

# 幽门弯曲杆菌生物学特性的研究

凌代文

(中国科学院微生物研究所)

冯瑞娥 朱昌仁 杨昭徐

(北京天坛医院病理科) (北京天坛医院内科)

**摘要** 从90例胃疾患者的胃粘膜上皮组织观察到幽门弯曲杆菌,应用微需氧的技术对这种细菌进行了分离和培养。在活体组织上的幽门弯曲杆菌的菌体多呈3个弯曲的螺旋形。在体外培养基上生长的菌体为稍弯曲的杆状,而在较老的培养物中细菌形态则成为短杆或类球状。显微超薄切片显示出细菌的胞壁具有双层的结构和带鞘的鞭毛。这种菌的菌体表面光滑,具有1—3根极生鞭毛,鞭毛的末端有膨大的类球形物。对分离物中的10株幽门弯曲杆菌的菌株进行了生理生化试验。其主要特征与典型的幽门弯曲杆菌基本相同,只是在25℃生长的性状有差异,并且经数次传代后能在空气中生长。关于该菌的分类学地位及有关问题在文中进行了讨论。

**关键词** 幽门弯曲杆菌;生物学特性

自从Warren和Marshall于1983年分别报道<sup>[1]</sup>在活动性慢性胃炎患者的胃粘膜上皮组织观察和分离到幽门弯曲杆菌以来,幽门弯曲杆菌与胃及十二指肠疾病的关系问题引起了人们的关注。近几年国外学者对此进行了大量的工作<sup>[2]</sup>。现在一般认为这种菌与慢性胃炎和消化性溃疡的发病有密切的关系。国内在这方面也开展了工作,也曾报道分离到这类细菌<sup>[3]</sup>,并发现其在我国的慢性胃炎及消化性溃疡病人中检出率较高,而有关其生物学特性及在分类学上的地位,与幽门弯曲杆菌相关的胃部病变的病理形态及其在胃部各种病变中所起的作用目前知之尚少。为研究上述问题,进一步探讨幽门弯曲杆菌与有关胃疾病的关系,1986年底至1988年初我们在以上几方面进行了研究工作。本文将重点报道有关幽门弯曲杆菌的分离培养及其生物学特性的研究结果。对其在分类学上的地位问题也进行了讨论。

## 材料和方法

### (一) 取样

我们对344例主诉胃部不适患者进行内窥

镜检查。观察胃及十二指肠有无充血、溃疡、疤痕等病变,并对其中90例病人做内窥镜检查。作出胃疾病判断的同时,按患者的病情在其胃粘膜上皮组织的不同部位,如胃体中段小弯侧、胃窦大弯侧及球前壁等处各取样两块,一块作细菌分离培养,另一块用作病理切片观察。前一份样品采取后立即放置装有约0.8ml的20%葡萄糖液的厌氧试管内。装样品的试管预先灭菌,并充以氮气。试管开启时立即放入样品,盖上橡皮塞,放置冰壶内,立即带至实验室分离。

每次检查胃镜及活检钳均用流水冲洗,然后分别用“84肺炎消毒液”及75%乙醇消毒。

### (二) 分离培养

1. 分离方法:将活检样品连同葡萄糖液倒入组织研磨器内研碎。用无菌注射器吸取其中研碎的组织液约0.1ml,滴在有分离培养基的平板上,用玻璃扩布器均匀涂磨开或用接种针划开。连续做二个平板,放入厌氧罐(BBL GasPaK 100型),用抽气装置抽去约90%空气,再充入约80% N<sub>2</sub>和10% CO<sub>2</sub>。置于37℃下培养4—5天。连续纯化,直到获得纯菌<sup>[4]</sup>。

2. 培养基: 我们初期使用牛心脑浸出液营养培养基作为分离的基础培养基, 其中再加入 5—7% 兔血, 万古霉素 6 mg/L, 两性霉素 2 mg/L 及 TMP 5  $\mu$ g/L<sup>[4]</sup>。

分离纯化后的菌株移种到 Skirrow 培养基或 PYG 培养基<sup>[5]</sup>斜面上。经比较发现细菌在 PYG 培养基上生长良好, 而且配制较方便。因此后来将分离培养基改用 PYG 培养基组分, 再加入上述的抗菌素和 TMP。获得较满意的分离效果。

### (三) 鉴定方法

1. 形态观察: 将分离纯化后的细菌培养物做成菌悬液, 蘸附于金属网的火棉胶膜上。喷镀后在日立 H-600 型透射电子显微镜下观察菌体形态、鞭毛的着生位置及数量等。

另取病例中发现有幽门弯曲杆菌的胃粘膜组织, 经戊二醛和锇酸固定及 812 树脂包埋, 在 CKB 超薄切片机切片后, 置于日立 H-600 型电镜下观察。其中有 3 例经脱水、喷金, 在日立 S-520 型扫描电镜下观察菌体在组织上的形态。

使用 Olympus 显微镜 BHZ-PC 型相差镜观察体外培养的细菌及其动力和运动的方式。

观察一般革兰氏染色及鞭毛染色后的菌体是使用 AO 2071 型光学显微镜。

2. 生理生化特性的试验: 参考了有关的鉴定方法<sup>[5,6]</sup>及空肠弯曲杆菌的部分鉴定法。试验了下列的项目: 在 100% N<sub>2</sub>、100% 空气和 80% N<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub> + 10% O<sub>2</sub> 中进行生长试验对比; 尿素酶的生成试验; 接触酶和氧化酶的产生; 硝酸盐还原; 产生吲哚和 H<sub>2</sub>S 试验; 马尿酸的水解; 在 3.5% NaCl 和 1% 甘氨酸中的生长试验, 以及 25℃ 和 42℃ 温度试验。

3. 药物敏感试验: 应用药物纸片琼脂扩散法进行抗菌素敏感试验<sup>[7]</sup>。使用的抗菌素标准纸片由中国医学科学院药品生物制品检定所提供。纸片内抗菌素含量( $\mu$  或  $\mu$ g/片): 青霉素 10u、羧苄青霉素 100  $\mu$ g、链霉素 10u、庆大霉素 10u、新生霉素 30  $\mu$ g、四环素 30  $\mu$ g、红霉素

15u、多粘菌素 B 300u、新霉素 30u、氯霉素 30  $\mu$ g 及利福平 5  $\mu$ g。

4. DNA 的提取及其中 G + C 克分子含量的测定参考 Marmur. J. 等<sup>[8,9]</sup>的方法。

使用厌氧培养瓶在无氧的氮气条件下制作培养液。灭菌后接种有代表性的菌株(9号菌), 无菌地按比例充入二氧化碳和微量氧。适温培养 5 天左右。较大量的收集菌体后, 用溶菌酶破壁, 按步骤提取 DNA, 测定之。

## 结 果

### (一) 形态

幽门弯曲杆菌在厌氧罐内微量氧的气相条件下, 在心脑浸液或 PYG 琼脂平板上 37℃ 培养 4—6 天的菌落, 直径 1 mm 左右, 圆形、凸起、表面光滑、边缘整齐、豆汁黄、半透明。

在扫描电子显微镜下观察胃粘膜组织上的幽门弯曲杆菌, 可见到主要分布在上皮细胞表面, 多呈三个弯曲的螺旋形, 有时也见到四个弯曲状的菌体, 其中段弯曲度较大, 两端弯曲度较小。菌体两端钝圆, 有的菌体一端较另一端稍显粗大。在菌体的一端有时可见到一根极生鞭毛。对插入在上皮细胞间的细菌, 则只能见到菌体的末端和鞭毛(图版 I-1)。

透射电子显微镜下观察幽门弯曲杆菌的超薄切片, 可显示革兰氏阴性菌的细胞双层膜结构和这种细菌的带鞘鞭毛(图版 I-2)。

在体外培养的菌体, 经制膜、点样和喷镀之后置于透射电镜下观察, 菌体稍弯曲, 表面光滑, 两端钝圆, 有的一端较另一端略细。菌体的一端着生 1—3 根鞭毛。在鞭毛的末端有膨大的类球形物(图版 I-3—5)。

在光学显微镜下观察幽门弯曲杆菌为革兰氏阴性杆菌, 稍有弯曲。很少呈现胃粘膜组织上螺旋形多弯曲状的形态。在相差显微镜下观察活体细胞呈螺旋状蠕动。菌体大小为 0.3—0.5  $\mu$ m × 2—3  $\mu$ m。单生或成双排列(图版 I-6)。老培养物上的菌体成为短杆状或类球形。

### (二) 生理生化特征和生长性状

我们从 90 例病人胃粘膜组织分离培养的

弯曲杆菌中随机取其中 10 株幽门弯曲杆菌进行了生理生化试验,结果见表 1。

表 1 试验的幽门弯曲杆菌菌株的生理生化特征

特征	菌株号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
氧化酶	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
接触酶	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
尿素酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
马尿酸盐水解	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
产生明胶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S 的生成	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1% 甘氨酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
温度试验										
42℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

在微氧条件下,幽门弯曲杆菌在心脑浸液培养基、Skirrow 氏培养基及 PYG 培养基中均可生长。在上述培养基中加入 10% 小牛血清生长更好。

在初始分离时及分离纯化的菌种在 100% N<sub>2</sub> 的气体或通常的空气中均不生长,但在体外经传代培养后可在空气中生长。

### (三) 对药物的敏感性

对庆大霉素、新生霉素、红霉素、多粘菌素 B、四环素、氯霉素和利福平敏感。对链霉素、青霉素和新霉素不敏感。对羧苄青霉素的敏感性菌株间有差异,敏感或不敏感。

### (四) DNA 中 G + C 的含量

测定 DNA 中 G + C 的克分子含量为 36.8%。

## 讨 论

关于幽门弯曲杆菌的形态,自 Warren 1983 年以来多数报道均认为是呈 S 形或弧形。而我们在电镜下观察胃粘膜组织中的幽门弯曲杆菌的典型形态呈螺旋形,通常有 3—4 个弯曲。中部弯曲度较两端为大。在体外培养时的菌体弯曲度则不同于胃粘膜组织上的菌,其菌形稍弯曲,与 Marshall<sup>[1]</sup> 和张振华<sup>[3]</sup> 的观察

相同。

关于本实验中幽门弯曲杆菌经传代后能在空气中生长的问题,由于这种菌是按弯曲杆菌属的细菌分离的条件分离到的,弯曲杆菌是微好氧菌,要求低的氧压(3—6%)生长,尤其在移种少量的细胞时明显。而 Hoffman 等也曾报道在固体或液体培养基中如果接种大量的弯曲杆菌细胞时,氧的毒害性则可以被克服<sup>[10]</sup>。因此就不难理解当本实验的细菌经分离纯化后增殖大量细胞再移种时能在空气中生长的原因。

本实验结果描述的幽门弯曲杆菌菌株的主要性状与以往报道的基本上相同<sup>[11]</sup>,但也有个别项目不符合,如在 25℃ 的温度生长试验。我们认为这可能是由于菌株间存在的差异,也可能是由于实验的方法和使用的培养基不一致。

对幽门弯曲杆菌的鉴定现在国内有人提倡使用一种快速鉴定盒,即根据这种菌具有尿素酶活性而设计的一种简便的鉴定方法。如果细菌中仅此幽门弯曲杆菌具有尿素酶活性这一特征,则可认定此法可作为鉴别这种细菌一种独特的简便方法。但是根据现已报道和公认的细菌属种中就有不少能产生尿素酶的<sup>[10]</sup>。例如:兼性厌氧的革兰氏阴性细菌中就有侵肺巴斯德氏菌 (*Pasteurella pneumotropica*)、豚巴斯德氏菌 (*P. ureae*) 和产气巴斯德氏菌 (*P. aerogenes*); 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌 (*K. oxytoca*)、土壤克雷伯氏菌 (*K. terrigena*)、植物克雷伯氏菌 (*K. planticola*); 假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Y. enterocolitica*)、中间耶尔森氏菌 (*Y. intermedia*)、费氏耶尔森氏菌 (*Y. frederiksenii*)、克氏耶尔森氏菌 (*Y. kristensenii*), 厌氧细菌中的肉梭菌 (*Clostridium carnis*)、索氏梭菌 (*C. sordellii*) 等。还有与幽门弯曲杆菌形态相似的水生螺菌属 (*Aquaspirillum*) 和固氮螺菌属 (*Azospirillum*) 的细菌,前一属中有七个种,后一属中有两个种均可生成尿素酶。即使在弯曲杆菌属中除幽门

弯曲杆菌外, Fricker 和 Park 最近还提出有一种固氮弯曲杆菌 (*Campylobacter nitrofigilis*) 也具有尿素酶活性。此外还报道有一类嗜热的弯曲杆菌, 其尿素酶也是阳性<sup>[2]</sup>。以上列举的事例已足可以说明仅凭有无尿素酶活性来鉴定幽门弯曲杆菌有欠妥之处。很可能因此得出不准确的结论, 从而导致对病人病因错误的诊断, 延误治疗。当然, 我们不否认产尿素酶是幽门弯曲杆菌的一个重要特征, 而是认为对这类细菌的鉴别还应结合其它特征。对幽门弯曲杆菌的形态及其生物学特性的分析, 将有助于对这类菌较全面的认识。它不仅在微生物学, 而且在临床上对有关疾病的诊断也有重要意义。

关于幽门弯曲杆菌分类学的地位问题, 自发现这种菌以来就成为分类学上探讨的课题。Marshall 首次分离到幽门弯曲杆菌, 从其形态和生化特性来看, 他认为是一种新的菌, 不能划归在目前已知的细菌种内。按其某些特征他暂拟在弯曲杆菌属内, 命名为幽门弯曲杆菌 (*Campylobacter pyloridis*)。由于种名违背了国际细菌命名法的法规, Marshall 于 1987 年修订了名称, 改为 *Campylobacter pylori*<sup>[13]</sup>。虽然按其某些性状和 DNA 中 G+C 的含量, 它较接近于弯曲杆菌属的细菌, 但它又有一些与弯曲杆菌属的其它种不同的独特性状。幽门弯曲杆菌胞壁光滑, 极生鞭毛带鞘, 鞭毛的末端膨大成类似球形。典型的弯曲杆菌胞壁有皱褶, 鞭毛无鞘, 且末端无类似球状物, 而这种末端类似球状物在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的鞭毛上则已见到<sup>[2,10]</sup>。

Lambert 等还分析出幽门弯曲杆菌和弯曲杆菌属的细菌细胞的脂肪酸组成有差别。弯曲杆菌细胞主要的脂肪酸为十六烷酸 (16:0), 十八烯酸 (18:1) 和十六烯酸 (16:1)。而幽门弯曲杆菌细胞的主要脂肪酸为十四烷酸和顺 11、12 亚甲基十八烷酸 (19:0 $\Delta$ )<sup>[14]</sup>。

呼吸作用的醌类物质也是细菌化学分类法的一个重要指征。幽门弯曲杆菌缺少甲基萘醌类, 而在所有的其他弯曲杆菌中均发现有这种醌类物质<sup>[2]</sup>。

最近 Louis 等对弯曲杆菌属及其有关属种的细菌进行了 16S rRNA 的序列分析。对比的结果表明幽门弯曲杆菌应排除在弯曲杆菌属之外, 而幽门弯曲杆菌与产琥珀酸沃林氏菌 (*Wolinella succinogenes*) 在 rRNA 序列上的符合率为 80.1%。产琥珀酸沃林氏菌是沃林氏菌属 (*Wolinella*) 的模式种。他们认为幽门弯曲杆菌应列入沃林氏菌属内<sup>[15]</sup>。

随着细胞学、分子生物学等方面的深入研究, 现代实验技术方法不断扩大应用于细菌分类学, 可以预见幽门弯曲杆菌分类学的地位必将愈来愈明确。

#### 参 考 文 献

- [1] Warren, J. R. and B. J. Marshall: *Lancet*, 1: 1273—1275, 1983.
- [2] Goodwin C. S. et al.: *J. Clin. Pathol.* 39: 353—365, 1986.
- [3] 张振华等: 中华消化杂志, 5(4): 231—234, 1985.
- [4] Goodwin C. S. et al.: *J. Clin. Pathol.* 38: 1127—1131, 1985.
- [5] Holdeman L. V.; E. P. Cato and W. E. C. Moore.: *Anaerobe Laboratory Manual* 4th ED. 1977.
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 1978.
- [7] 戴自莫: 抗菌素临床应用手册, P. 6—12, 人民卫生出版社, 1986.
- [8] Marmur J.: *J. Mol. Biol.* 3: 208—218, 1961.
- [9] Marmur J. and P. Doty.: *J. Mol. Biol.* 5: 109—118, 1962.
- [10] Krieg N. R. and J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore. 1984.
- [11] Marshall B. J. et al.: *Med. J. Aust.* 142: 439—444, 1985.
- [12] Bolton F. J. et al.: *Lancet*, 1: 1217—1218, 1985.
- [13] Marshall B. J. and C. S. Goodwin.: *Int. J. Syst. Bact.* 37(1): 68, 1987.
- [14] Lambert M. A. et al.: *J. Clin. Microb.* 25: 706—713, 1987.
- [15] Louis M. et al.: *Int. J. Syst. Bact.* 38(2): 190—200, 1988.