



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：采用免疫磁珠捕获念珠菌释放的幽门螺杆菌的研究
作者：罗婷婷，孙建超，杨廷秀，许晓丽，崔古贞，罗庆，卓书伟，刘琦，陈峥宏
网络首发日期：2025-12-30
引用格式：罗婷婷，孙建超，杨廷秀，许晓丽，崔古贞，罗庆，卓书伟，刘琦，陈峥宏. 采用免疫磁珠捕获念珠菌释放的幽门螺杆菌的研究[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251229.1925.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

采用免疫磁珠捕获念珠菌释放的幽门螺杆菌的研究

罗婷婷^{1,2}，孙建超²，杨廷秀²，许晓丽^{1,2}，崔古贞²，罗庆³，卓书伟⁴，刘琦¹，陈峥宏²
(¹贵州医科大学附属医院消化内科，贵阳 550004；²贵州医科大学贵州省微生物组与传染性
疾病防控重点实验室，贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室，贵阳 561113；³贵州
医科大学附属肿瘤医院检验科，贵阳 550000；⁴广东省中医院海南医院临床实验室，海口
570203)

摘要 目的 探究幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 特异性基因聚合酶链式反应 (PCR) 阳性的临床分离的胃念珠菌、阴道念珠菌和大便念珠菌释放 *H. pylori* 的能力。**方法** 复苏实验室从临床分离的 4 株 *H. pylori* 特异性 16S rDNA 和 *ureA* 基因 PCR 阳性的念珠菌菌株及白念珠菌标准菌株 ATCC10231 (Ca10231)，通过 PCR 确认 5 株念珠菌菌株 *H. pylori ureA* 基因阳性情况。将上述念珠菌与 *H. pylori* 菌株接种于尿素培养基，于 37 °C 恒温培养箱进行培养，逐日观察培养基的颜色变化，若培养基颜色由黄色变为红色，则具有尿素酶活性。使用包被 *H. pylori* 抗体的磁珠与上述 5 株念珠菌菌株及 *H. pylori* 菌株分别进行共同孵育，通过生物扫描电子显微镜 (SEM) 观察磁珠表面 *H. pylori* 的吸附情况，采用 PCR 检测磁珠上 *H. pylori* 特异性 16S rDNA、*ureA* 基因的阳性情况。**结果** 通过 PCR 检测，4 株临床来源的念珠菌的 *ureA* 基因为阳性，Ca10231 的 *ureA* 基因为阴性。接种临床来源的 4 株念珠菌与 *H. pylori* 菌株的尿素培养基颜色由黄色变为红色，而接种 Ca10231 的培养基未变色，表明这 4 株临床来源的念珠菌菌株具有尿素酶活性，而 Ca10231 不具有尿素酶活性。通过 SEM 可观察到，与 4 株临床来源的念珠菌及 *H. pylori* 共同孵育后的磁珠表面都附着有 *H. pylori*，其中与 1 株阴道念珠菌和 1 株胃念珠菌及 *H. pylori* 共同孵育的磁珠，经 PCR 检测，*H. pylori* 16S rDNA、*ureA* 基因均为阳性；与另 2 株念珠菌共同孵育的磁珠，PCR 为阴性。**结论** 部分 *H. pylori* 特异性基因阳性的念珠菌可以释放出 *H. pylori*。

关键词 幽门螺杆菌；念珠菌；*ureA* 基因；免疫磁珠分离法；扫描电子显微镜；尿素酶

中图分类号 R 378；R 379.4

文献标志码 A

Study on the capture of *Helicobacter pylori* released from *Candida* using

基金项目：国家自然科学基金项目（编号：82260402）；贵州省科技计划项目（编号：黔科合基础-ZK[2022]一般 341、黔科合中引地[2025]024、黔科合平台人才-ZDSYS[2023]004）；国家科技部及教育部“111 计划”项目(编号：D20009)

作者简介：罗婷婷，女，硕士研究生；

陈峥宏，女，博士，教授，博士生导师，通信作者，E-mail: chenzhenghong@gmc.edu.cn；

刘琦，男，博士，主任医师，博士生导师，通信作者，E-mail: gyqiliu6071@sina.com

immunomagnetic bead

Luo Tingting^{1,2}, Sun Jianchao², Yang Tingxiu², Xu Xiaoli^{1,2}, Cui Guzhen², Luo Qing³,

Zhuo Shuwei⁴, Liu Qi¹, Chen Zhenghong²

(¹Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004; ²Guizhou Key Laboratory of Microbio and Infectious Disease Prevention & Control, Guizhou Medical University, Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 561113;

³Department of Clinical Laboratory, the Cancer Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000; ⁴Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine Hainan Hospital, Haikou 570203)

Abstract Objective To investigate the ability of clinically isolated, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-specific gene polymerase chain reaction (PCR)-positive gastric, vaginal, and fecal *Candida* to release *H. pylori*. **Methods** Resuscitate 4 strains of *H. pylori* -specific 16S rDNA and *ureA* gene PCR-positive *Candida* strains isolated in laboratory from clinical sources, including 1 strain of gastric *Candida*, 1 strain of fecal *Candida*, 2 strains of vaginal *Candida* and the standard *Candida albicans* strain ATCC10231 (Ca10231). The presence of *H. pylori*-specific *ureA* in the 5 strains of *Candida* isolates was confirmed by PCR. The aforementioned strains of *Candida* and *H.pylori* were inoculated into urea medium and cultured in a constant temperature incubator at 37 °C. The color change of the medium was observed daily. A change in the medium's color from yellow to red indicated the presence of urease activity. Then, the five strains of *Candida* and *H. pylori* were co-incubated with the magnetic beads coated with *H. pylori* antibodies respectively. Scanning electron microscopy (SEM) was employed to observe the presence of bacilli adsorbed on the surface of the magnetic beads. PCR was used to detect the presence of *H.pylori*-specific 16S rDNA and *ureA* genes on magnetic beads. **Results** The PCR analysis of the *ureA* gene in the four *Candida* isolates was positive, whereas the Ca10231 strain tested negative. Upon culturing the four *Candida* isolates on urea medium, the medium color changed from yellow to red which was determined to be urease positive, while the medium containing Ca10231 remained unchanged, which was urease negative. SEM revealed that bacilli could be observed on the surface of magnetic beads co-incubated with the 4 strains of *Candida* of clinical origin and *H.pylori* isolate. Specifically, PCR testing of the magnetic beads co-incubated with one vaginal *Candida*, one gastric *Candida* and *H.pylori* isolate showed positive results for the 16S rDNA and *ureA* genes of *H. pylori*; however, the PCR tests for the two genes were negative for the magnetic beads co-incubated with the other two *Candida* isolate. **Conclusion** This study demonstrates that *H. pylori*-specific genes *Candida* can release *H. pylori*.

Key words *Helicobacter pylori*; *Candida*; *ureA* gene; immunomagnetic separation; scanning

electron microscopy; urease

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No.82260402); Scientific and Technological Project of Guizhou Province (Nos. ZK [2022] 341, Qiankehe (2025) 024, ZDSYS [2023]004); “111 Plan” Project of Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China and Ministry of Education of the People's Republic of China (No. D20009)

Corresponding authors Chen Zhenghong, E-mail: chenzhenghong@gmc.edu.cn; Liu Qi, E-mail: gyqiliu6071@sina.com

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 全球感染率为 43.9%^[1], 中国 52 个城市的感染率为 27.08%^[2]。念珠菌是一种可定植于健康人体的口腔、胃肠道、阴道和皮肤的酵母菌。通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 可以在一些临床念珠菌内检测到 *H. pylori* 特异性的基因和抗原^[3-8], 且 *H. pylori* 在不利于其生长的条件下更容易进入念珠菌, 并促进其在念珠菌内生存^[9-13]。但是, 目前尚不能从 *H. pylori* 基因和抗原阳性的这些念珠菌内分离培养出 *H. pylori*, 少量文献^[14]采用免疫磁珠分离法捕获到从患者胃黏膜分离得到的念珠菌释放出来的 *H. pylori*。因此, 需要有更多的研究来证实这类念珠菌能释放出 *H. pylori*。本研究采用免疫磁珠分离法结合生物扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM), 观察胃念珠菌、大便念珠菌和阴道念珠菌释放 *H. pylori* 的现象, 为明确念珠菌作为 *H. pylori* 的保菌宿主和传播媒介的可能性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 念珠菌菌株共 5 株, 包括 1 株白念珠菌标准菌株 ATCC10231 (*Candida albicans* ATCC10231, Ca10231) 和 4 株实验室保存的临床来源的 *H. pylori* 特异性基因阳性念珠菌, 其中临床来源的念珠菌包括 1 株胃念珠菌 W49、1 株大便念珠菌 F67 和 2 株阴道念珠菌 J115、H100。菌株念珠菌的分离培养和鉴定参考本课题组发表的文献^[4,8]。临床来源的 4 株念珠菌的信息及来源见表 1。临床来源的这 4 株念珠菌菌株的分离和使用获得了贵州医科大学伦理委员会的批准 (伦理批准文件编号 2022-40 和 2021-141), 并获得样本提供者的知情同意。

H. pylori 菌株获赠于四川大学生命技术学院赵建教授^[15], 大肠埃希菌 ATCC25922 为课题组保存菌株。

表 1 临床来源念珠菌菌株信息

Tab.1 Information of clinically sourced *Candida* strains

<i>Candida</i>	<i>Candida</i> species	Source	GenBank accession number		
			ITS	<i>H. pylori</i> 16S rDNA	<i>H. pylori ureA</i>
J115	<i>Candida albicans</i>	Vaginal discharge	OP824698	ON631242	PRJNA1221135
H100	<i>Candida tropicalis</i>	Vaginal discharge	OP850598	PRJNA122572	PRJNA1221135
F67	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Feces	OQ733328	OQ921403	PRJNA1221135
W49	<i>Candida glabrata</i>	Gastric mucosa	OP850582	PRJNA122572	PRJNA1221135

1.1.2 主要试剂与仪器 沙氏葡萄糖琼脂（Sabouraud dextrose agar，SDA）培养基购自杭州百思生物技术有限公司；哥伦比亚血琼脂基础购自青岛海博生物技术有限公司；达安核酸提取或纯化试剂盒购自广州达安基因股份有限公司；DL2000 DNA marker、2×Hieff® PCR Master Mix 购自上海翌圣生物科技股份有限公司；PCR 上下游引物于上海生工生物工程有限公司合成；*H. pylori* 单克隆抗体购自上海西宝生物科技股份有限公司；Dynabeads™ M-280 Tosylactivated 磁珠购自上海赛默飞世尔科技公司。

SDA 培养基：称取 6.5 g 的 SDA 培养基溶于 100 mL 的去离子水，121 °C 15 min 高压蒸汽灭菌，待培养基冷却至 55 °C 左右，无菌操作加入氯霉素于培养基中使其终浓度为 100 µg/mL，倾注于一次性无菌培养皿，待培养基凝固后，4 °C 保存备用。

鸡蛋哥伦比亚培养基：无菌操作将新鲜鸡蛋黄与无菌 1×PBS 按体积比 1：1 进行配制鸡蛋黄液，备用。称取 3.9 g 哥伦比亚血琼脂基础溶于 100 mL 的去离子水，121 °C 15 min 高压蒸汽灭菌，待培养基冷却至 55 °C 左右，无菌操作加入 12 mL 的鸡蛋黄液，充分混匀后，倾注于一次性无菌培养皿，待培养基凝固后，4 °C 保存备用。

尿素培养基：称取 6.5 g 的 SDA 培养基与 0.001 g 苯酚红溶于 100 mL 的去离子水，121 °C 15 min 高压蒸汽灭菌，待培养基冷却至 55 °C 左右，无菌操作取 5 mL 40% 尿素加入培养基内，充分混匀，将培养基加入摇菌管，4 mL/管，倾斜放置，待培养基凝固后，4 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 念珠菌菌株培养 5 株念珠菌菌株接种于含氯霉素 100 µg/mL 的 SDA 培养基进行复苏及传代培养，于 37 °C 恒温培养箱培养 48 h。

1.2.2 *H. pylori* 菌株培养 *H. pylori* 菌株无菌接种于鸡蛋哥伦比亚培养基进行复苏和传代培养，于 37 °C、10% CO₂ 的培养箱培养 48 h。

1.2.3 念珠菌内 *H. pylori ureA* 基因的检测 采用核酸提取或纯化试剂盒提取 4 株临床来源的念珠菌、Ca10231、*H. pylori* 菌株的基因组 DNA。通过巢氏 PCR 检测念珠菌内 *H. pylori* 特异性 *ureA* 基因，同时以无菌去离子水为空白对照，以 Ca10231 为阴性对照，以 *H. pylori* 为阳性对照。巢氏 PCR 的 2 轮扩增总体系均为 25 μ L，其中 2 $\times$ Hieff[®] PCR Master Mix 为 12.5 μ L，上下游引物各 1 μ L，第 1 轮 DNA 为 2 μ L，第 2 轮 DNA 为第 1 轮 PCR 扩增产物 0.5 μ L，无菌去离子水补足为 25 μ L。将巢氏 PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶扩增。PCR 引物序列、扩增程序、目的片段大小见表 2。

表 2 *H. pylori* 基因 PCR 引物序列、扩增程序、片段大小

Tab.2 PCR primer sequence, amplification procedure, and fragment size of *H.pylori* gene

Gene	Stage of the PCR process	Primers	Sequence (5'-3')	Amplimer size (bp)	Amplification program	Reference				
ure A	First	PylF	CCAGATGATGTG ATGGATGG	607	95 °C for 5 min, 24 cycles of the external amplification reaction (94 °C, 45 s; 50 °C, 45 s; 72 °C, 3 min), 72 °C for 5 min, and a hold at 4 °C 95 °C for 5 min, 34 cycles of the external amplification reaction (94 °C, 45 s; 45 °C, 45 s; 72 °C, 45 s), 72 °C for 5 min, and a hold at 4 °C	[16]				
		PylR	TCAAGTCTGTAT CGCCCAATC							
	Second	HPU1	GCCAATGGTAAA TTAGTT	411						
		HPU2	CTCCTTAATTGT TTTTAC							
		16S rDNA	F				CGTAGGCGGGAT AGTCAGTC	480	94 °C for 5 min, 35 cycles of the external amplification reaction (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 45 s), 72 °C for 5 min, and a hold at 4 °C	The primers designed by our research team
			R				GCAGCACCTGTT TTCAAGGT			

1.2.4 念珠菌尿素酶活性的检测 将临床来源的 4 株念珠菌、Ca10231 及 *H. pylori* 菌株分别接种于尿素培养基上，以不接种任何菌株的尿素培养基为空白对照。其中接种 *H. pylori* 的尿素培养基置于室温下观察培养基由黄色变为红色，作为培养基可有效检测尿素酶活性的对照，其余尿素培养基均置于 37 $^{\circ}$ C 普通培养箱培养，逐日观察培养基颜色变化，评价菌株是否具有尿素酶

活性。当尿素培养基中颜色从黄色变为红色则为接种的菌株具有尿素酶活性。

1.2.5 免疫磁珠分离法捕获念珠菌释放的 *H. pylori*

1.2.5.1 免疫磁珠的制备 参照 Heydari et al^[14]的方法进行磁珠抗体的包被,以大肠埃希菌作为对照,验证磁珠包被抗体的特异性,最终确定 200 倍稀释浓度下的抗体包被磁珠可以较好的吸附 *H. pylori*,而不能够吸附大肠埃希菌。将 *H. pylori* 抗体使用无菌 1×PBS 进行稀释 200 倍,置于冰上备用。取 350 μL 的 Dynabeads™ M-280 Tosylactivated 磁珠悬浮液于无菌 1.5 mL 的 EP 管内,将含磁珠的 EP 管外壁紧贴磁条,室温静置,等待磁珠吸附于 EP 管壁且管内液体澄清,此步骤为磁性分离。弃去上清液,取上述进行 200 倍稀释的 *H. pylori* 抗体 350 μL 加入含磁珠的 EP 管内,轻轻混匀后于室温下手持颠倒 15 min,置于冰上备用。

1.2.5.2 免疫磁珠捕获 *H. pylori* 使用无菌 1×PBS 分别配制浓度为麦氏 0.5 的上述 5 株念珠菌的菌悬液和 *H. pylori* 菌悬液,再使用无菌 1×PBS 将 *H. pylori* 菌悬液进行 10 倍稀释,取各稀释菌液分别进行革兰染色镜检。取 7 个无菌的 1.5 mL EP 管,每个 EP 管内加入 1.2.5.1 项制备的免疫磁珠 50 μL,其中 6 管再分别加入 W49、F67、H100、J115、Ca10231 及 *H. pylori* 的菌悬液各 200 μL,另 1 个加入 200 μL 的无菌 1×PBS 为空白对照;将 7 个 EP 管置于桌面小摇床上于室温 100 r/min 振摇孵育 1 h。将孵育 1 h 后的 7 个 EP 管,进行磁性分离,弃去上清液,分别加入 200 μL 无菌 1×PBS 进行重悬,将重悬液转移至新的无菌 1.5 mL EP 管,再次进行磁性分离,弃去上清液,加入 200 μL 无菌 1×PBS 进行重悬,再次进行磁性分离,弃去上清液,加入无菌 1×PBS 进行重悬,取适量重悬液进行革兰染色,在普通光学显微镜下观察包被 *H. pylori* 抗体的磁珠是否吸附有细菌。

1.2.5.3 SEM 观察免疫磁珠分离结果 将上述制备的与各菌株孵育的免疫磁珠重悬液进行磁性分离,弃去上清液,加入 1.4 mL 的 2.5%戊二醛固定,4 °C 保存。加冰袋运输,送科学指南针平台进行 SEM 检测,观察包被 *H. pylori* 抗体的磁珠是否捕获到杆菌。

1.2.5.4 免疫磁珠重悬液进行 *H. pylori* 特异性基因检测 将上述分别与 5 株念珠菌和 *H. pylori* 孵育的免疫磁珠重悬液及作为空白对照的免疫磁珠,采用全自动核酸提取仪提取其基因组 DNA,进行 PCR 检测 *H. pylori* 的特异性基因 *ureA*、16S rDNA。进行 PCR 扩增时,以无菌去离子水为空白对照、以 Ca10231 为阴性对照、以 *H. pylori* 为阳性对照;其中 *ureA* 的 PCR 扩增同 1.2.3 项;*H. pylori* 16S rDNA 的 PCR 的扩增总体系为 25 μL,其中 2×Hieff® PCR Master Mix 为 12.5 μL,上下游引物各 1 μL, DNA 为 5 μL,无菌去离子水补足为 25 μL。PCR 产物吸取 5 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,将 PCR 扩增阳性产物送至上海生工生物工程有限公司进行序列测定,于 NCBI 进行 BLAST 比对。PCR 引物序列、扩增程序、目的片段大小见表 2。

2 结果

2.1 念珠菌内 *H. pylori* 特异性 *ureA* 基因验证 通过巢氏 PCR 可检测到 4 株临床来源的念珠菌及

阳性对照 *H. pylori* 具有 *ureA* 基因，Ca10231 和空白对照的 *ureA* 基因 PCR 为阴性。见图 1。

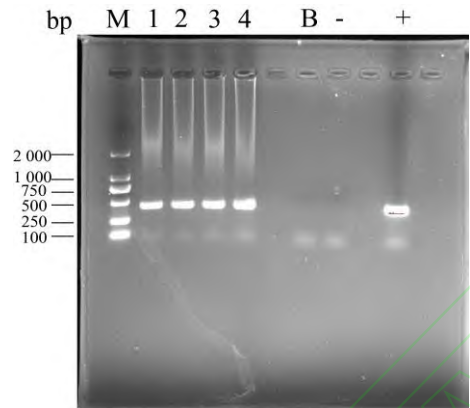


图 1 PCR 检测念珠菌内 *H. pylori ureA* 基因

Fig.1 Detection of *H.pylori ureA* gene in *Candida* by PCR

M: Marker; 1: H100; 2: 115; 3: F67; 4: W49; B: Sterile deionized water; - : Negative control Ca10231; + : Positive control *H.pylori*.

2.2 念珠菌尿素酶活性的检测 接种 *H. pylori* 菌株的尿素培养基在 2 min 内即出现由黄色变为红色，4 h 内培养基完全变为红色，为尿素酶阳性；接种 Ca10231 及空白对照的尿素培养基在培养的第 30 天仍然未由黄色变为红色；接种 W49、H100、J115 及 F67 的尿素培养基分别在培养的第 30 天、第 30 天、第 26 天和第 7 天，颜色由黄色到红色，表明这 4 株临床来源的念珠菌具有尿素酶活性。

2.3 革兰染色镜检观察免疫磁珠分离结果 对上述 5 株念珠菌及 *H. pylori* 与免疫磁珠共同孵育后所得的免疫磁珠复合物进行革兰染色，普通光学显微镜（100 倍油镜）观察，只有作为阳性对照的 *H. pylori* 与免疫磁珠共同孵育后所得的免疫磁珠复合物可观察到有革兰阴性杆菌形态。

2.4 SEM 观察免疫磁珠分离结果 对 4 株临床来源的念珠菌及 *H. pylori* 与免疫磁珠共同孵育后所得的免疫磁珠复合物进行 SEM 检测，可观察到磁珠表面附着有杆菌，见图 2A-2E；Ca10231 与免疫磁珠共同孵育后的免疫磁珠复合物以及作为空白对照的免疫磁珠未观察到磁珠表面附着有杆菌，见图 2F、2G。

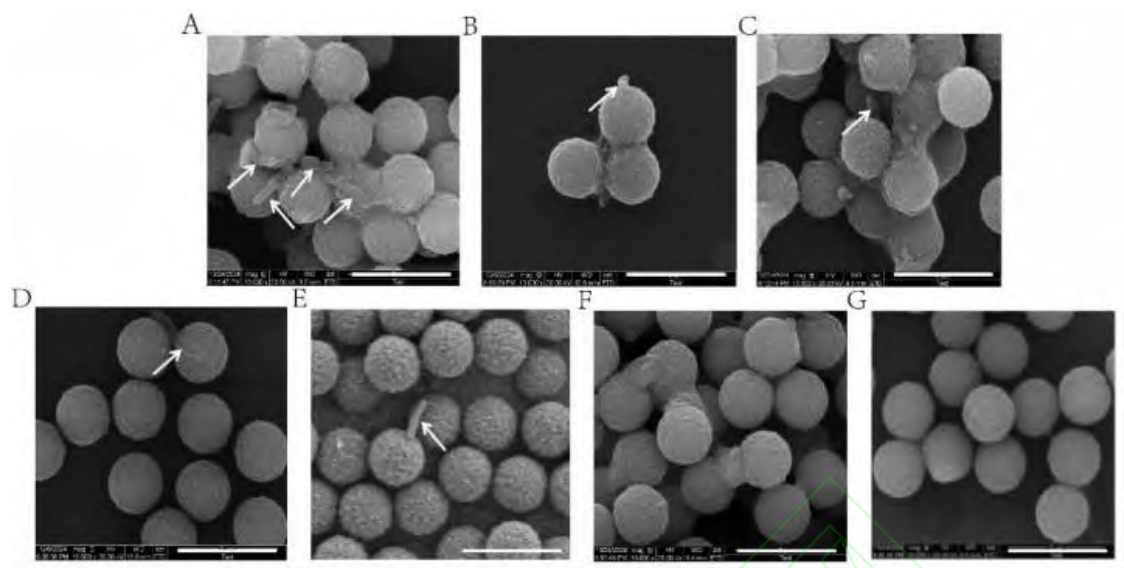


图 2 免疫磁珠捕获的游离 *H. pylori* 的 SEM 照片 $\times 10\,000$

Fig.2 SEM images of immunomagnetic bead-bounded free *H.pylori* $\times 10\,000$

A: Antibody-magnetic beads-*H. pylori*; B: Antibody-magnetic beads-H100; C: Antibody-magnetic beads-J115; D: Antibody-magnetic beads-F67; E: Antibody-magnetic beads-W49; F: Antibody-magnetic beads-Ca10231; G: Antibody-magnetic beads; The spherical morphology is the magnetic bead, the white arrow indicates the bacillary morphology, and the size of the bead is $2.8\,\mu\text{m}$.

2.5 免疫磁珠重悬液进行 *H. pylori* 特异性基因检测结果 通过 PCR 检测, J115、W49 及 *H. pylori* 菌株与免疫磁珠共同孵育后形成的免疫磁珠复合物可检测到 *H. pylori* 特异性 16S *rDNA*、*ureA* 基因, H100、F67、Ca10231 与免疫磁珠共同孵育的免疫磁珠复合物以及作为空白对照的免疫磁珠则未检测到 *H. pylori* 特异性 16S *rDNA*、*ureA* 基因。见图 3。J115、W49 与免疫磁珠共同孵育的免疫磁珠复合物的 PCR 扩增产物的序列均为 *H. pylori* 的序列, 其中 J115 与 *H. pylori* 的 16S *rDNA*、*ureA* 基因的一致性依次为 99.11%、100.00%, W49 与 *H. pylori* 的 16S *rDNA*、*ureA* 基因的一致性依次为 99.33%、98.17%。

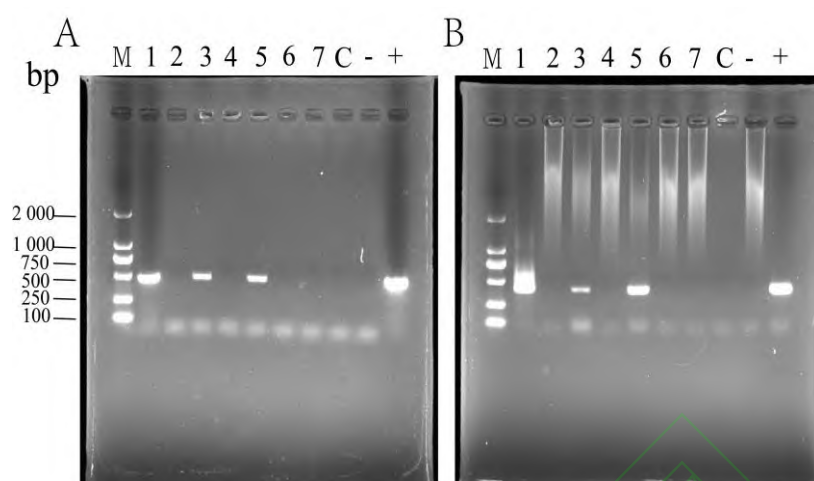


图3 免疫磁珠复合物中存在 *H. pylori* 特异性基因 16S rDNA、*ureA*

Fig.3 *H. pylori*-specific genes 16S rDNA and *ureA* were present in the immunomagnetic bead complex

A: *H. pylori* 16S rDNA gene; B: *H. pylori ureA* gene; M: Marker; 1: Antibody-magnetic beads-*H. pylori* ; 2: Antibody-magnetic beads-H100; 3: Antibody-magnetic beads-J115; 4: Antibody-magnetic beads-F67; 5: Antibody-magnetic beads-W49; 6: Antibody-magnetic beads-Ca10231; 7: Antibody-magnetic beads; C: Sterile deionized water; -: Ca10231; +: *H. pylori*.

3 讨论

H. pylori 感染仍在全球范围内广泛存在，且中国人群的 *H. pylori* 感染率仍较高。研究^[17]表明，2014 到 2023 年期间，*H. pylori* 的感染率在中国西北地区为 51.3%，其中青海省的 *H. pylori* 的感染率高达 60.2%。除此之外，一项关于中国 29 个省份的家庭 *H. pylori* 感染的研究^[18]报道中国的 *H. pylori* 的感染率为 40.66% ，其中家族性 *H. pylori* 感染率最高可达 85.06% 。

念珠菌作为酵母菌的一种，可定植于人以及动物的体表或与外界相通的腔道。有研究^[9-14,19]认为酵母菌可作为 *H. pylori* 的保菌宿主，但少量文献^[14]报道 *H. pylori* 以囊泡或游离菌的形式从念珠菌内释放，且 *H. pylori* 进入念珠菌或者从念珠菌内释放的确切作用机制仍不明确，需要继续深入研究。*H. pylori* 可在不利于其生存的条件下进入酵母菌以逃避抗生素对其的杀灭^[13]，并且阴道念珠菌不仅可检测到 *H. pylori* 的相关毒力基因^[4]，子代的念珠菌序列与其母亲的念珠菌的序列可具有高度同源性^[8]，这表明检测到 *H. pylori* 特异性基因的酵母菌

可能具有致病性, 并且有可能通过阴道念珠菌进行传播^[4,8,9-13,19]。但是, 目前尚不能从 *H. pylori* 基因和抗原阳性的念珠菌内分离培养出 *H. pylori*, 但有文献^[20]报道从酵母菌内分离培养出其他细菌, 例如通过使酵母菌处于饥饿或者衰老的条件下, 从不同的酵母菌内分离培养出葡萄球菌、节杆菌及纤维素单胞菌; 通过使用两性霉素 B 作用于念珠菌细胞, 从念珠菌内分离培养出葡萄球菌^[21]。这表明念珠菌内的细菌可以存活, 并可从念珠菌内释放出来。本课题组也通过利用药物裂解念珠菌、过滤截留法分离培养 *H. pylori* 特异性基因阳性的念珠菌内的 *H. pylori*, 但均未能从念珠菌内分离培养出 *H. pylori*, 原因可能是由于念珠菌内的 *H. pylori* 数量较少, 或者从念珠菌内分离的 *H. pylori* 处于存活但不可培养状态^[22]。

尿素酶是 *H. pylori* 重要的毒力因素, 使其能在胃内极酸环境下生存。念珠菌本无尿素酶活性, 但课题组分离到的 *H. pylori* 基因阳性的阴道念珠菌和粪便念珠菌却具有尿素酶活性, 提示念珠菌内有可能存在具有活性的 *H. pylori*。

本研究通过使用包被有 *H. pylori* 抗体的磁珠, 对具有尿素酶活性的 2 株阴道念珠菌、1 株胃念珠菌及 1 株大便念珠菌释放的 *H. pylori* 进行捕获, 于生物扫描电子显微镜下观察到 4 株念珠菌与免疫磁珠共同孵育后的磁珠表面均附着有杆菌, 且 1 株胃念珠菌与 1 株阴道念珠菌的免疫磁珠复合物通过 PCR 可检测到 *H. pylori* 的特异性基因, 该结果与 Heydari et al^[14] 的结果相同, *H. pylori* 可以以游离菌的形式从念珠菌内释放, 提示念珠菌可以作为 *H. pylori* 的保菌宿主, 在 *H. pylori* 的传播中具有重要意义。但本研究也存在局限性, 2 株 *H. pylori ureA* 基因阳性并且具有尿素酶活性的念珠菌虽然被 *H. pylori* 抗体包被的磁珠捕获到杆菌, 但相应的免疫磁珠并未检测到 *H. pylori* 的特异性基因, 使用 Nano Drop 2000 超微量分光光度计对提取的 DNA 含量进行定量, 未定量成功, 可能提取 DNA 的方法不适用于微量吸附于磁珠上的细菌, 提取的 DNA 浓度过低, 导致 PCR 扩增阴性。虽然国外学者已经证实存在 *H. pylori* 内化念珠菌的现象, 但尚没有对这一类念珠菌进行转录组学、蛋白质组学的相关研究报道, 本课题组对 *H. pylori* 16S rDNA 阳性的念珠菌菌株进行蛋白质组学, 研究表明可以从原始数据中挖掘到 *H. pylori* 的 CagA 蛋白、VacA 蛋白和脲酶不同亚基蛋白, 但丰度值较低; 转录组测序受念珠菌的 RNA 的干扰, 微量的 *H. pylori* RNA 转录也难以检测, 尚存在技术瓶颈, 也是本领域研究需要解决的难题。细菌内化于真菌是近年来的新发现, 念珠菌作为人体正常微生物群的成员之一, 与细菌共生于人体多个组织器官, 有可能作为细菌的保菌宿主, 在细菌感染的传播、潜伏和复发中具有重要意义, 值得进行深入研究。

参考文献

- [1] Chen Y C, Malfertheiner P, Yu H T, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection and incidence of gastric cancer between 1980 and 2022[J]. *Gastroenterology*, 2024, 166(4): 605-19. doi:10.1053/j.gastro.2023.12.022.
- [2] Wang L, Li Z, Tay C Y, et al. Multicentre, cross-sectional surveillance of *Helicobacter pylori* prevalence and antibiotic resistance to clarithromycin and levofloxacin in urban China using the string test coupled with quantitative PCR[J]. *Lancet Microbe*, 2024, 5(6): e512-e513. doi:10.1016/S2666-5247(24)00027-2.
- [3] Saniee P, Siavoshi F, Nikbakht Broujeni G, et al. Immunodetection of *Helicobacter pylori*-specific proteins in oral and gastric *Candida* yeasts[J]. *Arch Iran Med*, 2013, 16(11): 624-30.
- [4] Yang T, Li J, Zhang Y, et al. Intracellular presence of *Helicobacter pylori* antigen and genes within gastric and vaginal *Candida*[J]. *PLoS One*, 2024, 19(2): e0298442. doi:10.1371/journal.pone.0298442.
- [5] Siavoshi F, Salmanian A H, Akbari F, et al. Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast[J]. *Helicobacter*, 2005, 10(4): 318-22. doi:10.1111/j.1523-5378.2005.00319.x.
- [6] Matamala-Valdés L, Sánchez-Alonzo K, Parra C, et al. Detection of intracellular *Helicobacter pylori* in *Candida*. SPP from neonate oral swabs[J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2018, 64(10): 928-35. doi:10.1590/1806-9282.64.10.928.
- [7] Sánchez-Alonzo K, Matamala-Valdés L, Parra-Sepúlveda C, et al. Intracellular presence of *Helicobacter pylori* and its virulence-associated genotypes within the vaginal yeast of term pregnant women[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 131. doi:10.3390/microorganisms9010131.
- [8] Yang T, Zhang Y, Zhang H, et al. Intracellular presence and genetic relationship of *Helicobacter pylori* within neonates' fecal yeasts and their mothers' vaginal yeasts[J]. *Yeast*, 2023, 40(9): 401-13. doi:10.1002/yea.3891.
- [9] Sánchez-Alonzo K, Parra-Sepúlveda C, Vega S, et al. *In vitro* incorporation of *Helicobacter pylori* into *Candida albicans* caused by acidic pH stress[J]. *Pathogens*, 2020, 9(6): 489. doi:10.3390/pathogens9060489.
- [10] Sánchez-Alonzo K, Silva-Mieres F, Arellano-Arriagada L, et al. Nutrient deficiency promotes the entry of *Helicobacter pylori* cells into *Candida* yeast cells[J]. *Biology*, 2021, 10(5): 426. doi:10.3390/biology10050426.

- [11] Sánchez-Alonzo K, Arellano-Arriagada L, Castro-Seriche S, et al. Temperatures outside the optimal range for *Helicobacter pylori* increase its harboring within *Candida* yeast cells[J]. *Biology*, 2021, 10(9): 915. doi:10.3390/biology10090915.
- [12] Sánchez-Alonzo K, Arellano-Arriagada L, Bernasconi H, et al. An anaerobic environment drives the harboring of *Helicobacter pylori* within *Candida* yeast cells[J]. *Biology*, 2022, 11(5): 738. doi:10.3390/biology11050738.
- [13] Sánchez-Alonzo K, Belmar L, Parra-Sepúlveda C, et al. Antibiotics as a stressing factor triggering the harboring of *Helicobacter pylori* J99 within *Candida albicans* ATCC10231[J]. *Pathogens*, 2021, 10(3): 382. doi:10.3390/pathogens10030382.
- [14] Heydari S, Siavoshi F, Jazayeri M H, et al. *Helicobacter pylori* release from yeast as a vesicle-encased or free bacterium[J]. *Helicobacter*, 2020, 25(5): e12725. doi:10.1111/hel.12725.
- [15] Wu D, Cao M, Li N, et al. Effect of trimethylamine N-oxide on inflammation and the gut microbiota in *Helicobacter pylori*-infected mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106026. doi:10.1016/j.intimp.2019.106026.
- [16] Jankowski M, Spużak J, Kubiak K, et al. Detection of gastric *Helicobacter* spp. in stool samples of dogs with gastritis[J]. *Pol J Vet Sci*, 2016, 19(2): 237-43. doi:10.1515/pjvs-2016-0030.
- [17] Xie L, Liu G W, Liu Y N, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in China from 2014-2023: a systematic review and meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30(43): 4636-56. doi:10.3748/wjg.v30.i43.4636.
- [18] Zhou X Z, Lyu N H, Zhu H Y, et al. Large-scale, national, family-based epidemiological study on *Helicobacter pylori* infection in China: the time to change practice for related disease prevention[J]. *Gut*, 2023, 72(5): 855-69. doi:10.1136/gutjnl-2022-328965.
- [19] Chen Z H, Sun J C, Yang T X, et al. Ability of *Helicobacter pylori* to internalize into *Candida*[J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30(16): 2281-4. doi:10.3748/wjg.v30.i16.2281.
- [20] Heydari S, Siavoshi F, Ebrahimi H, et al. Excision of endosymbiotic bacteria from yeast under aging and starvation stresses[J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 78: 104141. doi:10.1016/j.meegid.2019.104141.
- [21] Tavakolian A, Siavoshi F, Eftekhari F. *Candida albicans* release intracellular bacteria when treated with amphotericin B[J]. *Arch Iran Med*, 2018, 21(5): 191-8.
- [22] Cellini L. *Helicobacter pylori*: a chameleon-like approach to life[J]. *World J Gastroenterol*,

2014, 20(19): 5575-82. doi:10.3748/wjg.v20.i19.5575.

