, 2014, 9: 50.
- [ 16 ] Dubois A, Fiala N, Weichbrod RH, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* gastric infection in nonhuman primates housed in social environments [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(6): 1492 - 1495.

[ 修回日期 ] 2016 - 05 - 09

(上接第 35 页)

## 参考文献:

- [ 1 ] Abad C, Waschek JA. Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(10): 1025 - 1035.
- [ 2 ] Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation [J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(2): 249 - 290.
- [ 3 ] Domingues HS, Mues M, Lassmann H, et al. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e15531.
- [ 4 ] Kang ZZ, Altuntas CZ, Gulen MF, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunity, 2010, 32(3): 414 - 425.
- [ 5 ] Geremia A, Jewell DP. The IL-23 /IL-17 pathway in inflammatory bowel diseases [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 6(2): 223 - 237.
- [ 6 ] Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery [J]. Pharmacol Rev, 2009, 61(3): 283 - 357.
- [ 7 ] Delgado M, Robledo D, Rueda B, et al. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4): 1010 - 1019.
- [ 8 ] Waschek JA. VIP and PACAP: neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair [J]. Br J Pharmacol, 2013, 169(3): 512 - 523.
- [ 9 ] Jimeno R, Gomariz RP, Garín M, et al. The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP [J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(4): 457 - 467.
- [ 10 ] Jimeno R, Leceta J, Garín M, et al. Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect [J]. Leukoc Biol, 2015, 98(2): 257 - 269.
- [ 11 ] Patel DD, Kuchroo VK. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions [J]. Immunity, 2015, 43(6): 1040 - 1051.
- [ 12 ] Sharma J, Balakrishnan L, Datta KK, et al. A knowledge base resource for interleukin-17 family mediated signaling [J]. J Cell Commun Signal, 2015, 9(3): 291 - 296.
- [ 13 ] Krstic J, Obradovic H, Kukulj T, et al. An overview of interleukin-17A and interleukin-17 receptor A structure, interaction and signaling [J]. Protein Pept Lett, 2015, 22(7): 570 - 578.
- [ 14 ] Waisman A1, Hauptmann J, Regen T. The role of IL-17 in CNS diseases [J]. Acta Neuropathol, 2015, 129(5): 625 - 637.
- [ 15 ] Yang JF, Tao HQ, Liu YM, et al. Characterization of the interaction between astrocytes and encephalitogenic lymphocytes during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice [J]. Clin Exp Immunol, 2012, 170(3): 254 - 265.
- [ 16 ] Kang ZZ, Altuntas CZ, Gulen MF, et al. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunity, 2010, 32(3): 414 - 425.
- [ 17 ] Kang ZZ, Wang CH, Zepp J, et al. Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2 + glial cells [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(10): 1401 - 1408.
- [ 18 ] Yan YP, Ding XL, Li K, et al. CNS-specific therapy for ongoing EAE by silencing IL-17 pathway in astrocytes [J]. Mol Ther, 2012, 20(7): 1338 - 1348.

[ 修回日期 ] 2016 - 05 - 06