

壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素

郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍

郑铁生, 江苏大学医学技术学院 江苏省镇江市 212001
王亚娜, 宗爱萍, 镇江科力生物技术有限公司 江苏省镇江市 212001
高校基金资助项目, No. 2291270004
通讯作者: 郑铁生, 212001, 江苏省镇江市东吴路2号, 江苏大学医学技术学院. jsdxzts@163.com
电话: 0511-5039779 传真: 0511-4438079
收稿日期: 2006-01-25 接受日期: 2006-02-13

***In vitro* action of chitosan against *Helicobacter pylori* and its influential factors**

Tie-Sheng Zheng, Ya-Na Wang, Ai-Ping Zong

Tie-Sheng Zheng, College of Medical Science Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Ya-Na Wang, Ai-Ping Zong, Zhenjiang Koly Biology-Technology Cooperation Limited, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Supported by the Fund for Higher Education, No. 2291270004

Correspondence to: Tie-Sheng Zheng, College of Medical Science Technology, Jiangsu University, 2 Dongwu Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. jsdxzts@163.com

Received: 2006-01-25 Accepted: 2006-02-13

Abstract

AIM: To investigate the *in vitro* action of the chitosans against *Helicobacter pylori* and its influential factor.

METHODS: Stiletto method was used to examine the inhibitory effect of chitosans at different concentrations and pH values on three strains of *H pylori*, including SSI and two other strains isolated from patients. Bacteriostatic test was performed to explore the molecular weight and metal ion on the bacteriostatic activity of chitosans against *H pylori*.

RESULTS: Chitosans had inhibitory effect on all the three kinds of *H pylori* strains, and the effects were not significantly different between the three strains ($P > 0.05$). Within the scopes of pH8.5-5.5, the action of chitosan on *H pylori* strengthened with the lowering of the pH value ($P < 0.01$). Chitosans at different concentrations

had marked difference in suppressing *H pylori* ($P < 0.01$), and the action reached the peak when it is at 40 g/L. As the chitosans weighted less than 400 000 u, the bacteriostatic activity increased first and then decreased, and the chitosan weighing 10-200 000 u had the strongest action, lasting 134 h. The bacteriostatic activity of chitosans decreased with the increase of Na^+ and Mg^{2+} concentrations.

CONCLUSION: Chitosan has inhibitory action against *H pylori in vitro*, and the action is strengthened in acid condition. The weight of chitosans and the concentrations of metal ion can affect the bacteriostatic activity of the chitosans.

Key Words: Chitosan; *Helicobacter pylori*; Bacteriostatic activity

Zheng TS, Wang YN, Zong AP. *In vitro* action of chitosan against *Helicobacter pylori* and its influential factors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10): 993-996

摘要

目的: 研究壳聚糖在体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素, 为临床应用壳聚糖治疗胃病提供实验依据。

方法: 采用打孔法检测不同浓度和不同pH值壳聚糖对*H pylori*标准菌株SSI和两株患者体内分离出的*H pylori*菌株的抑菌作用。并采用抑菌试验探讨不同分子量壳聚糖及金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用的影响。

结果: 壳聚糖对3种*H pylori*菌株均有抑菌作用, 且在3株不同*H pylori*菌株间无差异($P > 0.05$); 在pH8.5-5.5范围内, 随着pH值降低, 壳聚糖的抗*H pylori*作用增强($P < 0.01$); 不同浓度的壳聚糖对*H pylori*的抑菌作用有非常显著差异($P < 0.01$), 在40 g/L时达高峰。壳聚糖分子量在400 ku以内, 随着分子质量的升高, 其抑菌活性为先升高后降低。分子质量为10-200 ku的抗*H pylori*作用最强, 抑菌时间长达134 h。NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响, 且随浓度的增大, 其

背景资料

壳聚糖(chitosan, CTS)是作者从地壳产龙虾壳中提取出的甲壳素经脱乙酰基的产物。这种碱性氨基多糖, 具有天然抗菌活性, 且抗菌广谱, 但对*H pylori*的抑制作用, 未见报道。

■ 研发前沿

*H pylori*与消化系统疾病的关系十分密切,但其耐药菌株的出现使该病的治疗十分困难,是困扰消化内科医生的一个现实问题。因此,探讨治疗*H pylori*新的药物,已成为目前的研究热点。作者应用壳聚糖进行体外抑制*H pylori*实验,取得了较好效果,值得进一步探讨。

抑菌百分率下降。

结论:壳聚糖在体外对*H pylori*有抑菌作用,并且此作用在酸性条件下明显加强。不同分子量壳聚糖及金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用有影响。

关键词:壳聚糖;幽门螺杆菌;抑菌作用

郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍. 壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素. 世界华人消化杂志 2006;14(10):993-996

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/993.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是人类常见的致病菌,他的感染不但与B型胃炎和消化性溃疡的发生密切相关^[1],而且与非溃疡性消化不良,淋巴组织(MALT)淋巴瘤和胃癌等也有重要关系^[2-3]。其致病物质有尿素酶、细胞相关毒素、空泡毒素(VacA)和cag致病岛(cag pathogenicity island, cag PAI)等^[4-5]。在我国胃病是一种严重危害人民健康的常见病、多发病,因此,寻找抗*H pylori*药物,防治各种类型胃病具有重要意义。壳聚糖是一个来源丰富、无毒、可吸收降解的天然氨基葡聚糖,具有广谱的抗菌性能。近年来国内外学者研究发现壳聚糖可抑制大肠杆菌、沙门菌属、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、李斯特单核细胞增生菌、小肠结肠炎耶尔森菌、链球菌、霍乱弧菌、志贺痢疾杆菌、产气单胞菌属及某些真菌的生长^[6-7]。但对*H pylori*抑制作用的报道较少,为此本文研究了壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用,并对其影响因素作了探讨,为临床应用壳聚糖治疗胃病提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 *H pylori*标准菌株 为Sydney Strain I(SS1)*H pylori*标准菌株,江苏大学医学技术学院提供。从十二指肠溃疡患者(*H pylori*_D)和胃溃疡患者(*H pylori*_G)胃窦黏膜分离出的*H pylori*菌两株,由江苏大学附属医院提供。

1.1.2 培养基 空肠弯曲菌选择性琼脂培养基、营养琼脂培养基,由江苏大学附属医院提供。

1.1.3 壳聚糖 不同分子量壳聚糖(M_r 为1-40.2万),脱乙酰度80%-90%,由镇江科力生物技术有限公司提供。

1.2 方法

表 1 不同浓度壳聚糖在不同pH下对*H pylori*的抑菌环($n = 3$, mean \pm SD)

壳聚糖 (g/L)	pH5.5	pH6.5	pH8.5
0	1.42 \pm 0.32	0	0
10	3.32 \pm 0.15	2.15 \pm 0.12	0
20	9.28 \pm 0.22	7.16 \pm 0.16	0
30	14.91 \pm 0.25	11.91 \pm 0.10	1.93 \pm 0.16
40	16.88 \pm 0.26	14.35 \pm 0.13	2.36 \pm 0.27
50	16.86 \pm 0.31	14.33 \pm 0.11	2.42 \pm 0.23
<i>P</i> 值	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.01

3种pH值之间比较*P*<0.01。

表 2 不同浓度壳聚糖在pH5.5时对3株*H pylori*的抑菌环($n = 3$, mean \pm SD)

壳聚糖 (g/L)	SSI	<i>H pylori</i> _D	<i>H pylori</i> _G
0	1.56 \pm 0.25	1.33 \pm 1.8	1.46 \pm 0.28
10	3.28 \pm 0.27	3.26 \pm 0.23	3.29 \pm 0.21
20	9.26 \pm 0.34	9.31 \pm 0.28	9.27 \pm 0.42
30	15.6 \pm 0.45	15.1 \pm 0.52	15.3 \pm 0.38
40	16.9 \pm 0.28	16.3 \pm 0.56	16.4 \pm 0.32
50	16.8 \pm 0.29	16.7 \pm 0.16	16.5 \pm 0.36
<i>P</i> 值	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.01

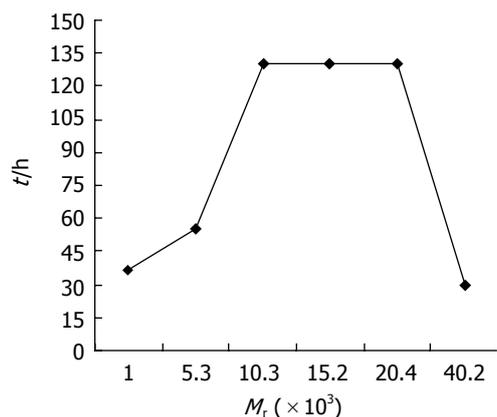
1.2.1 细菌培养 将SSI *H pylori*菌株和患者体内分离出的*H pylori*菌株接种在含75 mL/L无菌羊血的培养基上,微需氧条件下(50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂),37℃培养3 d后,用布氏肉汤洗脱细菌并收集配成含*H pylori*菌 4×10^{12} /L的布氏肉汤。

1.2.2 抑菌试验方法 取直径9 cm培养皿,培养基厚约6 mm,取含*H pylori*菌 4×10^{12} /L的布氏肉汤*H pylori*菌液0.5 mL,均匀涂布于培养基上,待干燥后,采用打孔法在培养基上打直径4 mm孔,分别向各孔加入壳聚糖试验溶液,加入量为加平每孔,对照孔分别加入含相应浓度乙酸的蒸馏水。培养3 d,测量抑菌环直径,每一浓度做3个孔,取平均值。

1.2.3 壳聚糖抑菌试验 称取壳聚糖(M_r 10.3万)干粉适量,分别溶于含10 mL/L、20 mL/L冰乙酸和不含冰乙酸的灭菌蒸馏水中,壳聚糖的浓度分别为10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L。pH分别为8.5、6.5和5.5。放置24 h,待壳聚糖完全溶解后按上述方法试验。另取pH5.5的不同浓度壳聚糖溶液,对上述3株*H pylori*菌悬液用本文方法试验。

2 结果

2.1 不同浓度壳聚糖在不同pH值下的抗*H pylori*

图1 不同分子质量壳聚糖对*H pylori*作用的影响。

作用(表1,2) 壳聚糖在pH5.5时对3株*H pylori*菌株的抑菌作用无差异($P>0.05$). 但不同pH值的壳聚糖溶液的抑菌作用有显著差异($P<0.01$), 进一步行 q 检验发现, 各组之间也有非常显著的差异($P<0.01$), 随着pH值的降低, 壳聚糖的抑菌作用增强. 同样不同浓度的壳聚糖溶液的抑菌作用也有非常显著差异($P<0.01$), 进一步行 q 检验发现, 在pH为6.5和5.5的壳聚糖溶液中浓度为20 g/L、30 g/L、40 g/L的各组之间均有显著性差异($P<0.01$), 随着浓度的增加, 壳聚糖的抑菌作用增强, 但40 g/L以后, 浓度增加, 抑菌作用不再增加($P>0.05$).

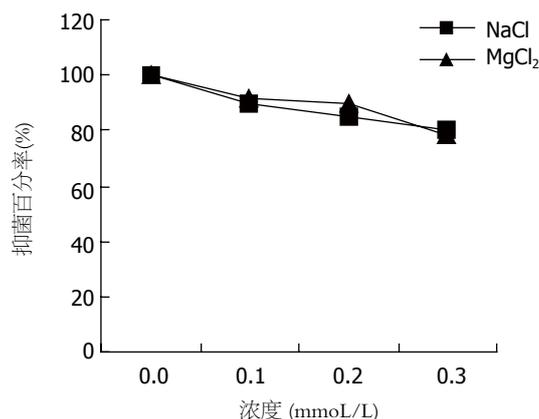
2.2 壳聚糖抗*H pylori*作用的影响因素

2.2.1 不同分子质量壳聚糖对*H pylori*作用的影响

各取 M_r 为1万、5.3万、10.3万、20.4万、40.2万壳聚糖(脱乙酰度为80%-90%)1 g, 溶于1 mL/L乙酸, 且用1 mol/L NaOH溶液或1 mL/L乙酸调至pH5.5(用pH计检测), 定容到100 mL, 分别得不同分子质量的10 g/L壳聚糖溶液. 取此液1 mL, 分别加入熔化并冷却至40℃的营养琼脂培养基(pH 6.0)9 mL, 摇匀凝固制成双碟平板, 使壳聚糖的最终浓度为1 g/L, 然后划线接种*H pylori*菌, 将平板置于37℃恒温箱培养, 分别在19、38、62、86、110、134 h观察菌生长情况, 从是否长菌和抑菌时间上判断抑菌活性的强弱. 由(图1)说明, M_r 在40万以内, 随着壳聚糖分子质量的升高, 壳聚糖的抑菌活性为先升高后降低. M_r 为10-20万时抗*H pylori*作用最强, 抑菌时间长达134 h.

2.2.2 金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用的影响

在pH5.5的40 g/L壳聚糖溶液中分别加入NaCl(A.R)、MgCl₂(A.R), 使其浓度为0.1、0.2、

图2 金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用的影响。

0.3 mmol/L, 作用1 h, 对*H pylori*做抑菌试验. 方法是取等量的菌悬液与待测样品溶液, 置恒温摇床上150 r/min下培养1 h, 混合均匀取一定量混合液在营养琼脂培养基上涂布均匀, 置恒温培养箱中37℃下培养24-48 h, 取出观察各个平板上的细菌生长情况. 计算抑菌百分率, 同时做空白和乙酸(pH 5.5)对照. 由(图2)可知, NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响, 且随浓度的增大, 其抑菌百分率下降.

3 讨论

壳聚糖抑菌作用的研究是近几年才开展的, 已有报道他对许多细菌和真菌有抑制作用^[7]. 本研究发现壳聚糖无论是对*H pylori*的标准菌株, 还是对从临床患者体内分离出的*H pylori*菌株均有一定抑制作用, 提示他对*H pylori*菌有普遍的抑菌作用. 壳聚糖体外对*H pylori*的抑菌作用, 在酸性条件下明显加强, pH为8.5时, 其抑菌作用很弱, pH6.5时抑菌作用增强, 当*H pylori*为5.5时其抑菌作用最强. 同样壳聚糖的抑菌作用也需要一定的浓度, 在酸性条件下从20 g/L到40 g/L随着浓度的增加抑菌作用增强, 但浓度增加到40 g/L以后, 抑菌作用不再增强, 当浓度为30 g/L时抑菌环直径已达15 mm, 表明壳聚糖在pH5.5时, 浓度为30-40 g/L时在体外对*H pylori*菌有较好的抑菌作用(表1,2). 本试验结果还表明, 壳聚糖的抑菌作用与分子质量的大小有关. 低分子质量壳聚糖有一定杀菌作用, 是因为分子质量小, 容易进入细胞壁的空隙结构内, 干扰细胞的新陈代谢, 达到杀菌目的. 高分子质量壳聚糖具有较强的抑菌作用, M_r 为10-20万的壳聚糖抗*H pylori*作用最强, 抑菌时间长达134 h(图1). 其抗

■ 创新盘点

本研究发现壳聚糖在体外对*H pylori*有明显的抑制作用, 且在酸性条件下(pH5.5)明显加强; 不同分子质量壳聚糖对*H pylori*的抑制作用有影响, M_r 在10-20万的壳聚糖抗*H pylori*作用最强; NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响, 且随着浓度的增加, 其抑菌百分率下降.

■应用要点

壳聚糖对*H pylori*有明显抑制作用,且在酸性条件下抑菌效果最好,尤其适应胃内的酸性环境,为临床应用壳聚糖治疗*H pylori*引发的胃病提供了依据。

菌性能可能源于抗菌基团-NH₄⁺,且高分子质量壳聚糖具有成膜特性,能在细胞表面形成足够致密的膜。但NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响,且随浓度的增大,其抑菌百分率下降(图2),应用时需注意。

*H pylori*在体外虽然对多种抗菌药物敏感,但在体内任何一种药物对*H pylori*的根除率均不高,抗菌药不能耐受胃内的酸性环境是其原因之一。壳聚糖在酸性条件下能更好地发挥抗菌作用,他的抗菌机制可能为多聚阳离子与细菌表面的阴离子交联,从而改变细菌膜的渗透性。他除了具有抗菌作用外,还有中和胃酸^[8]、增强抗菌药作用、调节免疫功能^[9]等功效。壳聚糖抑制*H pylori*生长的机理目前尚不清楚,有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Le'Negrato G, Ricci V, Hofman V, Mograbi B, Hofman P, Rossi B. Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the cag pathogenicity island phenotype. *Infect Immun* 2001; 69: 5001-5009
- 2 Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, Neubauer B, Neubauer A, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 2000; 118: 821-828
- 3 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Kitadia Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinic pathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B cell lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 734-739
- 4 Backert S, Schwarz T, Miehlke S, Kirsch C, Sommer C, Kwok T, Gerhard M, Goebel U, Lehn N, Koenig W, Meyer T. Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *J Infect Immun* 2004; 72: 1043-1056
- 5 王华, 邵世和, 李良菊. 幽门螺杆菌cag致病岛的研究进展. *江苏大学学报(医学版)* 2005; 15: 173-177
- 6 湛学军, 熊远珍, 柳喆, 谢大泽. 羧甲基壳聚糖银的合成及抑菌实验的研究. *中国生化药物杂志* 2001; 22: 142-144
- 7 刘碧源, 高仕英. 壳聚糖及其衍生物的抗微生物活性研究进展. *中国生化药物杂志* 2003; 24: 268-270
- 8 万瑞香, 隋忠国, 曹玉. 壳聚糖抑酸功效研究. *海洋科学* 2001; 25: 8-9
- 9 吕中明, 石根勇, 陈新霞, 凌宝银, 张惠菊, 胡启之. 壳聚糖免疫调节作用的研究. *实用预防医学* 2001; 8: 330-332

电编 李琪 编辑 王瑾晖

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

第十届全军普通外科学术会议征文通知

本刊讯 由解放军普通外科专业委员会主办,南京军区福州总医院承办的“第十届全军普通外科学术会议”拟定于2006-07在福州举行.会议采用院士论坛、专题报告等形式,对普通外科近年来的新技术、新方法及发展趋势进行介绍和讨论.欢迎军内外普通外科医师参加会议.

1 征文内容

有关普通外科疾病的诊断、治疗的基础和临床研究及护理内容.

2 征稿要求

- 2.1 要求中文全文(4000字以内)及摘要(500字以内)各1份.稿件请寄软盘(Word 格式),欢迎用电子邮件方式投稿.
- 2.2 来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿,恕不退稿),请在信封左下角注明“会议征文”字样.
- 2.3 来稿请寄: 邮编: 350025 福建省福州市西二球路156号 南京军区福州总医院普通外科 王烈收. 电子邮件地址: www.fzptwk@public.fz.fj.cn 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770.