

闫硕,李雪,王超,等. 质子泵抑制剂泮托拉唑促进幽门螺旋杆菌 SS1 在小鼠胃内的定植 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(2): 24–32.

Yan S, Li X, Wang C, et al. Proton pump inhibitor pantoprazole promotes colonization of *Helicobacter pylori* Sydney strain 1 in the mouse stomach [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(2): 24–32.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.02.003

质子泵抑制剂泮托拉唑促进幽门螺旋杆菌 SS1 在小鼠胃内的定植

闫 硕,李 雪,王 超,徐嘉莉,程 侯,张丽萍,苏 磊*,龚佳男*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,中国医学科学院 & 北京协和医学院人类疾病比较医学国家重点实验室,
国家人类疾病动物模型资源中心,国家动物模型技术创新中心,北京 100021)

【摘要】 目的 寻找提高幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 在小鼠胃部定植效率的方法。明确质子泵抑制剂 (proton pump inhibitor, PPI) 泮托拉唑是否能够作为定植辅助剂促进 Hp 在小鼠胃部定植,为建立 Hp 感染小鼠模型奠定基础。**方法** 建立 Hp 悉尼株 (Sydney strain 1, SS1) 固体平板和液体培养体系并进行鉴定;比较不同剂量泮托拉唑对小鼠胃酸分泌的抑制效果;利用快速脲酶检测实验、细菌平板培养和 TaqMan qPCR 分析单独接种 Hp 或联合泮托拉唑预处理对 Hp 定植效率的影响。**结果** PPI 预处理能够抑制胃酸分泌在一定程度上促进 Hp 在小鼠胃部定植。**结论** PPI 能够作为定植辅助剂提高 Hp 感染小鼠模型的构建效率。

【关键词】 幽门螺旋杆菌;质子泵抑制剂;幽门螺旋杆菌感染;小鼠模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 02-0024-09

Proton pump inhibitor pantoprazole promotes colonization of *Helicobacter pylori* Sydney strain 1 in the mouse stomach

YAN Shuo, LI Xue, WANG Chao, XU Jiali, CHENG Yu, ZHANG Liping, SU Lei*, GONG Jianan*

(National Center of Technology Innovation for Animal Model, National Human Diseases Animal Model Resource Center,
NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, the Institute of Laboratory Animal Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To explore method for improving the colonization efficiency of *Helicobacter pylori* (Hp) in the mouse stomach and to determine if the proton pump inhibitor (PPI) pantoprazole can act as a colonization adjuvant to enhance Hp colonization, with the aim of providing an effective tool for establishing an Hp infection mouse model.

【基金项目】 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2021-RC310-008, 2023-PT180-01);北京市科技新星项目 (Z211100002121034);国家自然科学基金青年项目 (82302985)。

【作者简介】 闫硕 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: yanshuo@cnilas.org

【通信作者】 龚佳男 (1986—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: gongjianan@cnilas.org

苏磊 (1985—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 病原生物学。E-mail: sulei@cnilas.org

* 共同通信作者

Methods The Hp Sydney strain 1(SS1) was introduced and solid plate and liquid culture systems were established. The effects of different doses of pantoprazole on gastric acid secretion in mice were compared. The impact of Hp inoculation, alone or combined with pantoprazole pretreatment, on Hp colonization efficiency was analyzed using rapid urease tests, bacterial plate cultures, and TaqMan quantitative polymerase chain reaction. **Results** PPI pretreatment inhibited gastric acid secretion and promoted Hp colonization in the mouse stomach, to some extent. **Conclusions** PPI can serve as colonization adjuvants to enhance the efficiency of constructing Hp infection mouse models.

【Keywords】 *Helicobacter pylori*; proton pump inhibitor; *Helicobacter pylori* infection; mouse model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是胃癌 I 类致癌病原菌^[1-2]。Hp 分泌尿素酶分解尿素产生氨,中和胃酸从而在细菌周围形成一个相对中性的微环境,其螺旋形结构钻入胃黏膜层,免受胃酸的直接侵蚀从而在酸性胃环境中生存^[3]。大量研究表明 Hp 通过分泌毒力因子、诱导慢性胃部炎症等多种方式导致胃癌发生的风险增加^[4-6]。

动物模型在开展 Hp 基础和转化研究中发挥着重要的作用。自 1996 年有研究报道了 Hp 在蒙古沙鼠中成功定植并且再现了人体中观察到的炎症、溃疡等感染特征后^[7-8],研究人员陆续建立了多种 Hp 感染动物模型,包括小鼠、豚鼠、猪、雪貂、恒河猴等^[9]。这些动物模型在阐述 Hp 致病机制、与宿主和环境等因素互作以及治疗评价等多个方面做出了重要贡献^[10]。尽管大动物的生活环境和生理状态相对更接近人类,但由于动物体型大、成本高、操作困难和个体差异大等因素,在实验室难以广泛应用。与小动物相比,小鼠模型具有遗传操作灵活、实验成本低廉、实验可操作性好、研究背景和免疫系统的一致性高等优点^[10-11]。但是,小鼠不是 Hp 的天然宿主。在自然环境下,Hp 通常不会主动感染小鼠并在其体内长期稳定地生存和繁殖。在实验研究中,为了使小鼠感染 Hp,需要多次人工灌胃等手段促进其定植,但通常效率不高。因此,如何提高 Hp 在小鼠胃组织的定植效率是建立 Hp 感染小鼠模型的关键问题。

质子泵抑制剂 (proton pump inhibitor, PPI) 是一类能够抑制胃酸分泌的药物,其主要作用机制是阻断胃壁细胞表面的 H^+/K^+-ATP 质子泵,导致胃酸的产生持续减少^[12]。临床常用于治疗胃酸反流、胃食管反流病和消化性溃疡等^[13-14]。但

是,胃酸分泌同样也是保护胃免受 Hp 感染的重要因素之一。因此推测 PPI 在抑制胃酸分泌的同时可能会增加 Hp 感染的概率。前期有研究报道使用 PPI 泮托拉唑联合 Hp 灌胃建立 Hp 感染小鼠模型^[15]。泮托拉唑是一种苯并咪唑衍生物,在小鼠中的临床前毒性研究数据显示其急性毒性较低,在短期内的给药不会对小鼠产生严重的毒性影响^[16-17]。但泮托拉唑是否促进 Hp 在小鼠胃内定植尚不清楚。因此本研究的目的是明确泮托拉唑是否能够作为定植辅助剂促进 Hp 在小鼠胃内的定植,从而为建立 Hp 感染小鼠模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄,20~30 g 的健康雌性 C57BL/6J 小鼠 36 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。动物实验均在中国医学科学院医学实验动物研究所 SPF 级环境中完成[SYXK(京)2021-0058]。动物房昼夜 12 h 光暗交替,相对温度、湿度适宜。动物适应环境 1 周后开始实验。实验动物的操作流程经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物福利伦理委员会审批通过(GJN 23003, GJN 24001),严格遵守 3R 原则。

1.1.2 菌株

Hp 悉尼株(Sydney strain 1, SS1)购自宝赛质粒菌株资源公司。

1.2 主要试剂与仪器

哥伦比亚血琼脂基础培养基(索莱宝, LA3540);布氏肉汤(海博生物, HB0241);胎牛血清(凯基生物, KGL3002-500);无菌脱纤维绵羊血(索莱宝, TX0030);微需氧产气袋(日本三菱, C-

2);快速脲酶检测试剂盒(福建三强,20240404);革兰氏染色试剂盒(索莱宝,G1040);溶菌酶(天根生物,RT401);用于直接 PCR 的微生物裂解缓冲液(TaKaRa,9164);高保真酶(诺唯赞,P510-02);细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物,DP302-02);血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生物,DP304-03);探针法 qPCR 检测试剂盒(TaKaRa,RR390A)。

超微量分光光度计(Berthold Technologies, Colibri);PCR 扩增仪(Bio-Rad, T100);实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, QX200);恒温摇床(兴科佰晟, SPH-200B);干涉显微镜(奥林巴斯, BX53);高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器股份公司, D3024R);多功能凝胶图像分析系统(上海天能生命科学有限公司, Tanon MINI Space 1000)。

1.3 实验方法

1.3.1 Hp 的培养

(1) Hp 的复苏和传代

以甘油管形式保存的 Hp SS1 菌株从 -80°C 冰箱取出,于水浴锅中快速解冻。在生物安全柜中挑取菌液接种至哥伦比亚固体血平板,吸取剩余菌液加入含 7%~10%胎牛血清的布氏肉汤厌氧玻璃瓶中,用于液体培养 6~9 d。固体平板倒置于密封厌氧培养罐中,放入微需氧产气袋于 37°C 培养箱中培养 5~7 d。待平板菌落长出后,用无菌接种环挑取单菌落接种到新的平板。液体培养传代需使用注射器吸取菌液注射到新的培养基中。

(2) Hp 的体外生长实验

生长至对数期的菌液传代接种到新的培养基中,从接种的第 0 天开始每隔 1 d 用一次性注射器取 200 μL 菌液测定光密度(OD_{600}),记录其随时间的变化情况以绘制生长曲线。将生长至

对数期的液体培养瓶中的菌液进行梯度稀释,分别测定稀释后菌液的 OD_{600} ,并吸取每个稀释梯度下适量菌液分别接种到固体培养基上,细菌培养 5~7 d 至菌落长出后,对每个稀释度下的平板菌落数进行计数,菌落数在 30~300 之间较为合适。根据稀释倍数与接种体积计算每毫升液体原液中的总菌落形成单位/CFU。计算公式为: $\text{CFU}/\text{mL} = \text{平板菌落数} \times \text{稀释倍数} / \text{接种体积}$ 。记录 CFU 随不同稀释度下 OD_{600} 值的变化情况,以便进行细菌计数。

1.3.2 Hp 的鉴定

(1) 快速脲酶检测

滴加两滴快速脲酶检测试剂到检测杯中,待杯底药剂完全溶解后,吸取适量待检测的菌液或使用接种环刮取平板上生长的菌落加入检测杯中,室温孵育 5~10 min 后,观察检测试剂颜色变化。

(2) 革兰氏染色

使用革兰氏染色试剂盒对细菌进行革兰氏染色,在显微镜下用油镜观察细菌形态。

(3) 分子生物学鉴定

PCR 管中加入 3~5 μL 微生物裂解缓冲液以及 20~50 μL 无菌水,取生长至对数期的菌液,于 4°C 8000 r/min 转速下离心 3 min,弃去上清液,吸取 5~10 μL 沉淀或直接挑取平板菌落到 PCR 管中,吹匀,瞬离,裂解。使用 16S 引物^[18]或 Hp 特异性引物对裂解后的细菌 DNA 进行 PCR 扩增,引物设计见表 1。PCR 反应结束后,配制 1.5%琼脂糖凝胶,吸取 5 μL PCR 产物跑胶根据条带大小初步鉴定是否正确,将位置正确的样品送北京天一辉远生物科技有限公司测序,测序结果与 GenBank 数据库比对。

表 1 鉴定引物序列设计
Table 1 Primer sequence design

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Product size
16S	27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 1492R:5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'	1465
VacA	F:5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' R:5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	286
CagA	F:5'-GTTGATAACGCTGTCGCTTC-3' R:5'-GGGTTGTATGATATTTTCCATAA-3'	351

1.3.3 动物分组及感染方案

小鼠随机分组,对照组小鼠未经处理,感染组小鼠分为 Hp 灌胃 1 次(模拟人感染 Hp 的真实情况)和灌胃 4 次。明确泮托拉唑的作用时,用 20 mg/kg 泮托拉唑预处理 2 h 后 Hp 灌胃 1 次或 4 次,每次灌胃在用泮托拉唑预处理 2 h 之后进行。感染 21 d 后取材分析。

鉴定正确且生长状况良好的 Hp 菌株在添加 7%~10%胎牛血清的布氏肉汤中培养 6~9 d,测定 OD₆₀₀,通过上述转换曲线计数。菌液离心,用布氏肉汤培养基重悬,每只小鼠灌胃 100 μL 菌悬液,接种菌量约为 5×10⁸ CFU。共感染 4 次,隔天 1 次,感染前禁食 12 h,感染完成后 2 h 进食。泮托拉唑预处理组,按照 20 mg/kg 的给药剂量,给药前小鼠禁食 12 h,泮托拉唑给药后 2 h 按上述方案感染小鼠,感染完成后 2 h 进食。

1.3.4 感染检测方法

感染结束后 3 周取材检测 Hp 是否在小鼠胃部定植成功。小鼠处死,使用无菌器械分离胃,沿胃大弯剪开,无菌 PBS 冲洗胃部食物残渣。胃组织沿胃体与胃窦的交界处剪开,分别置于灭过菌的盛有钢珠的 2 mL 离心管中,做好标记,冰上保存并尽快称重,加入无菌 PBS 用震荡研磨器研磨成浆。研磨后的胃组织匀浆用于后续尿素酶检测、培养法检测以及 qPCR 方法验证。

(1) 快速脲酶检测

参照 1.3.2 中快速脲酶检测方法进行。

(2) 培养法检测

上述研磨后的胃组织匀浆原液或适量稀释后涂布到选择性哥伦比亚血琼脂平板(万古霉素, 6~10 μg/mL;甲氧苄氨嘧啶, 5 μg/mL;两性霉素 B, 8 μg/mL)上,记录接种体积以及稀释倍数,平板于 37 ℃微需氧环境中培养 5~7 d,待菌落长出后通过菌落形态、快速脲酶检测、PCR 等方法鉴定 Hp,利用铺板体积和稀释倍数计算原液菌落数,通过记录的胃组织重量计算每克胃组织

中成功定植的菌落数。

(3) qPCR 验证

利用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取剩余的胃组织匀浆 DNA,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取若干细菌 DNA 用作阳性对照,检测 DNA 浓度。通过 qPCR 对培养法中检测到 Hp 成功定植的胃组织进行验证,引物与探针设计参考文献^[19],序列如表 2,由北京天一辉远生物科技有限公司合成,扩增产物片段大小为 101 bp。

1.4 统计学方法

文章采用 GraphPad Prism 8.0.1 进行数据分析,实验数据均采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示,两组间样本比较采用独立样本 *t* 检验,当 *P*<0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Hp 平板培养和鉴定

首先建立哥伦比亚血琼脂平板固体培养系统实现 Hp 的稳定培养。然后进行革兰氏染色,在显微镜下观察可见呈弯曲的螺旋状革兰氏阴性菌(图 1A)。尿素酶检测实验组溶液变成红色,阴性对照组颜色仍为黄色,提示为 Hp(图 1B)。PCR 联合测序检测细菌 16S rDNA 及 Hp CagA 和 VacA 毒力因子基因,结果扩增的条带大小和测序结果均证明其为 Hp(图 1C)。

2.2 Hp 液体培养和鉴定

为方便 Hp 扩大培养用于体内实验,进一步建立了 Hp 的液体培养系统(具体见 1.3)。通过测定不同时间点菌液 OD₆₀₀ 值绘制 Hp 生长曲线(图 1D),结果显示接种第 5~8 天 Hp 生长进入对数期。为方便 Hp 定量,对菌液进行梯度稀释后分别检测 OD₆₀₀ 值和 CFU,随后对 Hp OD₆₀₀ 与 CFU 数值进行线性回归拟合分析(图 1E)。后续开展体内实验 Hp 接种量的定量通过直接测定 OD₆₀₀,利用拟合方程换算获得。此外,还进一步

表 2 qPCR 引物序列设计

Table 2 qPCR primer sequence design

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Product size
UreaB	F:5'-CAAAATCGCTGGCATTGGT-3'	101
	R:5'-CTTCACCGGCTAAGGCTTCA-3'	
	Probe:5'-AACAAAGACATGCAAGATGGCGTTAAAAACA-3'	

利用 PCR 方法对 Hp 进行鉴定(图 1F)。

2.3 Hp 在 C57BL/6J 小鼠定植效率的测定

利用 C57BL/6J 小鼠进行 Hp 体内定植效率的检测。具体实验的分组和处理见 1.3, 如图 2A。快速脲酶检测结果显示对照组和感染组小鼠胃窦匀浆样品均出现颜色变化(黄色变为橘红色)(图 2B), 提示胃窦中可能存在其它的脲酶阳性细菌^[20-21], 但不能明确 Hp 是否定植成功。需进一步利用定植检测的“金标准”——胃组织匀浆细菌培养方法进行分析, 结果显示在灌胃 4 次组中, 2/6 小鼠胃窦组织检测到定植, 定量结果显示两只小鼠的 Hp 定植 CFU 分别是 25/mg 和 9/mg 组织(表 3)。胃体和贲门均未检测到 Hp, 这与 Hp 主要感染人胃窦一致。

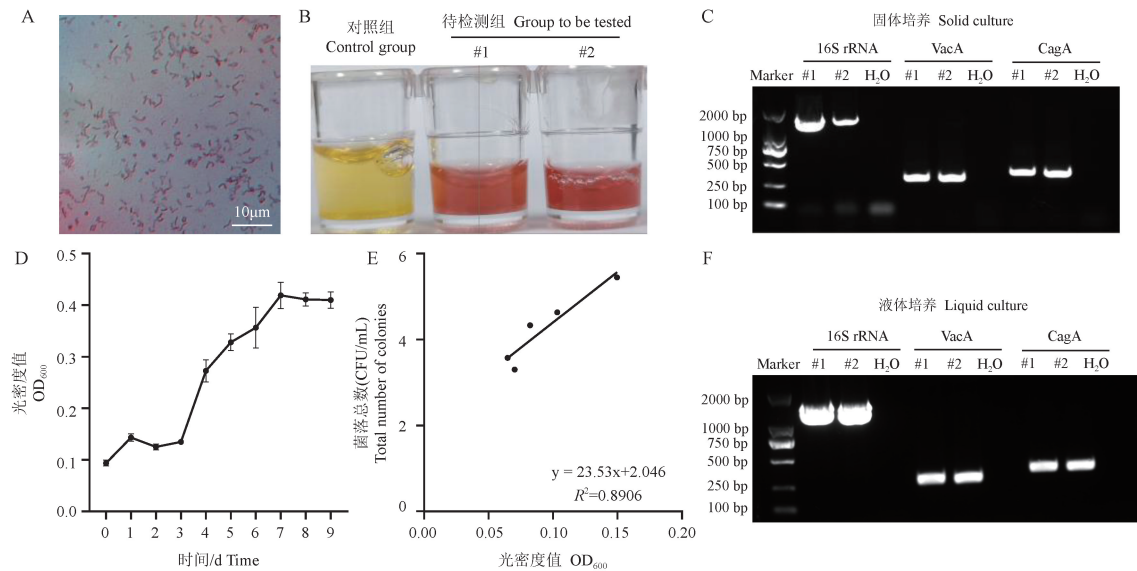
2.4 PPI 泮托拉唑处理对小鼠胃酸分泌的影响

为明确泮托拉唑是否能够作为定植辅助剂促进 Hp 在小鼠胃内的定植, 首先分析不同剂量 PPI 泮托拉唑处理对胃酸的调节作用(图 3A)。

结果显示 3 mg/kg 和 20 mg/kg 泮托拉唑处理均能显著抑制胃酸分泌, 其中后者胃 pH 升高更为显著, 在给药后 2 h 胃 pH 达到 7 左右(图 3B)。因此后续使用 20 mg/kg 泮托拉唑预处理分析其是否能够增加 Hp 在小鼠胃内的定植。

2.5 泮托拉唑预处理对 Hp 在小鼠胃部定植效率的影响

为明确泮托拉唑抑制胃酸分泌对 Hp 定植的影响, 实验分组见 1.3, 如图 4A。胃组织匀浆细菌培养结果显示在灌胃 4 次组中, 3/6 小鼠胃窦组织检测到定植, 胃体和贲门均未检测到 Hp。定量结果显示 3 只小鼠的 Hp 定植 CFU 分别是 69/mg、28/mg 和 29/mg 组织(表 4), 较无 PPI 预处理组小鼠 Hp 定植量和成功定植小鼠的比例均有提高(表 3)。进一步利用 TaqMan qPCR 验证以上结果, qPCR 扩增曲线及其产物的琼脂糖凝胶电泳结果与培养法结果一致(图 4B)。有趣的是, 无 PPI 预处理 Hp 感染组中通过培养法检测两只阳



注: A: Hp 革兰氏染色结果; B: 快速脲酶检测, 对照组: 布氏肉汤培养基, #1 和 #2 代表平板培养挑取的不同克隆; C: Hp 固体培养 PCR 鉴定, #1 和 #2 代表不同固体平板上收取的细菌沉淀; D: Hp 生长曲线; E: Hp OD₆₀₀ 与 CFU 线性拟合曲线; F: Hp 液体培养 PCR 鉴定, #1 和 #2 代表不同液体培养瓶中收取的细菌沉淀。

图 1 Hp 的培养和鉴定

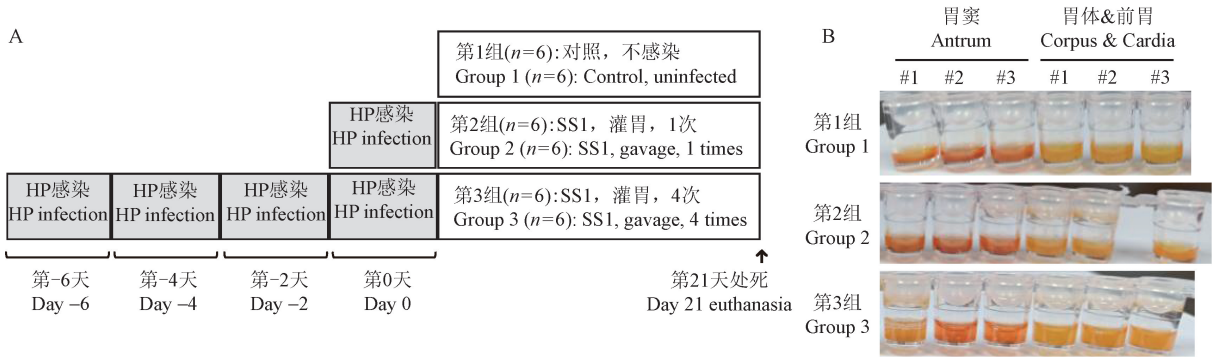
Note. A, Gram staining results of Hp. B, Rapid urease test. Control group, Brucella broth medium. #1 and #2 represent different clones isolated from plate cultures. C, PCR identification of Hp from solid culture. #1 and #2 represent bacterial precipitates collected from different solid plates. D, Hp growth curve. E, Linear fitting curve of Hp OD₆₀₀ versus CFU. F, PCR identification of Hp from liquid culture. #1 and #2 represent bacterial precipitates collected from different liquid culture flasks.

Figure 1 Hp culture and identification

表 3 Hp 在小鼠胃内的定植情况
Table 3 Summary of Hp colonization in mouse gastric tissue

分组 Groups	定植时间/周 Time post-infection /week	成功定植 Hp 小鼠数量/ <i>n</i> Number of mice with Hp colonization	胃窦 (菌落数/mg 胃组织) Antrum (CFU/mg tissue)	胃体 & 前胃 (菌落数/mg 胃组织) Corpus & Cardia (CFU/mg tissue)
1	3	0/6	0	0
2	3	0/6	0	0
3	3	2/6	17±8*	0
3	3	2/6	(#11:25; #12: 9)	0

注:与对照组相比, **P*<0.05。
Note. Compared with the control group, **P*<0.05.

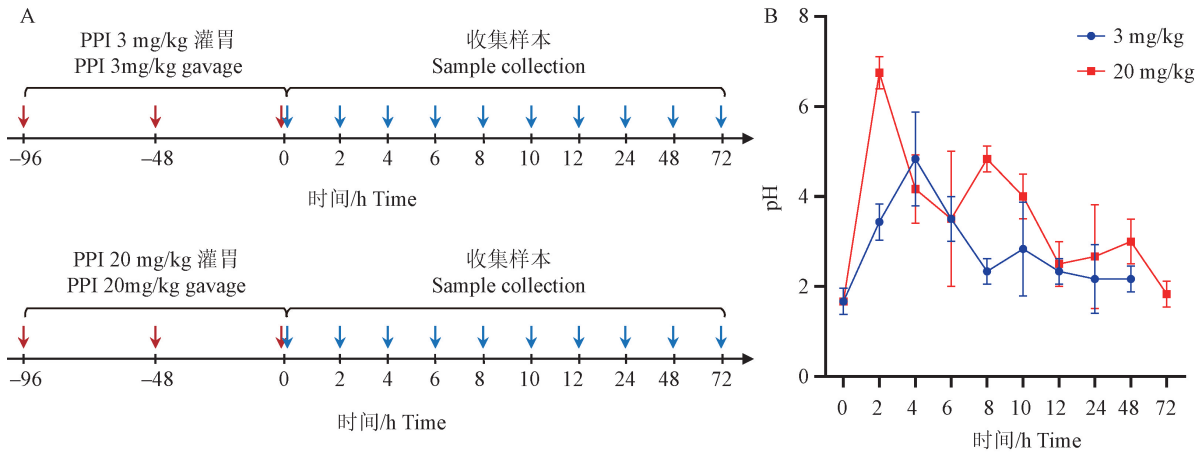


注:A:动物感染实验的分组和处理方案;B:快速脲酶检测小鼠胃内 Hp 定植情况, #1、#2、#3 为小鼠编号, 每组中选取 3 只小鼠进行检测。

图 2 Hp 在 C57BL/6J 小鼠的定植效率(*n*=6)

Note. A, Grouping and treatment scheme for animal infection experiment. B, Rapid urease test for assessing Hp colonization in the mouse stomach. #1, #2, and #3 represent mouse identification numbers. Three mice were selected from each group for testing.

Figure 2 Colonization efficiency of Hp in C57BL/6J mice(*n*=6)



注:A:泮托拉唑分组和给药方案;B:小鼠胃内 pH 随泮托拉唑作用时间的变化曲线。

图 3 PPI 泮托拉唑处理显著抑制小鼠胃酸分泌(*n*=3)

Note. A, Administration method of pantoprazole and grouping scheme of mice. B, Curve showing changes in gastric pH in mice over time following pantoprazole administration.

Figure 3 PPI pantoprazole significantly inhibits gastric acid secretion in mice(*n*=3)

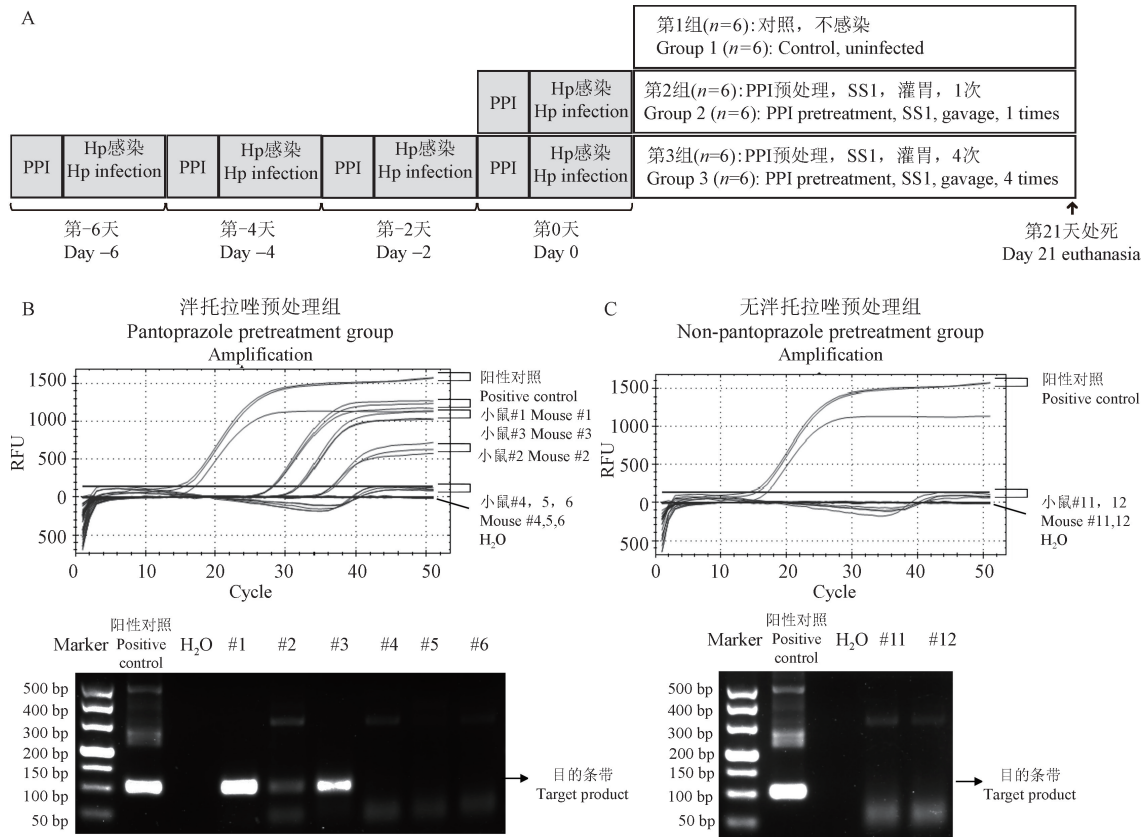
性小鼠,qPCR 扩增曲线及其产物的琼脂糖凝胶电泳结果均显示是阴性(图 4C)。这些结果进一步表明泮托拉唑预处理后能够有效提高小鼠中 Hp 的定植量。综合以上结果表明,质子泵抑制剂预处理能够通过抑制胃酸分泌在一定程度上促进 Hp SS1 在小鼠胃部定植。

表 4 Hp 在小鼠胃内的定植情况

Table 4 Summary of Hp colonization in Mouse Gastric Tissue

分组 Groups	定植时间/周 Time post-infection /week	成功定植 Hp 小鼠数量/ <i>n</i> Number of mice with Hp colonization	胃实(菌落数/mg 胃组织) Antrum (CFU/mg tissue)	胃体 & 前胃(菌落数/mg 胃组织) Corpus & Cardia (CFU/mg tissue)
1	3	0/6	0	0
2	3	0/6	0	0
3	3	3/6	42±19 *	0
3	3	3/6	(#1: 69; #2: 28; #3: 29)	0

注:与对照组相比, **P*<0.05。
Note. Compared with the control group, **P*<0.05.



注:A:第二次动物感染实验的分组和处理方案;B:qPCR 法验证泮托拉唑预处理组培养法检测结果(上),#1、#2、#3 为检测到成功定植的小鼠,#4、#5、#6 为未检测到定植的小鼠,qPCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果图(下),产物片段大小为 101 bp;C:qPCR 法验证单独感染组培养法检测结果(上),#11、#12 为检测到成功定植的小鼠,qPCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果图(下),产物片段大小为 101 bp。

图 4 泮托拉唑预处理促进 Hp 在小鼠胃部定植(*n*=6)

Note. A, Grouping and treatment protocol for the second animal infection experiment. B, Validation of bacterial culture results in the pantoprazole pretreatment group using qPCR (top). Samples #1, #2, and #3 indicate successful colonization, while samples #4, #5, and #6 show no detectable colonization. The agarose gel electrophoresis results of the qPCR amplification products are shown (bottom), with a product size of 101 bp. C, Validation of bacterial culture results in the infection-only group using qPCR (top). Samples #11 and #12 indicate successful colonization. The agarose gel electrophoresis results of the qPCR amplification products are shown (bottom), with a product size of 101 bp.

Figure 4 Pantoprazole promotes the colonization of the Hp in the mouse stomach (*n*=6)

3 讨论

PPI 作为抑制胃酸分泌的药物,常与铋剂以及两种抗生素一起作为四联疗法用于 Hp 根除治疗^[22]。为何在 Hp 根除治疗中需要抑酸剂的存在?而本研究却发现其可以作为一种提高 Hp 在胃内定植的辅助剂?这两者似乎互相矛盾,其实不然。尽管 Hp 通过分泌尿素酶将尿素分解为氨和二氧化碳,氨可以中和胃酸,从而在细菌周围形成一个相对中性的微环境,使得 Hp 能够在胃内酸性环境中暂时存活,但 Hp 生长的最适 pH=6~7,只在 pH=6~8 时活跃生长,pH=4~6 时处于不分裂的静息状态^[23]。处于静息状态时抗生素的疗效不能有效发挥,在活跃复制时,菌体对抗生素更加敏感,更易于被清除。此外,许多抗生素不耐酸,在酸性环境中稳定性低,容易降解^[24]。因此,PPI 与抗生素联合能够达到更好根除 Hp 的疗效。但是胃酸同样是抑制病原体在胃中生存和繁殖的天然防御屏障。当 PPI 处理导致胃酸分泌降低时,胃部屏障保护作用下降,从而有利于 Hp 及其它病原体在胃环境中存活,进而定植。虽然 Hp 能够利用其尿素酶活性在酸性环境中生存,但在 pH 值较高的中性环境中将更加“省时省力”,更适宜其定植生长。本研究的体内实验证明了质子泵抑制剂预处理能够通过抑制胃酸分泌在一定程度上促进 Hp 在小鼠胃部定植。

本研究还存在以下不足,计划在后续研究中进行完善。首先,前期研究报道 Hp 在 C57BL/6J 具有高定植能力,定植率达到 70%~100%,并且其在胃内的定植密度能够达到 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g 组织^[25]。但本研究在 PPI 未处理组仅观察到 2/6 小鼠发生定植,定植量仅达到 $10^4 \sim 10^5$ CFU/g 组织,远低于文献中报道的定植率和定植数量。分析可能与不同研究中接种的菌量、频次以及检测定植时间不同有关。由于本研究主要目的是比较有无 PPI 预处理对 Hp 定植效率的影响,与以往研究通常在 8 周以后检测 Hp 定植不同,本研究选择在灌胃后 3 周检测定植情况,能够更有利于观察 PPI 处理对 Hp 定植的影响。在后续研究中计划设置不同的时间点,例如在感染后 4 周、8 周和 16 周,评估 PPI 预处理对 Hp 定植效率的影响。总之,尽管本研究中 Hp 整体定植率和定植

量偏低,但 PPI 预处理能够通过抑制胃酸分泌在一定程度上促进 Hp 在小鼠胃部定植,提示质子泵抑制剂能够作为定植辅助剂用于建立 Hp 感染小鼠模型。

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] ALSINA M, ARRAZUBI V, DIEZ M, et al. Current developments in gastric cancer: from molecular profiling to treatment strategy [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(3): 155-170.
- [3] NIM Y S, FONG I Y H, DEME J, et al. Delivering a toxic metal to the active site of urease [J]. Sci Adv, 2023, 9(16): eadf7790.
- [4] WANG H, ZHAO M, SHI F, et al. A review of signal pathway induced by virulent protein CagA of *Helicobacter pylori* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1062803.
- [5] TRAN S C, BRYANT K N, COVER T L. The *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island as a determinant of gastric cancer risk [J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2314201.
- [6] MALFERTHEINER P, CAMARGO M C, EL-OMAR E, et al. *Helicobacter pylori* infection [J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 19.
- [7] HIRAYAMA F, TAKAGI S, YOKOYAMA Y, et al. Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils [J]. J Gastroenterol, 1996, 31 (Suppl 9): 24-28.
- [8] SAWADA Y, KURODA Y, SASHIO H, et al. Pathological changes in glandular stomach of *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbil model [J]. J Gastroenterol, 1998, 33 (Suppl 10): 22-25.
- [9] 李弘, 颜丽萍, 梁勇, 等. 幽门螺杆菌感染动物模型最新进展 [J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2019, 19(16): 79-81.
LI H, YAN L P, LIANG Y, et al. Recent advances in animal models of *Helicobacter pylori* infection [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(16): 79-81.
- [10] ANSARI S, YAMAOKA Y. Animal models and *Helicobacter pylori* infection [J]. J Clin Med, 2020, 11(11): 3141.
- [11] LIU Z, LI H, HUANG X, et al. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and vaccines: current status and future prospects [J]. Helicobacter, 2024, 29(4): e13119.
- [12] SETIA A, CHALLA R R, VALLAMKONDA B, et al. Clinical implications of proton pump inhibitors and vonoprazan micro/nano drug delivery systems for gastric

- acid-related disorders and imaging [J]. *Nanotheranostics*, 2024, 8(4): 535–560.
- [13] 李丹, 聂占国. 质子泵抑制剂治疗胃食管反流病的研究进展 [J]. 中华胃食管反流病电子杂志, 2021, 8(1): 42–45.
- LI D, NIE Z G. Research progress of proton pump inhibitors in the treatment of gastroesophageal reflux disease [J]. *Chin J Gastroesophageal Reflux Dis Electron Ed*, 2021, 8(1): 42–45.
- [14] SAWAID I O, SAMSON A O. Proton pump inhibitors and cancer risk: a comprehensive review of epidemiological and mechanistic evidence [J]. *J Clin Med*, 2024, 13(7): 1970.
- [15] PARK J M, HAN Y M, PARK Y J, et al. Dietary intake of walnut prevented *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer through rejuvenation of chronic atrophic gastritis [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2021, 68(1): 37–50.
- [16] 郭锋, 陆华龙, 陈根, 等. 左旋泮托拉唑钠临床前毒理学研究 [J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(1): 51–54.
- GUO F, LU H L, CHEN G, et al. Preclinical toxicologic studies of (L-) pantoprazole sodium [J]. *J Med Sci Cent South China*, 2012, 40(1): 51–54.
- [17] TANEJA G, THANIKACHALAM P V, RAJPUT S K. Dose and time-dependent toxicological impact of pantoprazole on vascular endothelium and renal tissue [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 333: 97–104.
- [18] 李永军, 李兰娟. 无菌动物无菌检测的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 110–115.
- LI Y J, LI L J. Discussion on aseptic tests of germ-free animals [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(1): 110–115.
- [19] WHARY M T, GE Z, FOX J G. Verifying and quantifying *Helicobacter pylori* infection status of research mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 921: 143–156.
- [20] BRANDI G, BIAVATI B, CALABRESE C, et al. Urease-positive bacteria other than *Helicobacter pylori* in human gastric juice and mucosa [J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(8): 1756–1761.
- [21] SHEN Z, DZINK-FOX J, FENG Y, et al. Gastric Non-*Helicobacter pylori* Urease-positive *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus salivarius* isolated from humans have contrasting effects on H. pylori-Associated gastric pathology and host immune responses in a murine model of gastric cancer [J]. *mSphere*, 2022, 7(1): e0077221.
- [22] YANG E H, CHEN W Y, CHIANG H C, et al. 10-Day versus 14-day bismuth quadruple therapy for first-line eradication of *Helicobacter pylori* infection: a randomised, open-label, non-inferiority trial [J]. *EClinicalMedicine*, 2024, 70: 102529.
- [23] SCOTT D, WEEKS D, MELCHERS K, et al. The life and death of *Helicobacter pylori* [J]. *Gut*, 1998, 43(Suppl 1): S56–S60.
- [24] 袁耀宗. 酸相关性疾病的抑酸标准及抑酸药物选择 [J]. 中华消化杂志, 2023, 43(9): 579–582.
- YUAN Y Z. Acid suppression criteria and the selection of acid-suppressive medications for acid-related disease [J]. *Chin J Dig*, 2023, 43(9): 579–582.
- [25] LEE A, O'ROURKE J, DE UNGRIA M C, et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(4): 1386–1397.

[收稿日期]2024-12-03