

幽门螺杆菌感染小鼠慢性胃炎模型的建立及评价

连大卫,扶丽君,许艺飞,任文康,操红缨,黄萍*

(广州中医药大学中药学院,广州 510405)

【摘要】 目的 建立幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染动物模型,评价*H. pylori*相关慢性胃炎胃黏膜病理变化。**方法** 灌胃*H. pylori* SS1 菌株建立在体感染,感染后第2周后采用快速尿素酶法和PCR法检测感染成功率;确认感染成功后再分别继续饲养至6周和12周,建立*H. pylori*相关慢性胃炎动物模型。实验结束后,取胃腺体组织别进行HE和硼酸美兰染色,分析胃炎程度及*H. pylori*感染程度;生化法检测胃组织中髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),丙二醛(malondialdehyde, MDA)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的含量变化;RT-qPCR法检测胃组织中*COX-2*、*iNOS*、*TNF- α* 和*IL-1 β* 基因表达的变化。**结果** 与正常组相比,模型6周和12周组胃组织内可见*H. pylori*定植,并且黏膜层有不同程度的慢性炎性细胞浸润,腺体萎缩和肠化生情况;同时组织中CAT和SOD的含量明显下降,MPO和MDA的水平和*COX-2*、*iNOS*、*TNF- α* 和*IL-1 β* 基因表达均有显著上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论通过灌胃给菌的方法可以成功将*H. pylori*定植于小鼠体内,并在定植的6周和12周后均可引起慢性炎性细胞的浸润,并使增强胃腺体组织内氧化应激水平和促炎基因的表达,但12周模型感染程度更深,出现腺体萎缩和肠化生的情况。

【关键词】 幽门螺杆菌;慢性胃炎;小鼠模型;氧化应激;促炎因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0006-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 07. 002

Establishment and evaluation of a mouse model of chronic gastritis induced by *Helicobacter pylori*

LIAN Da-wei, FU Li-jun, XU Yi-fei, REN Wen-kang, CAO Hong-ying, HUANG Ping*

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of *H. pylori* infection, and to evaluate the chronic pathological changes in the gastric mucosa associated with *H. pylori* infection. **Methods** 34 male 5 ~ 6-week old SPF C57BL/6 mice were used in this study. The mice were intragastrically administrated with a suspension of *H. pylori* SS1 strain. Two weeks after infection, rapid urease test and PCR were performed to confirm the *H. pylori* infection. Successfully infected mice were randomly divided into 3 groups including the control group, 6-week and 12-week infected groups. Samples of gastric mucosa were taken for pathological analysis using HE and borax methylene blue staining. The contents of myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and catalase (CAT) in the gastric tissues were detected by biochemistry, and the expression levels of *COX-2*, *iNOS*, *TNF- α* and *IL-1 β* were examined by RT-qPCR. **Results** Compared with the control group, *H. pylori* colonization was observed in the gastric mucosa of the 6-week and 12-week

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(编号:81374043);广东省科技计划资助项目(编号:2016A020217019);广州市科技计划资助项目(编号:201607010336);广东省省级科技计划项目(编号:2013A022100001)。

【作者简介】 连大卫(1988-),男,博士研究生,专业:中药复方药理。E-mail:675836257@qq.com

【通讯作者】 黄萍(1960-),女,教授,研究方向:中药新药与保健品开发。E-mail:hping331@126.com

infected mice, with chronic inflammatory cell infiltration, glandular atrophy and intestinal metaplasia to varying extents. The contents of CAT and SOD were significantly decreased, while the levels of MPO and malonaldehyde MDA, and the expression levels of *COX-2*, *iNOS*, *TNF- α* and *IL-1 β* were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Intragastric administration with *H. pylori* in C57BL/6 mice can be successfully used to generate the bacterial colonization, leading to chronic inflammatory cell infiltration, enhanced oxidative stress, and up-regulated expression of proinflammatory genes in the gastric glandular tissues at 6 and 12 weeks after inoculation. However, the inflammatory changes are more extensive in the mice at 12 weeks after infection, with glandular atrophy and intestinal metaplasia.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Chronic gastritis; Mouse model; Oxidative stress; Proinflammatory factors

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种常见的人体感染细菌,属于弯曲杆菌微需氧的革兰阴性菌,全球有一半以上的人口感染^[1],我国 *H. pylori* 的感染率在 60% 左右^[2]。近年国内外对 *H. pylori* 是慢性胃炎、消化性溃疡和胃腺癌发生的主要诱导因素达成共识,并已被世界卫生组织列为 I 类致癌因子^[3,4]。因此建立 *H. pylori* 感染的慢性胃炎动物模型对于探讨其致病机理、评估药物疗效和验证治疗方案等研究具有重要意义。*H. pylori* 感染小鼠模型在近些年的研究中最为广泛^[5,6],本研究旨在通过建立不同的感染时间对模型动物体内胃炎的发展进行比较评分,并分析其胃组织内氧化应激水平与促炎因子的表达,探讨不同感染时间形成的胃炎程度与其病理机制,为优化模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和细菌

C57BL/6 小鼠,34 只,SPF 级雄性,5 ~ 6 周龄,体重 17 ~ 18 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,动物运输前抽取部分小鼠进行胃部 PCR 检测,确认小鼠未感染鼠源性幽门螺杆菌。实验动物饲养于广州中医药大学(大学城)实验动物中心【SYXK(粤)2013-0085】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。*H. pylori* (SS1) 由澳大利亚莫纳什大学 Richard Ferrero 教授馈赠。

1.2 仪器和试剂

Campylobacter agar base(Oxoid,批号 1589242); Brain-heart unfusion(Oxoid,批号 1677862); 革兰氏染色液试剂盒(海博生物,批号 HB8278); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物,批号 DP302-2); Super Real Pre Mix $\times$ Plus(天根生物,批号 03120); FastQuant RT Kit(天根生物,批号 03326); Trizol Reagent(Thermo Life Technology,批号 28218); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,批号 P0010S); 超氧

化物歧化酶检测试剂盒(南京建成,批号 20160306); 髓过氧化物酶检测试剂盒(南京建成,批号 20160302); 丙二醛检测试剂盒(南京建成,批号 20160304); 过氧化氢酶检测试剂盒(南京建成,批号 20160309); 麦氏比浊仪(珠海贝索生物技术有限公司); NU-5831E 三气培养箱(Nuaire); HVE-50 高温灭菌锅(Hirayama); 生物安全柜(ESCO); 倒置显微镜(Olympus); BioSpec-nano 核酸分析仪(岛京); CFX 96(Bio-Rad); 低温高速离心机(Eppendorf)。

1.3 实验方法

1.3.1 细菌培养与鉴定

(1) 幽门螺杆菌的复苏和传代

将冻存的 *H. pylori* 菌株从超低温冰箱(-80℃)取出,复苏于弯曲杆菌琼脂培养基为基础,含 7% 脱纤维新鲜羊血及联合抗生素(万古霉素 10 mg/L,甲氧苄氨嘧啶 5 mg/L、头孢磺啶 5 mg/L、两性霉素 5 mg/L)的平板上。倒置平板置于 37℃,5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ 的培养箱中复苏 48 ~ 72 h。待细菌长满平板后,使用一次性无菌棉签刮取并重悬于的 PBS 中接种于新的培养基上,再生长 48 ~ 72 h。

(2) 幽门螺杆菌菌株的鉴定

使用一次性接种环取部分细菌,在载玻片上涂布均匀,酒精灯烤干片。使用革兰染色试剂盒染色细菌,在显微镜下使用油镜观察细菌形态。同时取少量菌液置于快速脲素酶试剂里,1 min 后观察试剂颜色变化。

1.3.2 造模方法及感染检测

(1) 动物分组

C57BL/6 小鼠,34 只雄性,随机分为空白对照组 10 只及感染组 24 只。感染组经口服 *H. pylori* 确认感染成功后,再随机分为模型 6 周对照组、模型 12 周对照组,每组 8 只。

(2) 幽门螺杆菌感染方法

将经过鉴定传至第二代的 *H. pylori* (SS1) 菌

株,加入 10% FBS 的 BHI 培养液中调节成麦氏浓度为 0.1 的菌液,放入 37℃ 微需氧环境下 (5% O₂、10% CO₂ 和 85% N₂,湿度 95%),120 rpm 摇床上震荡培养 16 ~ 18 h,使得 *H. pylori* 生长至对数生长期。取出菌液,0.25 mL 只灌胃感染组小鼠,共灌胃 3 次,隔天一次,每次灌胃幽门螺杆菌前禁食 12 h,灌胃完成后 2 h 后进食。感染组小鼠于给予 2% 的盐水直至开始给药,以增强细菌感染力。

(3)幽门螺杆菌感染检测方法

灌胃感染结束后一周,随机取 8 只感染组小鼠及 2 只空白对照组小鼠做感染检测,以确定 *H. pylori* 在动物体内感染定植。检测前小鼠禁食 24 h,小鼠处死后,使用灭菌的手术器械,取出胃组织,沿胃大弯剪开胃部,使用无菌的 PBS 冲洗胃部残渣。取胃腺部随机分为 2 份,一份剪下后置于快速尿素酶试剂内;一份液氮急冻用于 PCR 检测。置于快速尿素酶试剂内胃腺部组织在 37℃ 烘箱内孵育 6 h,颜色变为红色表明感染成功。取另一份胃腺体组织,依据细菌 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA。使用引物 16s,扩增条件为 94℃ 预变性 2 min,94℃ 解链 2 s,53℃ 退火 2 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环。配置 1.5% 琼脂糖凝胶,100 V,35 min,5 μL 上样量,对 PCR 扩增产物电泳检测。扩增产物目的长度为 375 bp。引物设计结果见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers

基因名称	引物序列	
Gene names	Primer sequences	
16s	Forward	5'-TATGACGGGTATCCGGC-3'
	Reverse	5'-ATTCCAATTACCTCTCCCA-3'
GAPDH	Forward	5'-AGGTTGTCTCTCGCACTTCA-3'
	Reverse	5'-CCAGGAAATGAGCTTGACAAAG-3'
iNOS	Forward	5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3'
	Reverse	5'-CGTTTCGGGATCTGAATGTGA-3'
COX-2	Forward	5'-CAGGAAGTCTTTGTCTGTGCC-3'
	Reverse	5'-GCTGGTTTGAATAGTTGCTCATCA-3'
TNF-α	Forward	5'-GCACCACCATCAAGGACTCA-3'
	Reverse	5'-TCGAGGCTCCAGTGAATTCG-3'
IL-1β	Forward	5'-ACACTCCTTAGTCCTCGGCCA-3'
	Reverse	5'-TGGTTTCTGTGACCTGAGC-3'

1.3.3 病理学检测

饲养结束后,脱颈椎处死动物,采用无菌无酶处理后的手术器械剖腹取胃,沿胃大弯剪开,用生

理盐水洗去胃内容物,沿胃小弯剪取从胃窦到胃体组织,分为 3 份,两份置于 4% 多聚甲醛中固定,分别做 HE 染色观察胃炎程度和硼砂美兰染色观察幽门螺杆菌感染状况并参考文献评分^[7];另一份液氮中速冻,后移至 -70℃ 冰箱保存备用。

1.3.4 组织内氧化应激相关指标的测定

取出冻存组织,匀浆后再 4℃,12000 g 离心 5 min 取上清液,分别参照 MPO、SOD、MDA 和 CAT 检测试剂盒方法进行检测。

1.3.5 组织内促炎因子基因表达水平的测定

胃组织中总 RNA 提取及 cDNA 合成:参照 TRIzol 说明书方法提取胃组织的总 RNA,在超紫外分光光度仪上测 D(λ)260 nm/280 nm 比值达到 1.8 ~ 2.0 后,按逆转入试剂盒操作方法得到 cDNA。引物设计结果见表 1。实时荧光定量 RT-qPCR 扩增程序用荧光定量检测试剂盒,在 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪上扩增。扩增条件:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 延伸 60 s,40 个循环。分析结果,得出各组内参基因和目的基因 Ct 值,运用 2^{-ΔΔCt} 公式计算。

1.4 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计软件,数据均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差检验和最小显著性差异法 (LSD);组织切片评分,采用检验 Mann-Whitney 检验,以 $P < 0.05$; $P < 0.01$ 作为差异有显著性。

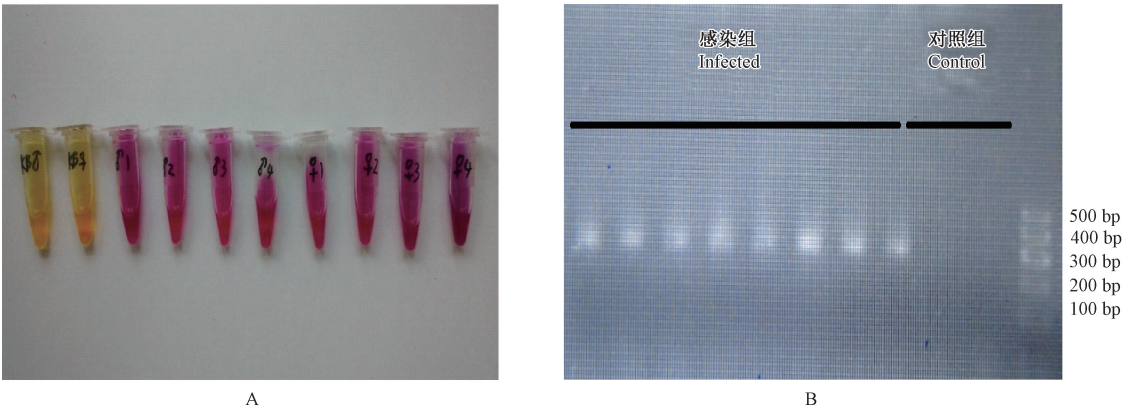
2 实验结果

2.1 幽门螺杆菌感染检测结果

感染组动物胃腺体组织快速尿素酶试剂检测为红色,同时其 PCR 扩增可以得到长度为 375 bp 的 16s 产物。综上结果显示幽门螺杆菌成功在体感染,见图 1。

2.2 幽门螺杆菌感染模型病理切片结果

相比正常组,模型组 6 周的胃粘膜层显示出单核细胞密集和浸润的慢性胃炎病理学变化,同时可见 *H. pylori* 感染,属于 *H. pylori* 相关慢性胃炎的阶段;模型组 12 周的胃粘膜层不仅表现出慢性炎症和 *H. pylori* 感染,而且出现了胃固有腺体减少,被炎性细胞取代,纤维组织增加的情况,属于 *H. pylori* 相关萎缩性胃炎;模型组 6 周和 12 周的胃黏膜层均少见中性粒细胞浸润,见图 2、表 2 ~ 6。



注:A:快速尿素酶法检测 *H. pylori* 感染(左侧 2 管为空白对照组,RUT 为阴性,显黄色;右侧 8 管为感染组,RUT 为阳性,显红色);B:PCR 检测 *H. pylori* 感染。

图 1 幽门螺杆菌鉴定结果

Note. A: Rapid urease test of *H. pylori* infection. Left two tubes: yellow, control group, represent negative reaction. Right 8 tubes: red, infected group, RUT-positive. B: PCR identification of *H. pylori* infection.

Fig. 1 Identification of *H. pylori*

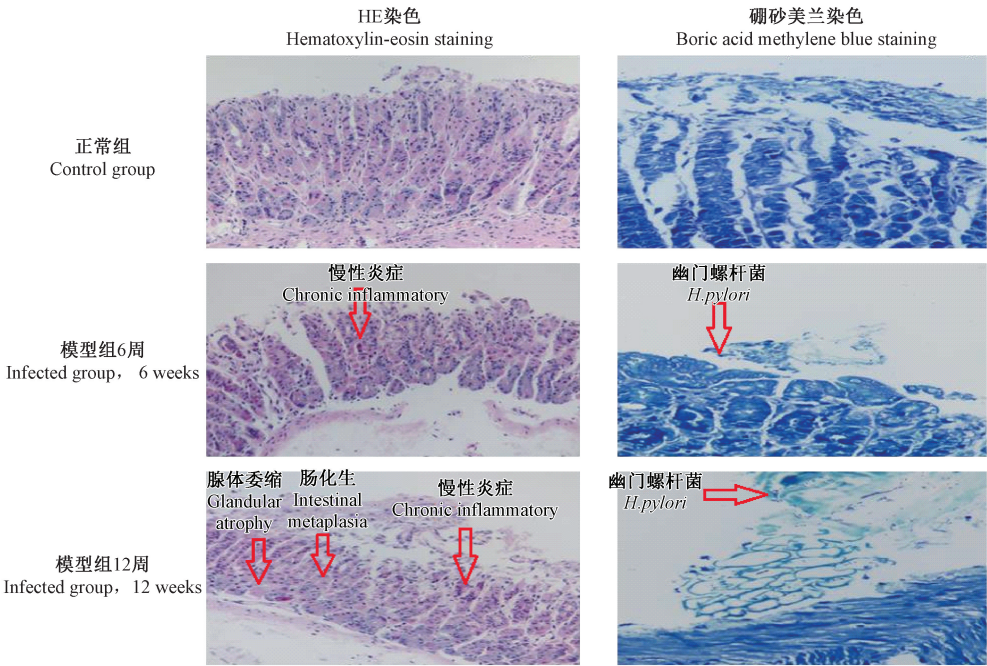


图 2 HE 染色组织切片及硼砂美兰染色组织切片(× 200)

Fig.2 Histology of the gastric mucosa of the mice (HE and borax-methylene blue staining)

表 2 *H. pylori* 感染小鼠胃组织切片慢性炎症程度

Tab.2 Degrees of chronic inflammation in the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice

	例数(n)	慢性胃炎程度 Degrees of chronic inflammation				P
		0	1	2	3	
正常组 Control group	8	7	1	0	0	
模型组(6 周) Infected group, 6 weeks	8	1	7	0	0	< 0. 01
模型组(12 周) Infected group, 12 weeks	8	1	6	1	0	< 0. 01

注:分数:无,0;轻度,1;中度,2;重度,3。
Note. Scores: normal, 0; mild, 1; moderate, 2; severe, 3.

表 3 *H. pylori* 感染小鼠胃组织切片活动性炎症程度

Tab.3 Degrees of active inflammation in the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice

	例数 (<i>n</i>)	活动性炎症程度 Degrees of active inflammation				<i>P</i>
		0	1	2	3	
正常组 Control group	8	8	0	0	0	> 0.05
模型组(6 周) Infected group, 6 weeks	8	7	1	0	0	
模型组(12 周) Infected group, 12 weeks	8	6	2	0	0	

注:分数:无,0;轻度,1;中度,2;重度,3。
Note. Scores: normal, 0; mild, 1; moderate, 2; severe, 3.

表 4 *H. pylori* 感染小鼠胃组织切片萎缩程度

Tab.4 Degrees of glandular atrophy in the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice

	例数 (<i>n</i>)	萎缩程度 Degrees of atrophy				<i>P</i>
		0	1	2	3	
正常组 Control group	8	7	0	0	0	> 0.05
模型组(6 周) Infected group, 6 weeks	8	7	1	0	0	
模型组(12 周) Infected group, 12 weeks	8	3	5	0	0	

注:分数:无,0;轻度,1;中度,2;重度,3。
Note. Scores: normal, 0; mild, 1; moderate, 2; severe, 3.

表 5 *H. pylori* 感染小鼠胃组织切片肠化生程度

Tab.5 Degrees of intestinal metaplasia in the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice

	例数 (<i>n</i>)	肠化生程度 Degrees of intestinal metaplasia				<i>P</i>
		0	1	2	3	
正常组 Control group	8	8	0	0	0	> 0.05
模型组(6 周) Infected group, 6 weeks	8	6	2	0	0	
模型组(12 周) Infected group, 12 weeks	8	2	5	1	0	

注:分数:无,0;轻度,1;中度,2;重度,3。
Note. Scores: normal, 0; mild, 1; moderate, 2; severe, 3.

表 6 *H. pylori* 感染小鼠胃组织切片细菌定植程度

Tab.6 Degrees of bacterial colonization in the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice

	例数 (<i>n</i>)	<i>H. pylori</i> 定植程度 Degrees of <i>H. pylori</i> colonization				<i>P</i>
		0	1	2	3	
正常组 Control group	8	8	0	0	0	< 0.01
模型组(6 周) Infected group, 6 weeks	8	1	7	0	0	
模型组(12 周) Infected group, 12 weeks	8	1	6	1	0	

注:分数:无,0;轻度,1;中度,2;重度,3。
Note. Scores: normal, 0; mild, 1; moderate, 2; severe, 3.

2.3 幽门螺杆菌感染模型胃组织中氧化应激相关指标表达结果

与正常组相比,模型组小鼠胃组织中 CAT 和

SOD 含量均有不同程度的下降;MPO 和 MDA 含量均有显著上升,其中模型 12 周增加程度高于模型 6 周,见表 7。

表 7 *H. pylori* 感染小鼠胃组织中氧化应激指标的表达式 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.7 Levels of oxidative stress indicators in the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice

	CAT U/mg prot	SOD U/mg prot	MDA U/mg prot	MPO U/mg prot
正常组 Control group	19.78 ± 3.82	5.12 ± 0.88	0.084 ± 0.022	0.034 ± 0.013
模型组(6 周) Infected group, 6 weeks	11.32 ± 4.12 ^{ΔΔ}	4.89 ± 0.79	0.122 ± 0.018 ^{ΔΔ}	0.058 ± 0.017 ^{ΔΔ}
模型组(12 周) Infected group, 12 weeks	10.66 ± 3.52 ^{ΔΔ}	4.18 ± 0.57 ^Δ	0.161 ± 0.031 ^{**}	0.080 ± 0.019 ^{**}

注:与正常对照组比较, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01; 与模型 6 周组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。
Note. Compared with the control group, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01; Compared with the model of 6-week infected group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

表 8 *H. pylori* 感染小鼠胃组织中相关促炎因子表达式 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.8 Expression levels of pro-inflammatory factors in the gastric tissues of *H. pylori*-infected mice

	iNOS	COX-2	TNF-α	IL-1β
正常组 Control group	1.02 ± 0.25	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.10	1.04 ± 0.28
模型组(6 周) Infected group, 6 weeks	4.04 ± 1.25 ^{ΔΔ}	3.24 ± 0.92 ^{ΔΔ}	1.45 ± 0.40 ^Δ	4.80 ± 1.28 ^{ΔΔ}
模型组(12 周) Infected group, 12 weeks	12.56 ± 3.36 ^{**}	5.15 ± 1.08 ^{**}	4.49 ± 0.94 ^{**}	9.86 ± 2.18 ^{**}

注:与正常对照组比较, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01; 与模型 6 周组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。
Note. Compared with the control group, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01; Compared with the model of 6-week infected group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

2.4 幽门螺杆菌感染模型胃组织中相关促炎因子表达结果

与正常组相比,模型组小鼠胃组织中 *COX-2*、*iNOS*、*TNF-α*、*IL-1β* 的基因表达均明显上升,其中模型 12 周促炎因子表达高于模型 6 周。见表 8。

3 讨论

H. pylori (Sydney strain 1, SS1) 是 Lee 等人从 C57BL/6 小鼠体内分离而出^[8],具有高致病性的致病岛 (pathogenicity island) 基因,能编码 IV 型分泌系统 (T4SS) 和毒素相关蛋白 A (cytotoxin-associated protein A, CagA),同时空泡毒素 A (vacuolating cytotoxin A, VacA) 表达也呈现阳性,足以致导致宿主细胞在增殖,骨架重排,细胞连接,形态延伸与散射等方面的改变,破坏胃上皮细胞。此外,*H. pylori* 感染还会通过与宿主免疫系统相互作用而激活免疫应答,招募而来的炎性细胞不仅会释放的促炎因子加剧局部炎症程度,而且会累积大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮 (reactive nitrogen species, RNS)^[9,10],原本这些活性物质具有清除外来微生物的作用,但 *H. pylori* 具备逃逸清除的功能,因此氧化应激生成的活性物质不仅无法杀灭细菌,反而破坏了机体自身系统的平衡并造成炎症等多种应激损伤,是导致最终相关胃炎发生的重要因素。

H. pylori 在体感染的难点是需要有在体适应能力强的 *H. pylori* 菌株,本实验使用的菌株由澳大利亚莫纳什大学的 Richard Ferrero 教授馈赠,从 C57BL/6 小鼠在体分离出来之后体外共传 5 代的 *H. pylori* (SS1),细菌灌胃前在液体环境中培养 16 ~ 18 h 使其进入对生长数期,并让动物禁食 4 ~ 12 h,灌胃完成后再禁食 1 ~ 2 h 便于 *H. pylori* 定植。除了细菌因素以外,作为实验感染对象的小鼠也需要严格的质量控制,鼠源性 *H. pylori* 在小鼠种群内的传染性极强,而被鼠源性 *H. pylori* 感染的小鼠不仅难以接种上 SS1 菌株,而且也无法保证实验的统一性,因此在实验前先使用 PCR 技术确定购置的小鼠胃部没有 *H. pylori* 感染也尤为重要。与此同时,造模期间给予 2% 的盐水也能增加 *H. pylori* 的定植成功率^[11]。国内外文献中,虽有应用 C57BL/6 小鼠成功建立 *H. pylori* 相关胃炎模型的报道,但对于其病理机制探讨较少。本次实验不仅证明模型小鼠在感染 6 周后会出现慢性胃炎,感染 12 周后出现萎缩性胃炎;而且其胃组织中 MDA、MPO 的含量和 *COX-2*、*iNOS*、*TNF-α*、*IL-1β* 基因的表达均显著上升,SOD 和 CAT 含量显著下降,并伴随着 *H. pylori* 定植时间的延长而加重;说明模型小鼠胃组织中促炎因子的表达不断增加,氧化-抗氧化平衡体系被打破,局部氧化应激程度持续加剧,最终表现出更严重的炎症损伤,推动 *H. pylori* 感染相关

慢性胃炎的发展。本次实验所采用的动物造模方法成功率高,并探讨了模型的致病机理,为实验的重复以及进一步深入研究提供了基础。

参考文献:

[1] Graham DY. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148 (4):719 – 731.

[2] 范竹萍, 丁佳. 幽门螺杆菌的治疗现状与进展[J]. *世界临床药物*, 2013, 28(12): 724 – 728.

[3] 夏菁, 孙涛. 幽门螺杆菌感染与功能性胃肠疾病的相关性研究[J]. *中国医药导报*, 2011, 8(18):184 – 185.

[4] Cavaleiro-Pinto M, Peleteiro B, Lunet N, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric cardia cancer: systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Causes Control*, 2011, 22(3): 375 – 387.

[5] 宁磊, 王保宁, 赵雅静, 等. 幽门螺杆菌致人胃病的小鼠模型研究[J]. *中国实验动物学报*, 2000, 8(4): 193 – 197.

[6] 王丙信, 姚希贤, 白文元. 经口感染幽门螺杆菌制备大鼠胃炎模型的实验研究[J]. *中国比较医学杂志*, 1995, 5(4):

200 – 203.

[7] Aydin O, Egilmez R, Karabacak T, et al. Interobserver variation in histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(10): 2232 – 2235.

[8] Lee A, O’ Rourke J, De Ungria MC, et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112 (4): 1386 – 1397.

[9] Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(12): 997 – 1003.

[10] Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(6): 385 – 399.

[11] Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, et al. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(19): 4823 – 4828.

[修回日期] 2016 – 11 – 29

· 专家问答 ·

问:大鼠脑脊液抽取方法

答:采集大鼠脑脊液可参考的方法有经皮穿刺延髓池抽取脑脊液法、直视下划破硬脊膜抽取脑脊液法和直视下微量进样器经硬脊膜穿刺抽取脑脊液法。方法一,是在非直视下操作,故要求操作者熟悉大鼠头颈部解剖结构,精确掌握进针点、角度与深度,并根据个体差异调整手法。方法二,简单方便,对操作者技术要求低,但是割破硬脊膜易造成脑脊液流失和少量的血污染,因此采集量以及采集效率会受影响。方法三,效果最佳,成功率可达 100%,且污染率最低。方法要点:麻醉、固定大鼠,剪去背毛,两耳根的连线处剪开一横切口,中点纵向剪开,将皮分离用止血钳拉向两侧。紧贴大鼠颅底用镊子和止血钳逐层钝性分离各层肌肉,暴露出枕骨大孔。手持 100 μL 微量进样器,针尖斜面向上,与水平面呈 20 ~ 30 度角刺入枕骨大孔,进针深度大约 2 ~ 3 mm。刚刺入时会有强烈的突破感,此时即可得到少许脑脊液,待固定针体后,继续缓慢抽取,采集量可达 100 μL。

(感谢中国医学科学院医学实验动物研究所 张丽 的解答)