

# 溶菌酶——幽门螺旋菌生长的重要因子

王正祥 陈红菊 申厚凤

(扬州大学医学院微生物学教研室, 江苏扬州 225001)

吴 岩

(扬州大学医学院附属医院, 江苏扬州 225001)

**摘要** 对 12 株幽门螺旋菌分离株生长特性研究发现, 12 株幽门螺旋菌分离株的生长繁殖呈溶菌酶依赖性, 这一依赖性在幽门螺旋菌最初几代传代时极为明显。同时发现, 外源溶菌酶有利于幽门螺旋菌维持其独特的菌体形态。因此, 溶菌酶是幽门螺旋菌生长的重要因子。

**关键词** 幽门螺旋菌, 溶菌酶, 依赖性

幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*) 感染已公认是慢性胃炎及消化性溃疡的致病因素并与胃癌发生高度相关<sup>[1, 2]</sup>。 *H. pylori* 分离成功至今已有十三年的历史, 但对其感染的本质、感染长

期化的维持、感染的终止与再感染, 以及我国人

江苏省自然科学基金资助

1996-01-22 收稿

群的高感染率等问题的深入研究不多。*H. pylori* 感染长期化必须克服感染者体内各种不利因素,包括机体的非特异性免疫和特异性免疫。我们在研究 *H. pylori* 生物学特性时发现 *H. pylori* 具有高度抗溶菌酶作用,并进一步发现 *H. pylori* 生长及其菌体形态维持对溶菌酶存在依赖性,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 幽门螺旋菌分离培养

按本室常规进行<sup>[3]</sup>。一般过程为新鲜胃粘膜标本切碎后涂布 Skirrow 血平板,于 35℃, 5.1% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 84.9% N<sub>2</sub> 环境中培养 3~4d。根据菌落特征、菌体形态特征、尿素酶、氧化酶阳性及与 *H. pylori* 特异性单克隆抗体<sup>[4]</sup>的反应性确定为 *H. pylori*,并于-70℃保存<sup>[5]</sup>。

### 1.2 溶菌酶对幽门螺旋菌的作用

#### 1.2.1 溶菌酶对 *H. pylori* 传代的影响

将在 Skirrow 血平板上传代不同代数的 *H. pylori* 分离株在含和不含 0.3mg/ml 溶菌酶 (SABC, 25000u/mg) 的 Skirrow 平板(用经反复冻融的小牛血清代替羊血,下同)上传代,考察溶菌酶对 *H. pylori* 生长的影响。

#### 1.2.2 *H. pylori* 抗溶菌酶能力。

在 Skirrow 培养基中加入 3.0mg/ml,

1.5mg/ml, 0.75mg/ml, 0.375mg/ml, 0.188mg/ml 及 0.094mg/ml 的溶菌酶,接入一定量的 *H. pylori*,观察生长情况。

#### 1.2.3 溶菌酶对 *H. pylori* 形态的影响

在含 0.3mg/ml 溶菌酶及不含溶菌酶的 Skirrow 培养基中接种 *H. pylori* 分离株 YC-11A 于 35℃, 5.1% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 及 84.9% N<sub>2</sub> 中培养 96h,涂片,革兰氏染色镜检,或用铜网醌取少量菌体,醋酸铀染色后透析电镜观察。

## 2 结果

运用标准幽门螺旋菌培养分离方法从 18 份胃粘膜标本中分离获得 12 株 *H. pylori*,经鉴定皆符合 *H. pylori* 所有特征。将其分别编号为 YC-10、YC-11A、YC-13、YC-14、YC-15、YC-16、YC-17、YC-1、YC-3、YC-4、YC-7、YC-8。

12 株 *H. pylori* 分离株在含及不含溶菌酶的 Skirrow 平板上传代结果(表 1),可以看出,溶菌酶对 *H. pylori* 分离菌株的第二、三、四次传代有决定性作用,次代及第三代在无溶菌酶存在时不能生长,在有溶菌酶的培养基上传五代以上,则 12 株 *H. pylori* 的生长均不再需要外补溶菌酶。

表1 12株 *H. pylori* 分离株在含及不含溶菌酶培养基上传代的结果

菌 株	含 0.3mg/ml 溶菌酶				不含溶菌酶				
	第二代	第三代	第四代	第五代及以上	第二代	第三代	第四代	第五代	第 10 代及以上
YC-10	+	+	+	+	-	-	+	+	+
YC-11A	+	+	+	+	-	-	-	+	+
YC-13	+	+	+	+	-	-	-	+	+
YC-14	+	+	+	+	-	-	-	+	+
YC-15	+	+	+	+	-	-	-	+	+
YC-16	+	+	+	+	-	-	-	+	+
YC-17	+	+	+	+	-	-	+	+	+
YC-1	/	/	/	+	/	/	/	/	+
YC-3	/	/	/	+	/	/	/	/	+
YC-4	/	/	/	+	/	/	/	/	+
YC-7	/	/	/	+	/	/	/	+	+
YC-8	/	/	+	+	/	/	-	+	+

+: 生长, -: 不生长, /: 未测试

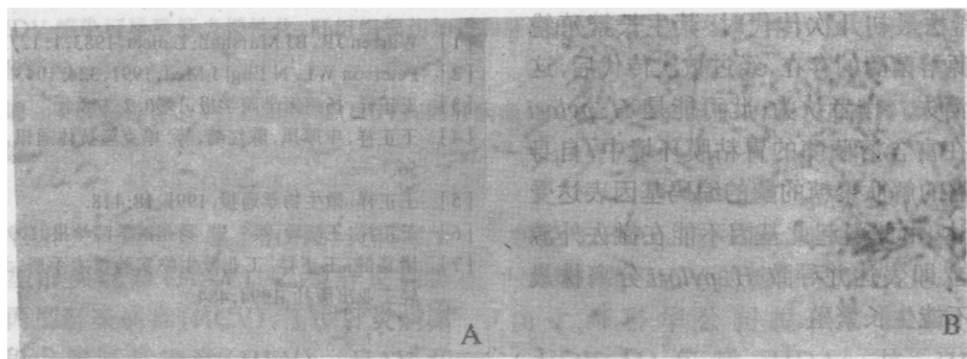


图1 溶菌酶对 *H. pylori* YC-11A 形态的影响(1000×)

A: 生长于含 0.3mg/ml 溶菌酶的平板上 96h; B: 生长于不含溶菌酶的平板上 96h

将 *H. pylori* YC-11A、YC-13、YC-14、YC-15、YC-17 在含不同浓度溶菌酶的平板上进行第三代传代, 5 株分离株对外源溶菌酶的需求量  $< 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

将 *H. pylori* YC-1、YC-7、YC-8、YC-11A 及 YC-13 在含不同浓度溶菌酶的平板上接种, 所试 5 株 *H. pylori* 对溶菌酶具有高度抗性, 抗溶菌酶浓度  $< 3.0 \text{mg}/\text{ml}$ 。

将在含有溶菌酶及不含溶菌酶的平板上生长 96h 的 *H. pylori* YC-11A 经染色进行形态检查, 结果发现在加有溶菌酶的平板上生长的 *H. pylori* YC-11A 与在不加溶菌酶的平板上生长的 YC-11A, 其形态有显著差异(图1), 表现在前者形态十分典型、菌体弯曲明显; 后者弯

*pylori* 形态特征维持上发挥重要作用。图2为 YC-11A 生长于含溶菌酶平板上的透射电镜照片, YC-11A 菌体呈现幽门螺旋菌特征形态, 菌体有两个弯曲, 极端鞭毛生长发育良好。

### 3 讨论

人体组织及体液中含有丰富的溶菌酶, 是构成人体非特异性免疫最重要的体液因子。溶菌酶通过水解细菌细胞壁肽聚糖层中多糖骨架的  $\beta$ -1,4 糖苷键从而破坏细胞壁, 导致细菌因渗透压而死亡。由于  $G^+$  菌与  $G^-$  菌细胞壁组成有显著差异, 因此, 通常认为溶菌酶仅对  $G^+$  菌有杀菌作用。体外试验表明<sup>[6]</sup>, *H. pylori* 对青霉素高度敏感, 而青霉素是依靠抑制细菌细胞壁中肽聚糖合成时的转肽而使肽聚糖合成受限, 最终导致 *H. pylori* 死亡, 从这一点上看, 影响 *H. pylori* 肽聚糖层可导致其死亡。同样, *H. pylori* 在含溶菌酶的培养基上生长, 菌体抗 1% SDS 裂解的性能明显下降, 其影响程度与在培养基中加入 0.5mg/ml D-环丝氨酸的作用相似(未发表资料)。因此, *H. pylori* 对溶菌酶的抗性机理可能是 *H. pylori* 已合成的肽聚糖存在抗溶菌酶的结构。关于这一点, 已有作者在链霉菌、苏云金芽孢杆菌等的原生质体研究中发现<sup>[7]</sup>。

细菌分裂时, 需由自身合成一种解胞壁肽聚糖的酶, 由此酶在细胞壁上解开一个缺口, 也即给予细菌分裂的信号, 由此引发细菌一分为



图2 *H. pylori* YC-11A 透射电镜照片(10000×)  
曲不明显, 大部分为杆状。表明溶菌酶在 *H.*

二。在对 *H. pylori* 分离株的传代研究发现, *H. pylori* 分离株最初几次传代时, 其生长繁殖绝对需要外源溶菌酶的存在, 经过数次传代后, 这种依赖性消失。作者认为, 此可能是 *H. pylori* 长期生存在富含溶菌酶的胃粘膜环境中, 自身分裂所必需的解肽聚糖的酶的编码基因表达受抑或不表达, 由此引起此基因不能在撤去外源溶菌酶后立即表达并导致 *H. pylori* 分离株最初传代时不能生长繁殖。

## 参 考 文 献

- [1] Warren JR, BJ Marshall: Lancet, 1983, 1: 1273.
- [2] Peterson WL: N Engl J Med, 1991, 324: 1043.
- [3] 王正祥. 扬州医学院学报, 1990, 2: 148.
- [4] 王正祥, 申厚凤, 陈红菊, 等. 单克隆抗体通讯, 1994, 10: 56.
- [5] 王正祥. 微生物学通报, 1991, 18: 118.
- [6] 王正祥, 王晓玲, 吴 岩. 扬州医学院学报, 1992, 4: 148.
- [7] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册, 北京: 中国轻工业出版社, 1994, 484.

## LYSOZYME IS AN IMPORTANT FACTOR FOR GROWTH OF *HELICOBACTER PYLORI*

Wang Zhenxiang Chen Hongju Shen Houfeng Wu Ye

(Department of Microbiology, Yangzhou University Medical College, Yangzhou 225001)

**Abstract** This paper reported that the growth of *Helicobacter pylori* depended on lysozyme by analysing the growth properties of 12 strains of *H. pylori* isolated from the gastric mucus. That dependence was remarkable in the first one to three generations. The lysozyme was also benefit to maintain the typical shape of *H. pylori*.

**Key words** *Helicobacter pylori*, Lysozyme, Dependence