

中華民國第 52 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

040706

生活行為造成胃潰瘍的研究

學校名稱：新北市私立康橋實驗高級中學

作者： 高二 蕭子揚	指導老師： 林哲安
---------------	--------------

關鍵詞：胃潰瘍

摘要

寵物的口腔能成功培養出人類幽門螺旋桿菌。感染比例高低：貓>狗>鳥>馬>雞。活性高低：狗>貓>馬>鳥>雞。

貓的幽門螺旋桿菌會造成胃上皮細胞數量大量減少，狗的幽門螺旋桿菌會造成胃上皮細胞貼附性下降，細胞容易懸浮而造成死亡。不同人種的感染比例，由高到低：阿美族>客家人>閩南人>外省人>滿州人。阿美族口腔中感染胃幽門螺旋桿菌的比例高達 48%。不同性別與口腔感染率沒有正相關。飲用益生菌與單寧酸飲料能有效抑制胃幽門螺旋桿菌的生長。

口腔樣本中幽門螺旋桿菌的活性均大於糞便樣本。顯示口腔為一適合幽門螺旋桿菌存活的環境。所有篩檢出口腔中有幽門螺旋桿菌的患者，均飼養寵物。我們推論：人類胃潰瘍的高盛行率的重要原因來自於寵物傳播模式。

壹、研究動機

根據流行病學的調查，胃潰瘍在台灣社會有平均 50% 的感染率，隨著年齡的增加，感染的情況就越嚴重，平均每歲的感染率，增加 1~2%。七十歲的老年人高達 75~85%。但令人不解的是，它，為何感染率如此高？

我提出一個新的想法：是因為人類和寵物(狗，貓，馬，老鼠，鳥，魚…)間的行為越來越密切。由於現代人類和寵物間時常會有親密的互動：親吻，擁抱，玩耍，分享食物。在互動的過程中，寵物的牙齒、唾液、糞便，會接觸到人類。因此我們想要探討跟寵物互動當下，寵物的幽門螺旋桿菌的會不會跨宿主對人類造成感染。此外我想探討飲用茶和優酪乳，對於幽門螺旋桿菌的活性是否有差異。

貳、研究目的

- 一、從寵物(貓、狗、馬、鼠)的牙齒不同位置刮取牙垢，以及鳥類、魚類的糞便，能不能成功培養出幽門螺旋桿菌。
- 二、探討從寵物身上培養出的幽門螺旋桿菌，對人類的胃上皮細胞是否有感染的效果。
- 三、不同性別、種族的人，口腔環境中是否有幽門螺旋桿菌的存在。若有，其幽門螺旋桿菌的活性是否有差異。
- 四、益生菌是否可以抑制人類幽門螺旋桿菌的活性。
- 五、研究茶中單寧酸成份對於胃幽門螺旋桿菌的抑制力。
- 六、探討茶中單寧酸成份對於胃上皮細胞的影響。

參、研究設備和器材

一、菌種

1. *Helicobacter pylori* BCRC17021
2. *Lactobacillus. salivarius* BCRC14759
3. *Bifidobacteria. bifidum* BCRC14630
4. *Bifidobacteria. longum* BCRC14634
5. *Bifidobacteria. infantis* BCRC14633
6. *Bifidobacteria. adolescentis* BCRC14606

以上均購自財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，新竹，台灣。

二、培養基

1. MRS broth、
2. LB broth
3. 巧克力培養基(Chocolate agar)
4. Brucella broth (BBLB broth) (液態培養幽門螺旋桿菌)
5. RPMI medium

以上培養基均購自Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.

三、藥品

1. 氯化鈉 (Sodium chloride, NaCl)
2. 氫氧化鈉 (Sodium hydroxide, NaOH)
3. 鹽酸(Hydrochloric acid, HCl)
4. 磷酸二氫鈉 (Sodium dihydrogen phosphate, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)
5. 尿素(Urea, NH_2CONH_2)
6. 小牛血清 (SeraPac BF2 donor bovine serum) : 購自South Pacific Sera Ltd, Timaru, New Zealand.
7. 去纖維蛋白綿羊血(Defibrinated sheep blood): 購自宏昇儀器股份有限公司, 台北, 台灣。
8. 幽門螺旋桿菌篩選性補充液
〔*Helicobacter pylori* selective supplement(Dent) SR0147E〕 : 購自Oxoid Ltd, England
9. 脫脂乳粉 (Skim milk) : 購自紐西蘭乳品公司 (New Zealand Milk, Wellington, New Zealand)。
10. 酚紅(Phenol red) : 購自Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.
11. 抗凍劑二甲亞楓(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)
12. PBS buffer
13. Trypsin
14. HP Quick kits
15. Crystal-violet 染劑
16. 75%酒精
17. 單寧酸

四、消耗器材

1. 塑膠培養皿(Plate petri dish): α Plus 90 × 15mm, 購自Alpha Plus Science 公司。
2. 濾紙(Nylon Membrane Filters): Nylaflo 47 mm 0.2 μm , 購自Gelman Sciences

公司, Michigan, U.S.A.。

3. 過濾膜(MF-Millipore MCE Membrane)：MillEX[®] HA Filter unit 0.22 μ m，購自 Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland.
4. BD BBL[™] 微好氧產氣包(BD BBL[™] CampyPak[™] microaerophilic system envelopes)：購自Benex LTD, Ireland.
5. 塑膠注射筒
6. 微量離心管：
7. 培養試管(15ml)
8. 接種環
9. 酒精燈
10. 顯微鏡
11. 微量吸管
12. 棉花棒

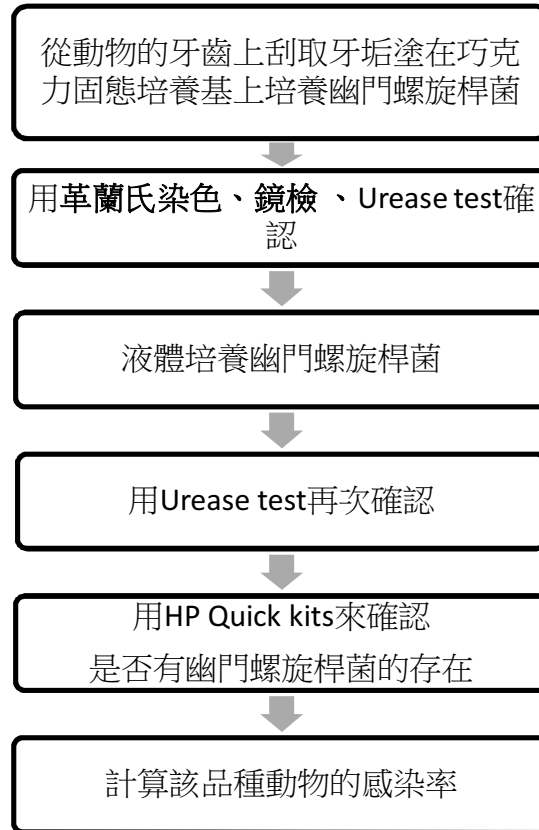
五、儀器設備

1. 菌落計數器(Colony counter)：Suntex, model 560，台北，台灣。
2. 培養箱(Refrigerated incubator)：Firstek, model RI-100，台北，台灣。
3. 水浴振盪槽(Shaker bath)：Firstek, model B602，台北，台灣。
4. 漩渦攪拌器(Vortex mixer)：Thermolyne, type 37600, Dubuque, IA.
5. 高速離心機(Du Pont Sorvall cetrifuge)：
Du pont, model RS5C, Newtown, CT, U.S.A.
6. 烘箱(Drying oven)：OV453型，資民儀器公司，台北，台灣。
7. 迷你離心機(Mini centrifuge)：Model GMC-060, LMS CO., LTD, Tokyo, Japan.
8. 酸鹼測定儀(pH meter)：Model SP-701, Suntex，台北，台灣。
9. BBL[®] 厭氧系統 (BBL[®] GasPak[®] anaerobic system)： Maryland, U.S.A.
10. 高溫殺菌釜(High speed autoclave)：Tomin, TM-328型，台北，台灣。
11. 分光光度計(Spectrophotometer)：Model XL2000, Misonix Co., NY, U.S.A.
12. 細胞記數九宮格(counting chamber)

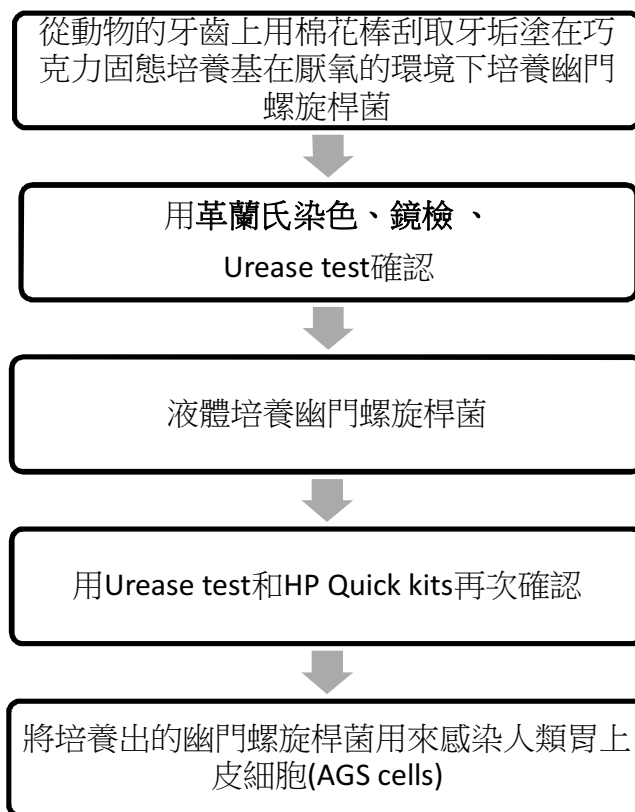
肆、研究過程或方法:

一、實驗流程圖

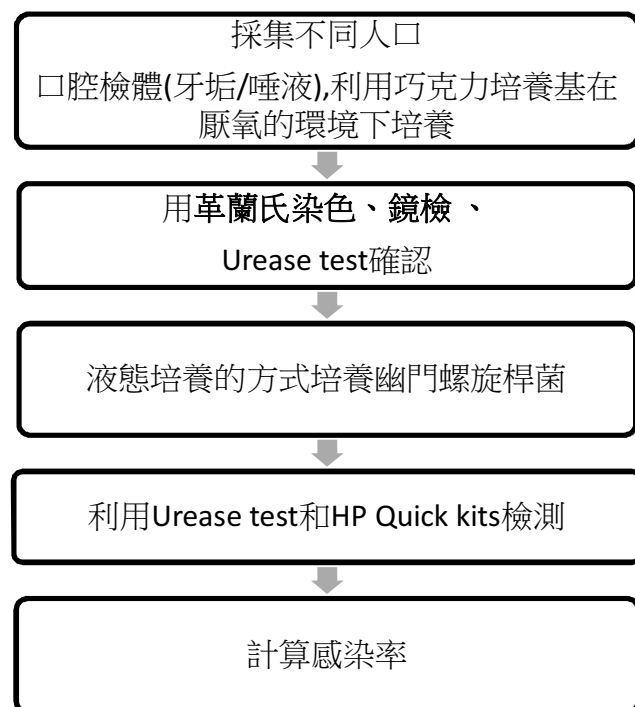
1.從動物的牙齒刮取牙垢來觀察是否有幽門螺旋桿菌的存在。



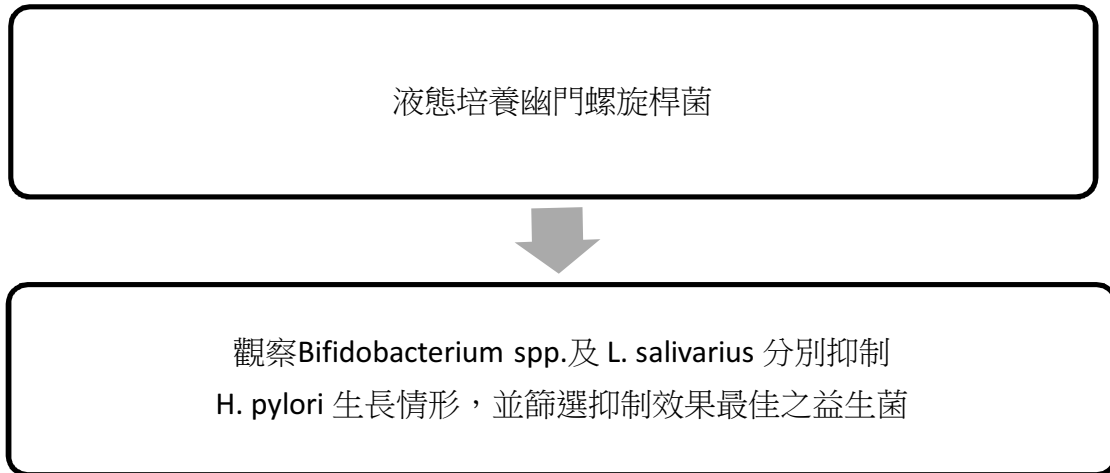
2. 利用從動物牙垢上培養出的幽門螺旋桿菌看是否能感染人類胃上皮細胞(AGS cells)，來實驗寵物身上的幽門螺旋桿菌和人類有無感染互通性。



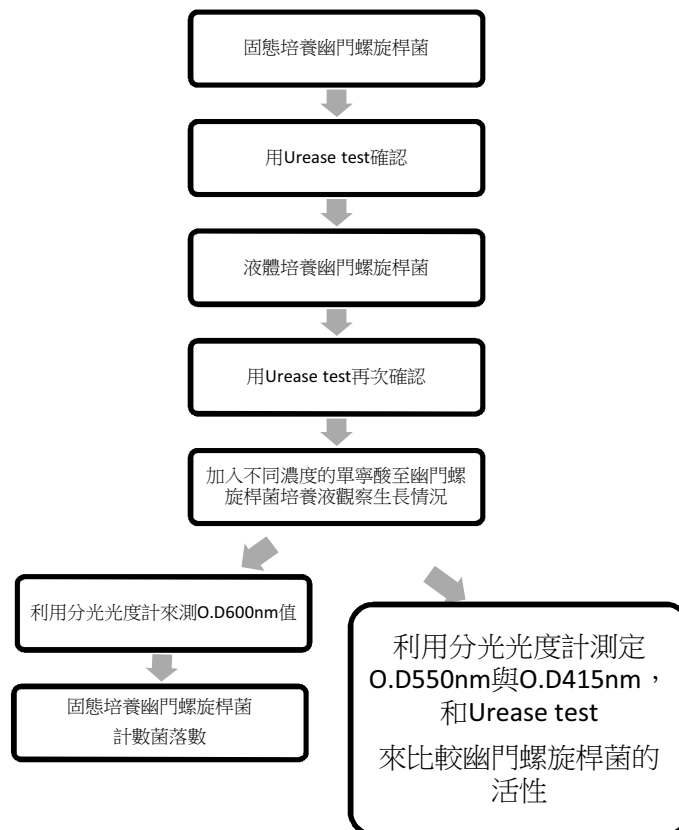
3. 採集不同性別、種族的人，口腔檢體(牙垢/唾液)，觀察在不同種族的口腔環境下幽門螺旋桿菌的活性。



4. 益生菌是否可以抑制人類幽門螺旋桿菌的活性。



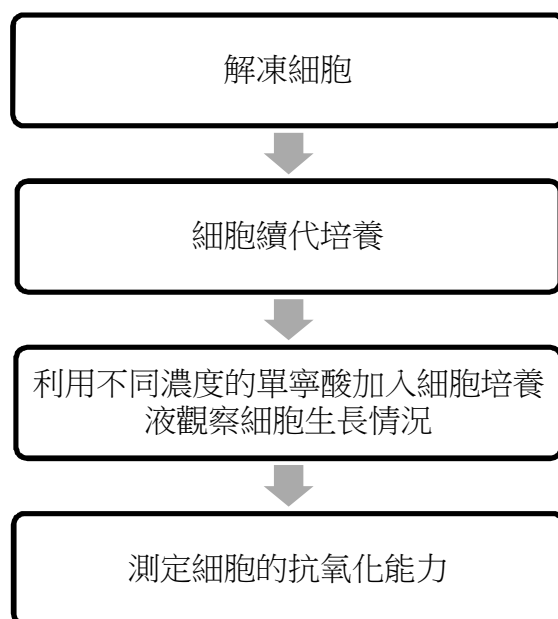
5. 單寧酸是否能抑制幽門螺旋桿菌在培養液體的生長



6.不同濃度的單寧酸是否會造成幽門螺旋桿菌在固態培養基的生長抑制效果



7.單寧酸是否會抑制 AGS(人類胃癌上皮細胞)在培養液體的生長



二.幽門螺旋桿菌標準培養方法

1.固態培養

將存放於-80°C 冰箱中的幽門螺旋桿菌菌種取出，在 37°C 水域中快速解凍，並取出 100 μ l 滴於巧克力培養基上，再以 L 型玻棒均勻塗開菌液直到菌液乾涸為止，之後再將巧克力培養基倒置放於 10%二氧化碳培養箱中培養 3~4 天，即產生扁平帶點透明而似膠狀菌落，此即為幽門螺旋桿菌；再以接種還挑起數個菌落，將細菌於巧克力培養基上用三區劃線法劃開後，倒置放於 10%二氧化碳培養箱中培養 3~4 天，每隔四天接種菌一次以保持菌的活性。幽門螺旋桿菌可用 Urease test 測試。

2.液態培養(小量培養)

將固態培養出約 3-4 天的幽門螺旋桿菌菌落，以接種環掛下數個菌落，並抖落於 15 毫升培養試管中內裝 5 毫升 BBLB 培養液中，另外培養液中亦須加入 100 μ l 的新生小牛血清和 10 μ l 幽門螺旋桿菌篩選液，將培養試管覆蓋緊，至於厭氧缸中，厭氧缸放入厭氧產氣包，封緊厭氧缸並置於 37°C 培養箱中培養 5 天。培養之後用 Urease test 測試幽門螺旋桿菌的活性。

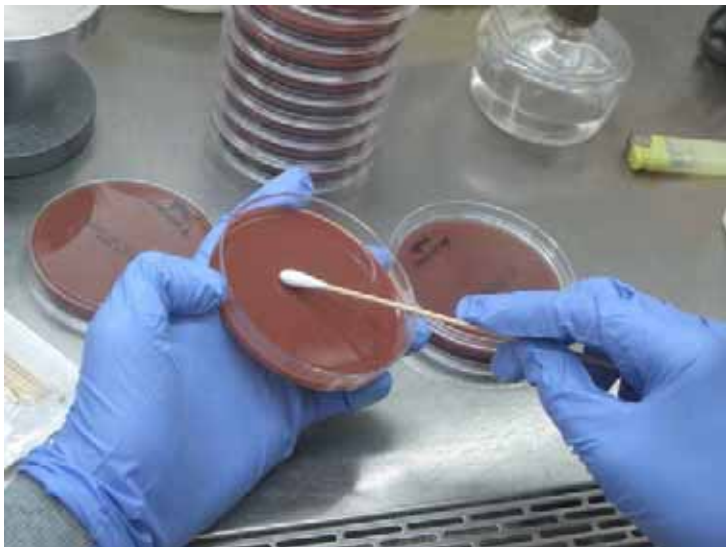
三. AGS 細胞培養方法

當培養皿中細胞生長至 8~9 分滿，則在無菌操作臺內將 RPMI 1640 培養液真空抽掉，加入 10ml 的 PBS buffer 清洗，輕輕的搖晃使 PBS buffer 能夠充分把細胞清洗乾淨，清洗過後將 PBS buffer 真空抽掉，加入 1ml 的胰蛋白酶作用 3 分鐘使細胞從培養基脫落。加入 10ml 的 RPMI 1640 培養液，以 10 ml 吸管重複吸沖培養皿底部，使細胞完全懸浮，接著吸出 3 ml 細胞懸浮液至新的培養皿，再重新加入 7 ml 回溫後的 RPMI 1640 培養液，將培養皿平放並輕輕搖晃，使細胞均勻分布，放入 37°C CO₂ incubator 培養。經過續代培養 3~4 代後，此細胞將可用來進行實驗。

四. 檢體採集&檢測方法

1. 採取動物的牙垢

利用棉花棒在動物的口腔牙齒上輕輕的刮取牙垢，並塗在巧克力培養基上培養在厭氧的環境下觀察是否會長出幽門螺旋桿菌。



2. 採集不同人種的牙垢/唾液

選定 40~50 歲，閩南人、客家人、外省人、阿美族、滿州人，採取牙垢樣本。唾液則先裝在無菌採集瓶中。將牙垢與唾液塗在巧克力培養基上在厭氧的環境下培養。

3. 計算感染率:

篩檢出幽門螺旋桿菌的個數/採集的檢體個數 X 100% = _____ %

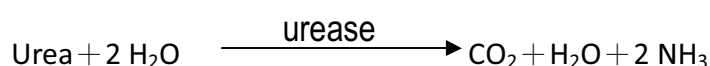
4. 革蘭氏染色、鏡檢

操作過程如下：

- 菌體以接種環塗抹固定於載玻片上。
- 載玻片輕微過火使菌體固定於玻片上。
- 以數滴結晶紫(crystal violet) 進行初染(primary stain)1分鐘。
- 傾去染劑，以水洗去染劑，再用濾紙輕覆玻片表面吸去水分。
- 再滴數滴碘液(iodine solution) ，固定 crystal violet 1分鐘媒染(mordant)。
- 將玻片傾斜，以95% 乙醇脫色，直到流下之乙醇不呈藍色為止。
- 以番紅(safranin)複染(counter stain)15-20秒，傾去染劑，水洗，吸乾。
- 用光學顯微鏡觀察結果。
- 革蘭氏染色陽性為紫藍色，陰性為粉紅色。

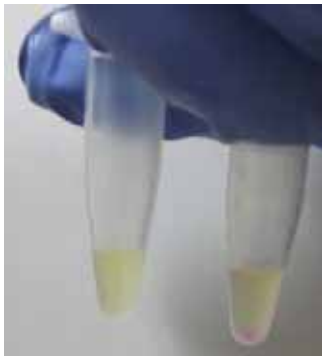
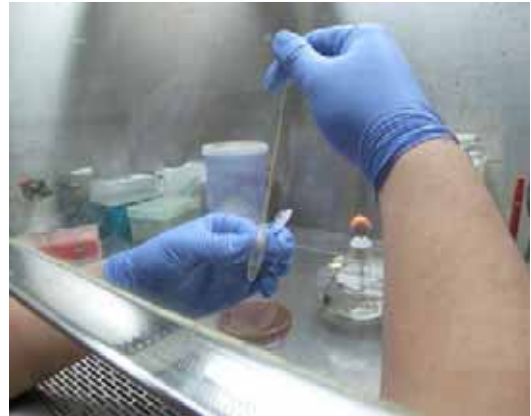
5.利用自製 Urease test 檢測幽門螺旋桿菌

Urease 為一水解酶，可破壞醯胺化物 (amide compound) 中的 C—N 鍵，產生鹼性產物氨 (ammonia)，其反應如下：



而此反應產物可被培養基中的酸鹼指示劑酚紅所測得。若反應發生，因造成鹼性環境，而使酚紅轉變成桃紅色，可知為陽性反應；反之則為陰性反應。

H. pylori 分泌尿素酶代謝尿素產生氨提高 pH 值，利用酚紅指示劑與酸鹼指測定儀，測量培養液顏色變化偵測尿素酶活性。

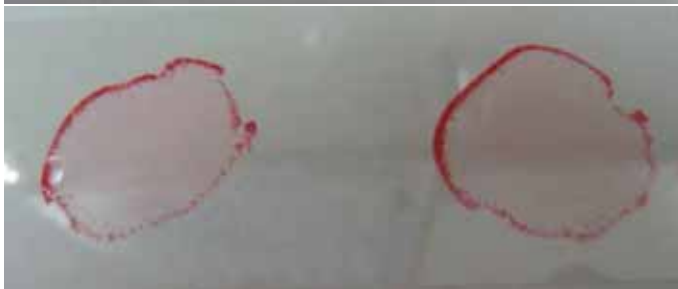


左試管為 **Negative control**，右試管有加入幽門螺旋桿菌。
Urease test 陽性反應會由黃色變成粉紅色。

6.HP Quick kits 檢測幽門螺旋桿菌



兩個皆為陰性反應



兩個皆為陽性反應



左邊為陰性反應
右邊為陽性反應

HP Quick 這個試劑由含有利用幽門螺旋桿菌的抗體結合上的 polystyrene latex beads. 當這個靈敏度和專一度高的 latex beads 和含有幽門螺旋桿菌的菌液體充分混合的話,會形成凝集反應(陽性反應),反之無凝集反應則為陰性反應。

- a.取菌液 20ul +HP quick kits(紅色的) 20ul 在透明投影卡上
- b.混合均勻,並且均勻搖晃 3 分鐘。
- c.若有產生凝集反應,則代表 HP quick 的抗體有和菌液裡面的 HP 菌作用。
- d.若無凝集反應,則代表沒有 HP 菌。

7. Colony-Forming Assay & Crystal-Violet Stain

實驗原理:

Colony-Forming Assay(CFA)是一種常用的活細胞計數法。他是根據細胞在高度稀釋條件下固定在培養基上形成的單個 colony,是由一個單細胞繁殖而成,這一培養特徵設計的計數方法,即一個 colony 代表一個單細胞。計算數量時,根據細胞個數(cells/ml),做 10 倍遞增系列稀釋,製成均勻的系列稀釋液,使細胞均勻分散開,使之呈單個細胞存在(否則一個 colony 就不代表一個細胞)。將稀釋液放進培養皿中,經恆溫培養就會由單個細胞長成 colony。

此外這方法可應用於要找出有抗體或突變的細胞,這樣家特定的試劑就可以得到我們要的細胞。培養時也可順便檢測細胞活性好壞。活性好的細胞會照之前培養數生長(例:培養 100 個細胞經 10 天後長出 90~100 個 colony (誤差最好在 5~10%內)),反之,活性差的細胞其生長的 colony 會較少。

計算方法是細胞經培養 10 天後,用 crystal-violet 染劑染色後,便形成可用肉眼觀察的 colony。然而有時並不能 colony 是完全由單個細胞繁殖而來,因此檢測結果皆是以 colony 數來表達,而不是以活細胞數。

Colony-forming assays 步驟

1. 將 medium,PBS,trypsin 拿去 37°C 水浴槽回溫。
2. 回溫後要用酒精擦過才能放進 hood
3. 將抽氣管打開,插入玻璃 pipet。
4. 將所需器具都放進 hood
5. 準備 3 個培養皿,3 支小離心管(15ml),1 支大離心管(50ml)
6. 先抽 9ml medium 移至小離心管
7. 把養的細胞取出,吸掉 medium,加 10ml 的 PBS 搖晃均勻再吸掉,加 1ml trypsin 均勻搖晃一下,放入 37°C CO₂ incubator 3 分鐘
8. 把培養皿取出,用 pipetting 的方法將細胞沖下來,移至裝有 9ml medium 的離心管
9. 上下搖晃 10 下,吸取 100ul 至 hemocytometer 的 counting chamber 上。拿至顯微鏡下數細胞個數
10. 將數得的細胞數做 10 倍遞增系列稀釋至 100 個細胞為止

11. 之後吸取被稀釋過的細胞懸浮液 10ml 至培養皿
12. 放入 37°C CO₂ incubator 培養(需要培養 10 天)

Crystal-violet 染色步驟

1. 先在水槽放一水盆並裝滿水
2. 將做好的 colony-forming assays 的細胞培養皿取出
3. 倒掉 medium，並倒入 PBS 讓細胞固定在上面
4. PBS 要均勻搖晃，之後把 PBS 倒掉(repeat 2 次)
5. 倒入 crystal-violet 染劑染色 5mins
6. 5 min 後將染劑倒回裝染劑的容器
7. 將培養皿表面擦乾，數上面的 colony 數
8. 數完後將培養皿晾乾，做試驗討論之用

五、添加單寧酸來培養幽門螺旋桿菌和 AGS 細胞

1. 利用不同濃度的單寧酸來觀察是否能抑制幽門螺旋桿菌在液態培養液的生長情形

首先將單寧酸粉與二次蒸餾水調配至 10mmol。從長滿幽門螺旋桿菌的巧克力培養基上利用接種環刮取菌落，將菌液用滅菌水調配至 0.5 McFarland 標準濃度(1.2ml)。實驗設計如下表敘述。

	對照組	實驗組 1	實驗組 2	實驗組 3	實驗組 4	實驗組 5
幽門螺旋桿菌培養液	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
菌液 (McFarland 0.5)	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
單寧酸 (10mmol)	0	10 μ l	20 μ l	30 μ l	40 μ l	50 μ l
單寧酸	0	0.002mmol	0.004mmol	0.006mmol	0.008mmol	0.01mmol

對照組和實驗組皆須做一陰性實驗(沒加菌液, Negative control)來做測吸光值的背景值參考(Blank value)。

(1) 配置好後將培養試管覆蓋緊，至於厭氧缸中，厭氧缸放入厭氧產氣包，封緊厭氧缸並置於 37°C 培養箱中培養 5 天。

(2) 5 天過後將菌液取出 1ml 至 cuvette 用分光光度計測吸光值(O.D. 600nm) 並進行固態培養基的培養以計數其菌落數。

(3) 進行 **Urease Test**，用分光光度計測吸光值(O.D.550nm)與吸光值(O.D. 415nm)。計算其活性。

2.利用不同濃度的單寧酸抑制圈觀察是否會造成幽門螺旋桿菌在固態培養基的生長抑制效果

- (1) 首先將單寧酸粉與二次蒸餾水調配至 10mmol。
- (2) 再序列稀釋 1mmol，0.1mmol，0.01mmol，0.001mmol。
- (3) 將抑制圈紙浸泡各個濃度的單寧酸，然後將抑制圈紙放在長滿幽門螺旋桿菌的巧克力培養基上。
- (4) 在厭氧的培養箱培養 4 天。觀察抑制圈大小。

3.加入不同濃度的單寧酸至細胞培養液觀察 AGS 細胞的生長情形

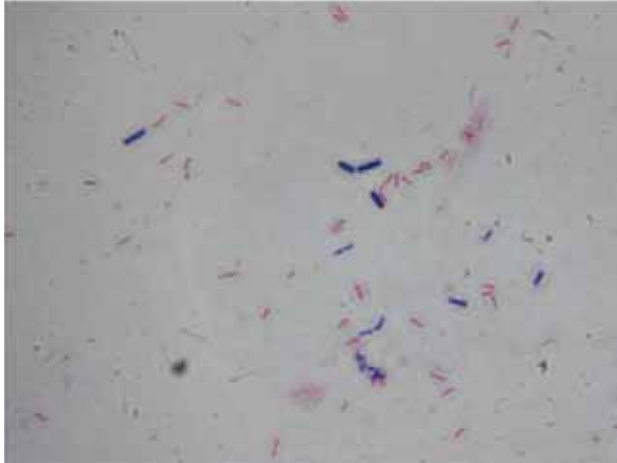
- (1) 首先將單寧酸粉與二次蒸餾水調配至 10mmol。
- (2) 將單寧酸經過 0.2 μ m 的過濾膜，將可能造成污染的細菌過濾。
- (3) 之後從 37°C CO₂ incubator 取出培養好的 AGS 細胞。用真空抽氣管將 RPMI 1640 培養液吸掉，加 10ml PBS 緩衝溶液清洗細胞，加入 1ml 的胰蛋白酶作用 3 分鐘使細胞從培養基脫落。
- (4) 加入 10ml 的 RPMI 1640 培養液，以 10 ml 吸管重複吸沖培養皿底部，使細胞完全懸浮，將懸浮細胞全部放進 15ml 離心管離心 1200rpm 3 分鐘。
- (5) 吸去上清液，重新加入 RPMI 1640 培養液使細胞懸浮，將細胞液濃度調至 1×10^6 cells/ml。
- (6) 將細胞放進 96 孔培養皿，每一孔都加 2ml 的細胞液，放至 37°C CO₂ incubator 培養觀察細胞的表現。
- (7) 經 24 小時後給予不同濃度的單寧酸處理，經 24、48 及 72 小時後，用血球計數器算各孔盤內的細胞數量，每一藥物濃度處理為四重複。
- (8) 細胞培養於 96 孔洞培養盤中，放至 37°C CO₂ incubator，經 24 小時後給予不同濃度的單寧酸處理。經 24、48 及 72 小時後，參考 Kumi-Diaka 等人 (1999) 之方法。將細胞濃度調整至 2×10^6 /ml，培養三小時後，取控制組及不同處理組之檢體 50 μ l，加入 6 μ l EtBr/AO stain solution，避光培養 5 分鐘，取 10 μ l 到玻片並以螢光顯微鏡 ($\times 1000$ 倍) 觀察，每個檢體觀察 50 個細胞。

實驗設計如下表敘述。

	對照組	實驗組 1	實驗組 2	實驗組 3	實驗組 4	實驗組 5
細胞液 (1×10^6 cells/ml)	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL
單寧酸 10mmol	0	10 μ l	20 μ l	30 μ l	40 μ l	50 μ l
單寧酸	0	0.002mmol	0.004mmol	0.006mmol	0.008mmol	0.01mmol

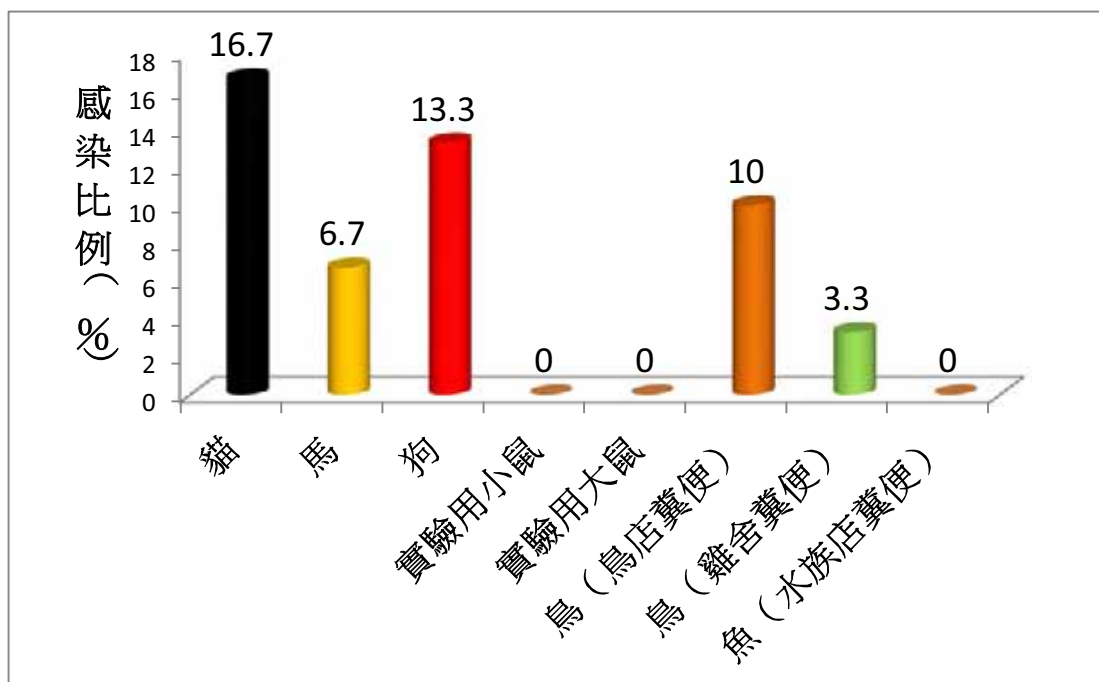
伍、實驗結果:

- 一、 利用革蘭氏染色、鏡檢、HP Quick kits 來檢測，各種動物口腔樣本培養基中，是否有幽門螺旋桿菌的存在。



動物口腔細菌培養的染色結果，兼有革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌的存在

	樣本數	篩出 Hp 菌數	比例 (%)
貓	30	5	16.7
馬	30	2	6.7
狗	30	4	13.3
實驗用小鼠	30	0	0
實驗用大鼠	30	0	0
鳥 (鳥店糞便)	30	3	10
鳥 (雞舍糞便)	30	1	3.3
魚 (水族店糞便)	30	0	0



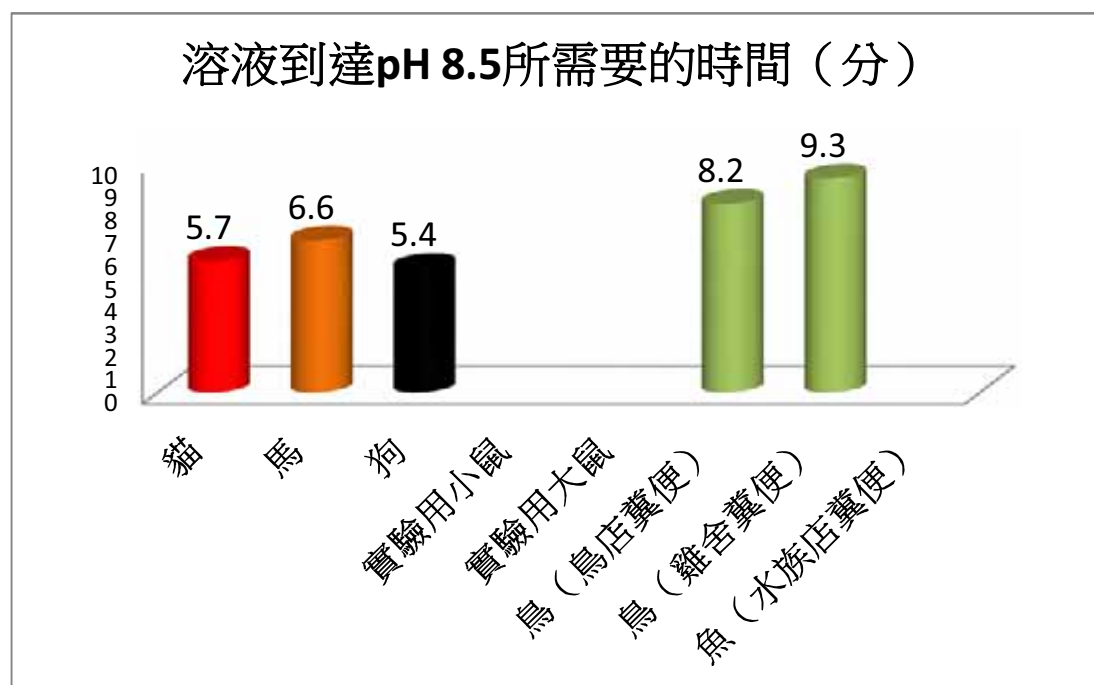
1. 在各種寵物口腔中，感染胃幽門螺旋桿菌比例高到低依序為：
貓>狗>鳥>馬>雞。
2. 實驗用大鼠與小鼠，還有魚糞便中則沒有檢出。

二、 測試幽門螺旋桿菌分泌 Urease 的活性

1.將固態巧克力培養基，液體培養液中的幽門螺旋桿菌，以棉花棒取出進行 Urease Test 的測試觀察其活性。

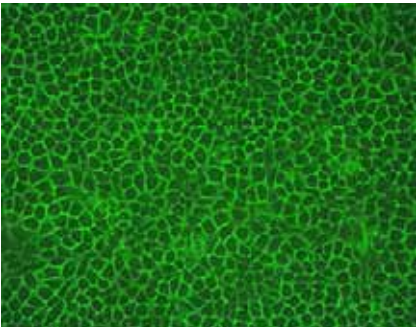
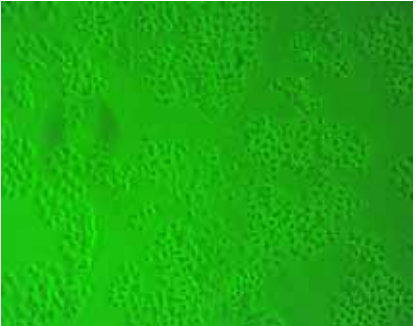
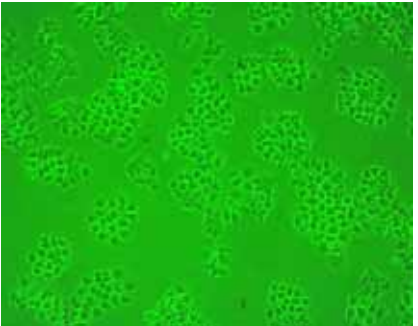
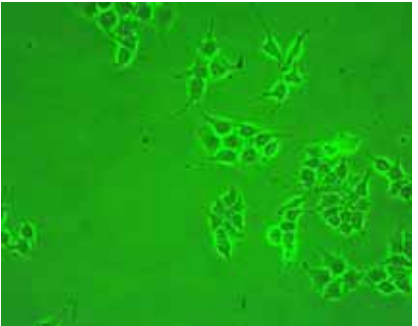
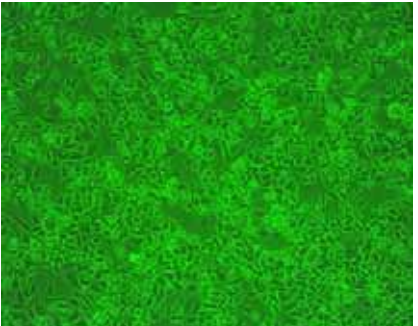
2.量測各組溶液到達 pH 8.5 所需要的時間。(活性測試)

	篩出 Hp 菌數	是否分泌 Urease	溶液到達 pH 8.5 所需要的時間 (分)
貓	5	○	5.7
馬	2	○	6.6
狗	4	○	5.4
實驗用小鼠	0	×	
實驗用大鼠	0	×	
鳥 (鳥店糞便)	3	○	8.2
鳥 (雞舍糞便)	1	○	9.3
魚 (水族店糞便)	0	×	

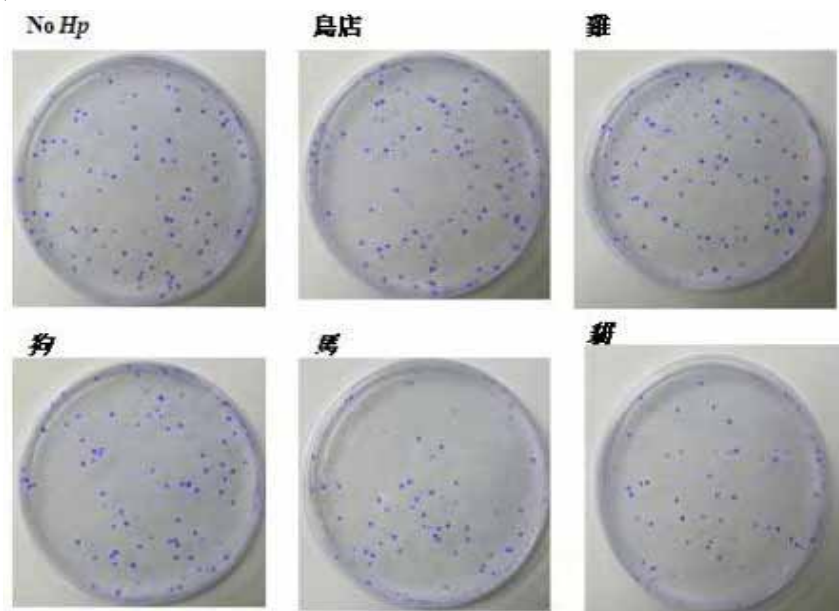


- 1.各種寵物口腔中，胃幽門螺旋桿菌活性高到低依序為：
狗>貓>馬>鳥>雞。
- 2.口腔樣本中幽門螺旋桿菌的活性均大於糞便樣本。顯示口腔的確為一適合幽門螺旋桿菌存活的環境。

三.加入幽門螺旋桿菌看人類胃上皮細胞(AGS)有無型態上的變化

	圖示	說明
對照組		
人 AGS+ 狗 HP		細胞數目減少許多，且細胞貼附性不佳。
人 AGS+ 馬 HP		細胞數目減少許多。且細胞貼附性不佳。
人 AGS+ 貓 HP		細胞數目減少最多，生長情況最差，細胞外型變得尖端。
人 AGS+ 鳥 HP		細胞數目較對照組少。細胞外形變的很圓。

1. 從狗、貓、馬口腔以及鳥糞中培養出來的幽門螺旋桿菌，均能感染人類的胃上皮細胞，造成生長狀況不良（細胞貼附力），數量減少，外型發生改變。
2. 貓的幽門螺旋桿菌，對上皮細胞生長的數量影響最嚴重。
3. 鳥糞中的幽門螺旋桿菌，對上皮細胞生長數量沒有太大影響，可能是因為親緣關係性較遠。



4.

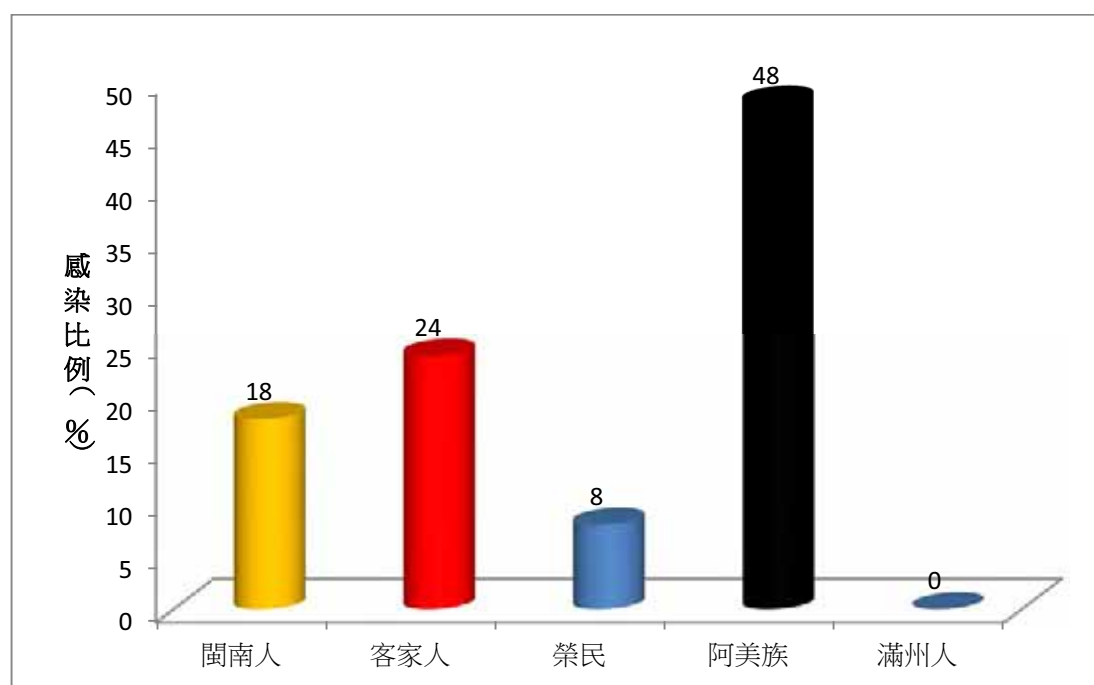
	人 AGS 細胞		
	細胞貼附力	細胞數量減少 嚴重排名	外型發生改變
狗 HP	有影響	3	變圓
馬 HP		2	無影響
貓 HP	無影響	1 最嚴重	變尖
鳥 HP		4	變圓

四、不同人種的感染比例

樣本採自台大牙醫門診病患，年齡 35~40 歲。

滿州人樣本採自於親人。

	樣本數	口腔篩出 Hp 菌數量	口腔感染比例 (%)	男性感染率 (%)	女性感染率 (%)	有飼養 寵物比例
閩南人	50	9	18	55	45	100%
客家人	50	12	24	50	50	
外省人	50	4	8	50	50	
花蓮地區 原住民	50	24	48	46	54	
滿州人	10	0	0	0	0	



1. 不同人種的感染比例，由高到低依序為：

阿美族 > 客家人 > 閩南人 > 外省人 > 滿州人

2. 阿美族人口腔中感染胃幽門螺旋桿菌的比例高達 48%。

表示約 2 名族人就有 1 人感染。

3. 滿州人未檢出感染也可能與樣本數量太少，還有取樣不夠分散有關。

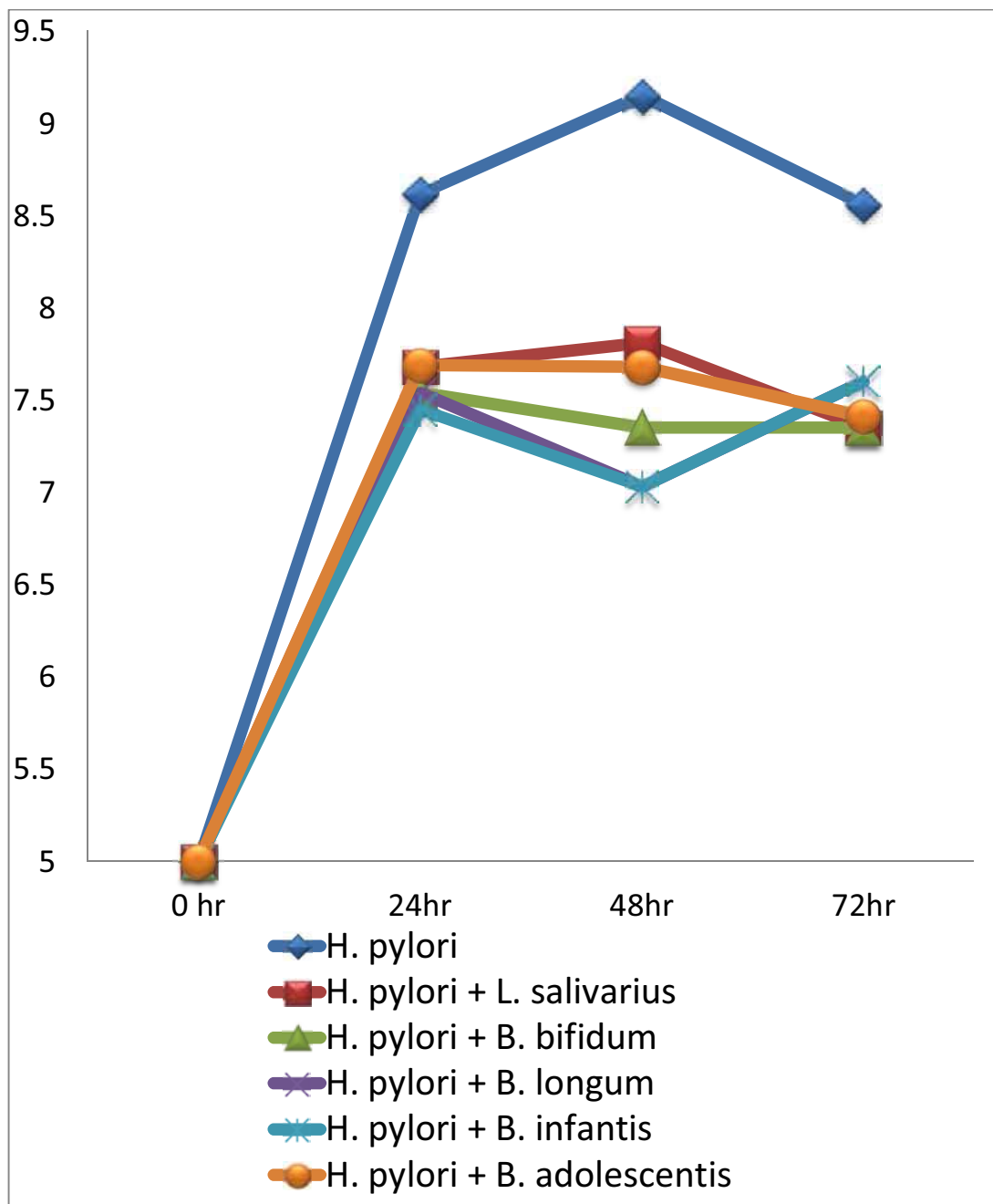
4. 性別與感染率似乎沒有太大正相關，我們還打算做更多採樣。

5. 口腔有篩檢出幽門螺旋桿菌的患者，其飼養寵物的比例竟然高達 100%。

此數據可以支持我們的推論可能為真。

五、益生菌是否可以抑制人類幽門螺旋桿菌的活性。

	<i>H. pylori</i> 菌數 (log CFU/ml)			
	0 hr	24hr	48hr	72hr
<i>H. pylori</i>	5	8.62	9.15	8.56
<i>H. pylori</i> + <i>L. salivarius</i>	5	7.68	7.81	7.35
<i>H. pylori</i> + <i>B. bifidum</i>	5	7.54	7.35	7.35
<i>H. pylori</i> + <i>B. longum</i>	5	7.54	7.03	7.6
<i>H. pylori</i> + <i>B. infantis</i>	5	7.45	7.03	7.6
<i>H. pylori</i> + <i>B. adolescentis</i>	5	7.69	7.68	7.41

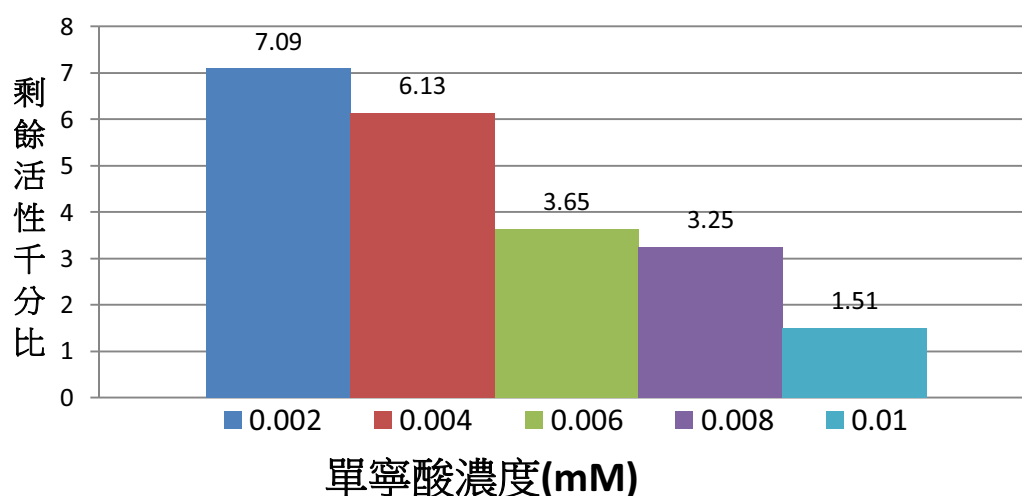


實驗中所加入的益生菌菌種均能有效抑制胃幽門螺旋桿菌的生長。

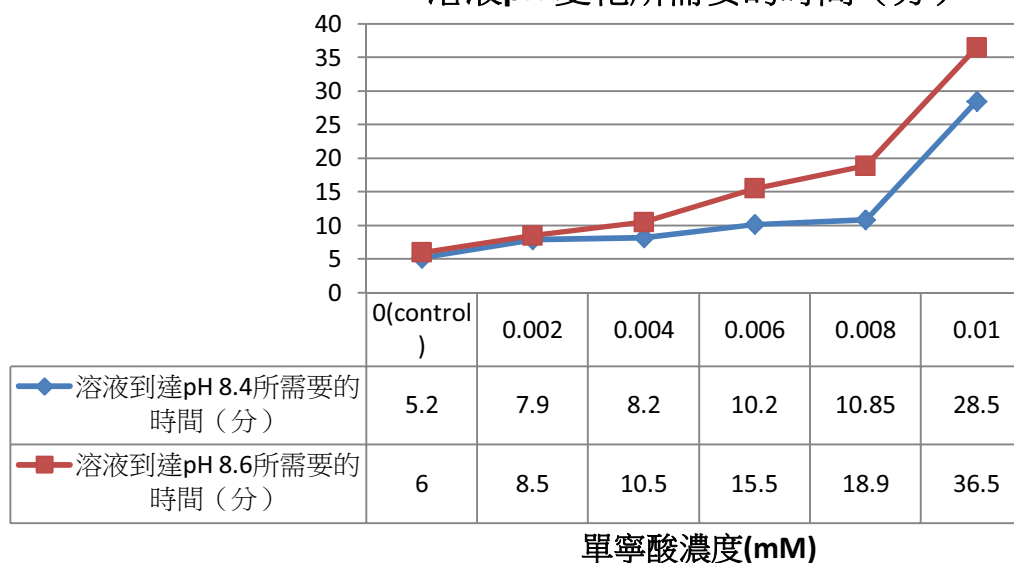
六、加入單寧酸後，用 Urease Test 測試幽門螺旋桿菌活性

組別	單寧酸濃度 (mM)	O.D. 415nm	O.D. 550nm	Ratio (OD550/OD415)	剩餘活性 千分比 (‰)
對照組	0	0.02	0.89	44.5	1000
實驗組	0.002	0.76	0.24	0.3157	7.09
	0.004	0.77	0.21	0.2727	6.13
	0.006	0.80	0.13	0.1625	3.65
	0.008	0.83	0.12	0.1446	3.25
	0.01	0.89	0.06	0.0674	1.51

不同單寧酸濃度對幽門螺旋桿菌酵素活性的影響



溶液pH 變化所需要的時間 (分)



由數據可知：0.002 毫莫耳濃度的單寧酸已經足以抑制幽門螺旋桿菌的 urease 活性。濃度越高，抑制效果越明顯。

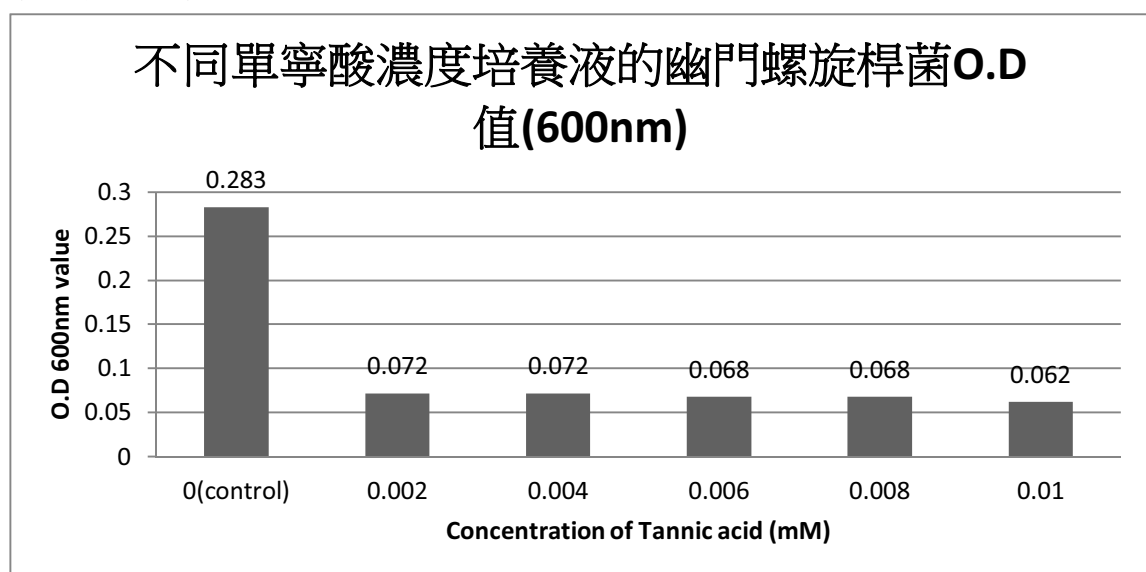
七、不同單寧酸濃度至培養液的幽門螺旋桿菌用分光光度計測 O.D 值(600nm)

第一次實驗	單寧酸濃度(mM)	吸光值 O.D.600nm
	0(control)	0.244
	0.002	0.07
	0.004	0.07
	0.006	0.068
	0.008	0.068
	0.01	0.06

第二次實驗	單寧酸濃度(mM)	吸光值 O.D.600nm
	0(control)	0.32
	0.002	0.075
	0.004	0.075
	0.006	0.07
	0.008	0.07
	0.01	0.065

第三次實驗	單寧酸濃度(mM)	吸光值 O.D.600nm
	0(control)	0.284
	0.002	0.07
	0.004	0.07
	0.006	0.065
	0.008	0.065
	0.01	0.06

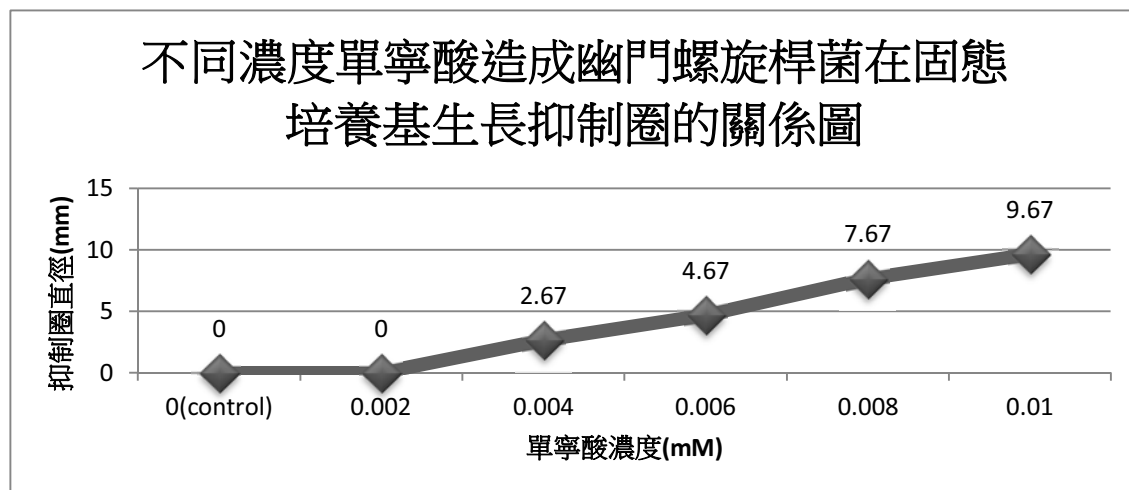
平均數據統計圖表:



由數據可知：

1. 0.002mM 的單寧酸已經足以抑制幽門螺旋桿菌的生長。
2. 0.006 mM 的單寧酸抑制效果最明顯。

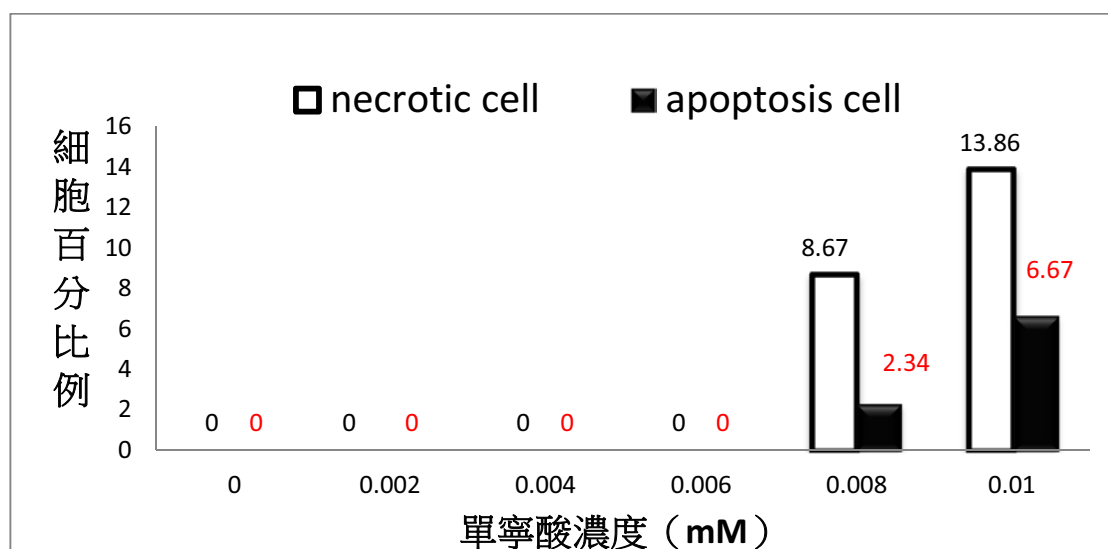
八、利用不同濃度的單寧酸抑制圈觀察是否會造成幽門螺旋桿菌在固態培養基的生長抑制效果



在固態培養基上，單寧酸濃度越高，造成幽門螺旋桿菌抑制圈的範圍也越大。

九、加入不同濃度的單寧酸是否會影響細胞的存活率？

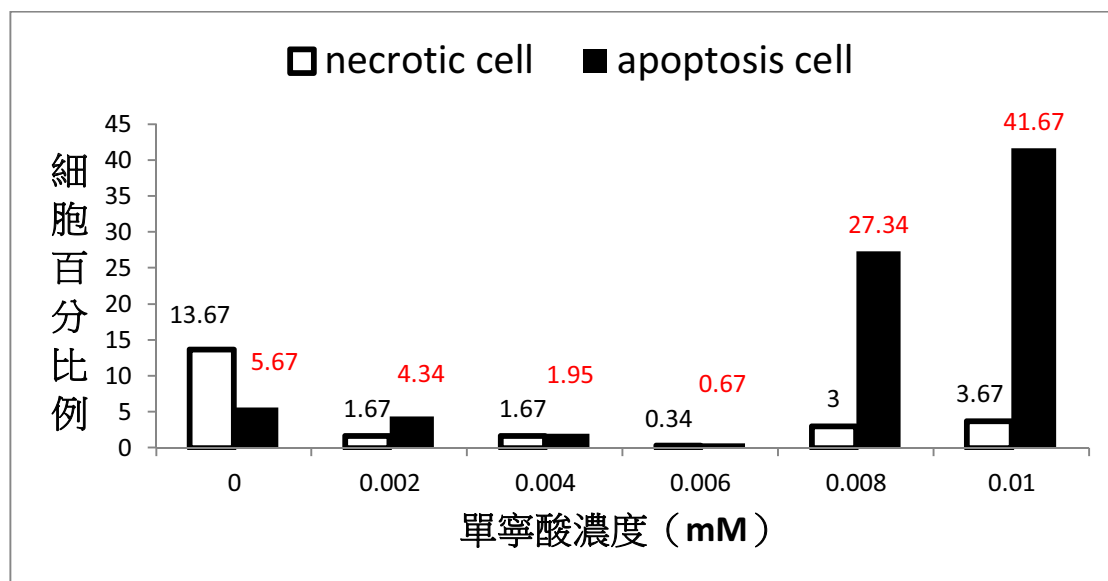
以EtBr/AO 染色並在×1000 倍螢光顯微鏡下觀察，依據發出的螢光顏色及染色質結構可判斷存活、壞死或凋亡細胞。



添加不同單寧酸濃度對於 AGC 細胞壞死與凋亡之影響。黑色長條為壞死細胞比例，白色長條為凋亡細胞比例。所有數據均以 Mean ± SE 表示，並以 Duncan' s test 統計分析，p < 0.05

於正常環境下

1. 0-0.006mM 的單寧酸不會造成細胞死亡與凋亡。
2. 0.008-0.01mM 的單寧酸會造成細胞死亡與凋亡。
3. 0.008mM 的單寧酸總計引起約 10%的細胞壞死。
4. 0.01mM 的單寧酸總計引起約 20%的細胞壞死。



添加不同單寧酸濃度，對於幽門螺旋桿菌環境下的 AGC 細胞，壞死與凋亡之影響。黑色長條為壞死細胞比例，白色長條為凋亡細胞比例。所有數據均以 Mean \pm SE 表示，並以 Duncan's test 統計分析， $p < 0.05$

於有幽門螺旋桿菌環境下

1. 0.002-0.006mM 的單寧酸可以減少細胞的死亡與凋亡。
2. 0.008 的單寧酸會引發 27.34%的細胞發生凋亡。
3. 0.01mM 的單寧酸總計引起約 41.67%細胞發生凋亡。
4. 0.008-0.01mM 的單寧酸可以減少細胞的死亡。但是會誘發細胞發生凋亡。

陸、結論

- 一、從寵物(貓、狗、馬、鼠)的牙齒不同位置刮取牙垢，以及鳥類、魚類的糞便，能成功培養出幽門螺旋桿菌。實驗用大鼠與小鼠，還有魚糞便中則沒有檢出。
- 二、各種寵物口腔中，感染胃幽門螺旋桿菌比例高到低依序為：貓>狗>鳥>馬>雞。
- 三、各種寵物口腔中，感染胃幽門螺旋桿菌活性高到低依序為：狗>貓>馬>鳥>雞。
- 四、口腔樣本中幽門螺旋桿菌的活性均大於糞便樣本。顯示口腔的確為一適合幽門螺旋桿菌存活的环境。
- 五、從寵物狗、馬、貓身上培養出的幽門螺旋桿菌，對人類的胃上皮細胞確實有感染的效果，細胞外型均發生變化。貓的幽門螺旋桿菌會造成胃上皮細胞數量大量減少，狗的幽門螺旋桿菌會造成胃上皮細胞貼附性下降，細胞容易懸浮而造成死亡。
- 六、鳥糞中的幽門螺旋桿菌，對上皮細胞生長數量沒有太大影響，可能是因為其親緣關係性較遠。
- 七、不同人種的感染比例，由高到低依序為：阿美族>客家人>閩南人>外省人>滿州人。阿美族口腔中感染胃幽門螺旋桿菌的比例高達 48 %。
不同性別與口腔感染率沒有太大正相關。
- 八、所有篩檢出口腔中具有幽門螺旋桿菌的患者，均有飼養寵物。我們推論：人類胃潰瘍的高盛行率的重要原因來自於寵物傳播模式。
- 九、實驗中所加入的益生菌菌種均能有效抑制胃幽門螺旋桿菌的生長。
- 十、茶類的單寧酸對幽門螺旋桿菌有抑制效果。發現單寧酸濃度在 0.002~0.006 mM 時對於幽門螺旋桿菌的酵素活性還有生長速度有 75% 抑制效果。單寧酸濃度在 0.008~0.01 mmole 時對於幽門螺旋桿菌有更高 (78%) 的抑制效果。
- 十一、於有幽門螺旋桿菌環境下，0.002-0.006mM 的單寧酸可以減少細胞的死亡與凋亡。0.008 的單寧酸會引發 27.34% 的細胞發生凋亡。0.01mM 的單寧酸總計引起約 41.67% 細胞發生凋亡。0.008-0.01mM 的單寧酸可以減少細胞的死亡。但是會誘發細胞發生凋亡。

柒、參考文獻

1. 吳柏林編譯：醫用微生物學(上冊)。pp.44-45。藝軒圖書出版社。台北。1992。
2. 陳增興：幽門螺旋桿菌。臨床醫學。38(2)，83-90。1996。
3. 許幼如：幽門螺旋桿菌感染的診斷。新藥與臨床。16(2)，97。1997。
4. 黃文貴、陳寶輝、陳潤秋、林光洋、柯富聰、謝瑛璋、張建國、曾禧凰、李龍雄：胃炎、消化性潰瘍與幽門炎曲狀桿菌間之關連。中華微免雜誌。20，148-153。1987。
5. 游金珠：消化性潰瘍元兇-幽門螺旋桿菌。食品工業月刊。31(6)，61-70。1999。
6. Culturing *Helicobacter pylori* from Clinical Specimens: Review of Microbiologic Methods, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 6:616-622 © May 2003 Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia
7. 王見義及康正祥：幽門螺旋桿菌致病機制與治療研究進展。甘肅中醫學院學報。17(4)，36-39。2000。
8. 李威傑、陳楷縻：幽門螺旋桿菌與胃腸道疾病。台灣醫界。37(1)，33-36。1994。
9. 李健、吳麗莉、馮常煒、高也陶、唐芙愛和段芳齡：幽門螺旋桿菌發現簡史。中華醫史雜誌。29，203-206。1999。
10. 杜平華、朱世真、呂品：20種中藥材對幽門螺旋桿菌抑菌體外抗菌活性的研究。中藥材。24，188-189。2001。
11. 吳明賢、王錦堂：幽門螺旋桿菌之微生物學與基礎研究。內科學誌。6，48。1995。
12. 吳柏林編譯：醫用微生物學(上冊)。pp.44-45。藝軒圖書出版社。台北。1992。
13. 苟奎斌、孫麗華、婁自寧、冷傳剛、王炎：大黃中四種蔥醌類化合物抑制幽門螺旋桿菌效果比較。中國醫藥學雜誌。32，278-280。1997。
14. 徐州、周德端、段國勛、王瑛：中藥對幽門螺旋桿菌抑菌作用的實驗研究。中國醫藥學報。8(5)，25-27。1993。
15. 陳增興：幽門螺旋桿菌。臨床醫學。38(2)，83-90。1996。
16. 許幼如：幽門螺旋桿菌感染的診斷。新藥與臨床。16(2)，97。1997。
17. 黃文貴、陳寶輝、陳潤秋、林光洋、柯富聰、謝瑛璋、張建國、曾禧凰、李龍雄：胃炎、消化性潰瘍與幽門炎曲狀桿菌間之關連。中華微免雜誌。20，148-153。1987。
18. 游金珠：消化性潰瘍元兇-幽門螺旋桿菌。食品工業月刊。31(6)，61-70。1999。
19. 楊智欽、林伯儒、王錦堂、陳惟浩、林肇堂、王得宏：胃酸和幽門螺旋桿菌在十二指腸潰瘍自然史中扮演之角色。微免感誌。32，155-162。1999。

【評語】 040706

檢體來源多樣，想找出原因並嘗試找幾種方法，建議：1.可比較不同品種的差別。2.增加組數做統計比較。3.胃潰瘍發生原因多，幽門螺旋桿菌僅為原因之一，可增加其他原因探討。