

## 壳寡糖及其相关衍生物对幽门螺旋杆菌的抑菌作用

林颖珺<sup>1</sup>, 韩尧跃<sup>2</sup>, 栗华<sup>3</sup>, 姜发琴<sup>1\*</sup>, 傅磊<sup>1</sup>, 张倩<sup>2</sup>, 林秀芬<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>上海交通大学药学院 上海 200240)

(<sup>2</sup>厦门蓝湾科技有限公司 福建厦门 361026)

(<sup>3</sup>厦门大学附属第一医院消化内科 福建厦门 361003)

**摘要** 采用打孔方法研究以壳寡糖为代表的益生元对于幽门螺旋杆菌的抑制作用。试验结果显示:不同浓度的壳聚糖、羧甲基壳聚糖未产生抑菌环。壳寡糖 B(脱乙酰度为 94%)在质量浓度为 50 mg/mL 的条件下,所形成的抑菌环半径为(4.1±0.23)mm。在质量浓度为 10 mg/mL 的阳性对照(甲硝唑)条件下,所形成的抑菌环半径为(5.5±0.15)mm。高脱乙酰度的壳寡糖 B(50 mg/mL)与幽门螺旋杆菌共培养后导致菌体生物积累量下降,而壳寡糖 A(50 mg/mL)对其生长无明显影响。质量浓度为 50 mg/mL 的高脱乙酰度壳寡糖 B 具有抑制幽门螺旋杆菌的作用,而壳寡糖 A(脱乙酰度为 80%)、壳聚糖和羧甲基壳聚糖不具有抑制幽门螺旋杆菌的作用。

**关键词** 壳寡糖; 幽门螺旋杆菌; 打孔法; 甲硝唑; 抑菌浓度

**文章编号** 1009-7848(2023)06-0064-07 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.008

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, 简称 Hp)寄生于肠道,是一种螺旋形、微厌氧革兰氏阴性菌。目前感染超过全球 50%以上的人群,与多种胃肠道疾病及胃肠外疾病密切相关,如消化性溃疡、慢性胃炎及胃癌等,被归类为第 1 类致癌物<sup>[1-3]</sup>。

目前幽门螺旋杆菌的治疗方案包括伴同疗法、混合疗法、包含左氧氟沙星的方案<sup>[4]</sup>。频发的抗生素耐药性问题以及临床治愈后的复发率上升让人重新审视幽门螺旋杆菌的治疗方案。2010 年全球幽门螺旋杆菌的复发率呈现地区化分布规律,复发率已达 4.8%,高于 1990 年的 3.9%。幽门螺旋杆菌对克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的耐药率(包括多重耐药率)在 2016 年被发现呈直线上升趋势,其中克拉霉素为 20%~50%,甲硝唑为 40%~70%<sup>[5]</sup>。一线治疗方案如克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑以及质子泵抑制剂联用的治疗方案治愈率有所下滑,其最主要的原因在于克拉霉素的耐药性上升<sup>[6]</sup>。因此临床治疗中常常需要延长临床治疗周期,由此常带来多种胃肠道反应,如恶心、味觉障碍、消化不良、腹痛、腹泻。脑肠同轴理论中指出,胃肠动力受大脑的调节主要表现在两个方面,即

神经传导和内分泌调节<sup>[7]</sup>。过度使用抗生素可能带来的胃肠功能紊乱,肠易激综合征(IBS)以及情绪问题,给人的正常生活带来严重负担。

近年来出现的益生元、益生菌疗法可以很好地解决临床治愈率下降以及副作用等多重问题<sup>[8]</sup>。壳寡糖及其相关化合物是一种以甲壳纲动物为来源的优质益生元,具有出色的生物活性<sup>[9]</sup>。据 Zheng 等<sup>[10]</sup>研究,壳聚糖对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具备抗菌活性,以甲壳纲动物为原料的壳寡糖及其系列产物,被证明具有一定的抑菌效果。壳寡糖被列入我国新食品原料目录,拥有极大的市场应用前景<sup>[11]</sup>。目前国内外益生元抑制幽门螺旋杆菌的报道更多的集中在组合疗法,如抗生素与益生菌结合疗法<sup>[12-13]</sup>,还未见系统性的体外抗菌研究。本次研究中对比研究壳寡糖及其相关产物的体外抗幽效果,希望能够为后续临床抗幽门螺旋杆菌的新型疗法提供参考。

### 1 试验材料

#### 1.1 菌株

幽门螺旋杆菌,编号 GDMCC 1.1820,购自广东省微生物菌种保藏中心,采用冷冻干燥保藏管进行保存。

#### 1.2 主要试剂与耗材

脑心浸液粉,OXOID;哥伦比亚琼脂,环凯微

收稿日期: 2022-06-26

第一作者: 林颖珺,女,博士

通信作者: 姜发琴 E-mail: hanyy@bluebayst.com

生物;无菌脱纤维羊血,南京茂捷微生物;真菌培养皿,BIOFIL;壳聚糖(脱乙酰度>90%),羧甲基壳聚糖,壳寡糖 A,壳寡糖 B。

### 1.3 主要设备与仪器

HL-B 型厌氧工作站,LABIOPHY;HF100 型三气培养箱,力康;STARTER3100 型 pH 计,OHAUS。

## 2 试验方法

### 2.1 主要物料及溶液的制备

2.1.1 主要物料的制备 本次研究试验中所涉及的壳聚糖及壳寡糖、羧甲基壳聚糖均为自主研发制备而成,以阿拉斯加雪蟹壳为主要原料,通过“一步法”制备的高脱乙酰度壳聚糖,然后以反应工艺所获得的壳聚糖,通过复合生物酶法制备的不同脱乙酰度的壳寡糖,并以化学法制备获得的特定聚合度的羧甲基壳聚糖,将直接用于后续抑菌性试验研究。

#### 2.1.2 主要溶液的配制

1) 幽门螺旋杆菌培养基的配制:称取脑心浸液粉 9.6 g、哥伦比亚琼脂 23.4 g,加入蒸馏水 780 mL,100 mL 分装后高压灭菌 15 min,当温度降至 46 °C 时每 100 mL 加入 5 mL 无菌脱纤维羊血,倒板待用。

2) 不同浓度的壳聚糖溶液配制方法如下:壳聚糖溶液(10 mg/mL):称取 0.5 g 壳聚糖粉末,加入 1% 醋酸溶解,定容至 50 mL,测得 pH 值为 4.08,使用 0.22 μm 滤膜进行过滤除菌。5 mg/mL 壳聚糖和 1 mg/mL 壳聚糖溶液以相应倍数进行稀释。壳聚糖溶液(20 mg/mL):称取 1 g 壳聚糖粉末,加入 2% 醋酸溶解,定容至 50 mL。

3) 不同脱乙酰度壳寡糖原料,具体分类如下:根据试验需求,分别取不同种类的壳寡糖原料,配制不同浓度梯度的壳寡糖原料,范围为 1~50 mg/mL,配制方法如下所示:

表 1 不同脱乙酰度的壳寡糖

Table 1 Chitosan oligosaccharide with degree of deacetylation

名称	原料描述
壳寡糖 A	脱乙酰度为 80%
壳寡糖 B	脱乙酰度为 94%

壳寡糖溶液(50 mg/mL):称取 2.5 g 壳寡糖粉末,加入去离子水进行溶解,定容 50 mL,使用 0.22 μm 滤膜进行过滤除菌。

壳寡糖溶液(10 mg/mL):称取 0.5 g 壳寡糖粉末,加入去离子水溶解,定容至 50 mL,测得 pH 值为 5.45,使用 0.22 μm 滤膜进行过滤除菌。5 mg/mL 壳寡糖和 1 mg/mL 壳寡糖溶液以相应倍数进行稀释。

4) 羧甲基壳聚糖溶液(10 mg/mL):称取 0.5 g 羧甲基壳聚糖粉末,加入去离子水溶解,定容至 50 mL,测得 pH 值为 9.65,使用 0.22 μm 滤膜进行过滤除菌。5 mg/mL 羧甲基壳聚糖和 1 mg/mL 羧甲基壳聚糖溶液以相应倍数进行稀释。羧甲基壳聚糖溶液(20 mg/mL):称取 1 g 羧甲基壳聚糖粉末,加入去离子水溶解,定容至 50 mL。

5) 甲硝唑溶液(10 mg/mL):称取 0.2 g 甲硝唑,加入 1% 醋酸进行溶解,定容至 20 mL。

### 2.2 体外抑菌试验检测壳寡糖及其衍生物抑制幽门螺旋杆菌

根据周蓉等<sup>[15]</sup>改进的体外抑菌性研究方法,以 2.1 节中配置的溶液为试验组,研究在不同浓度下的壳寡糖、壳聚糖以及羧甲基壳聚糖的体外抗幽门螺旋杆菌的作用,阳性对照为甲硝唑溶液,阴性对照组为无菌 ddH<sub>2</sub>O 或醋酸溶液,空白对照为不添加任何试液。以下是具体方案:

从-80 °C 冰箱取出保藏的 Hp 菌种,37 °C 水浴迅速解冻后,涂布于新鲜的平板上,37 °C、5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 培养 48 h。观察菌落形态为透明,灰白色,边缘平整湿润,革兰氏染色为阴性,挑取单菌落,纯化培养 3 代后,再进行 48 h 培养后,从平板上刮取少量 Hp,重悬于 1 mL 无菌 ddH<sub>2</sub>O,根据 OD<sub>625</sub> 的大小将菌悬液浓度控制在 10<sup>7</sup> CFU/mL。

将该浓度的菌悬液进行涂布试验,其中每个平板涂布 100 μL 菌液,每个平板上打 4 个孔,每孔加入 50 μL 待测药物,放入培养箱中以上述相同条件培养 48 h,观察并用游标卡尺测量抑菌环半径(mm),并拍照保存,阳性对照和阴性对照的处理方法同上。

### 2.3 壳寡糖及其相关产物对幽门螺旋杆菌体外生长的影响

以 2.2 节中验证获得具备体外抑菌作用的物

料,甲硝唑等加入幽门螺旋杆菌进行共培养,控制初始幽门螺旋杆菌的浓度为  $10^7$  CFU/mL, 观察幽门螺旋杆菌的生长情况, 液体培养的发酵条件为事先摸索的幽门螺旋杆菌发酵培养基, 摇瓶微需氧(6% $O_2$ 、80% $N_2$ 、10% $CO_2$ )的培养技术, 置于恒温摇床中 37 °C 振荡培养, 以不添加任何其它溶液的培养基作为调零溶液, 记录不同时间段的吸光度值  $OD_{625}$ , 运用 origin2018 绘制菌体生长曲线图, 讨论壳寡糖对幽门螺旋杆菌生长的影响。

### 3 结果与分析

#### 3.1 壳聚糖、羧甲基壳聚糖对幽门螺旋杆菌的抑菌作用研究

打孔法测定生物活性物质的抑菌性是药敏学中常用的方法, 该方法需要所研究的物料在平板上扩散性较好, 所以需要考察不同溶剂对于目标产物的溶解性, 选择合适的溶剂和浓度作为载体, 进行后续的抑菌性试验。

表 2 不同种类酸溶解壳聚糖(20 mg/mL)的情况

Table 2 Dissolving description of Chitosan (20 mg/mL) with different kind of acid

名称	盐酸	醋酸	硫酸	乳酸	苹果酸
壳聚糖	有部分颗粒	完全溶解	大量颗粒不溶	少量颗粒	大量颗粒

#### 3.1.2 壳聚糖及羧甲基壳聚糖的抑菌效果情况

本研究中以醋酸溶液为溶剂, 配置不同浓度的壳聚糖溶液, 空白对照为 1%、2% 的醋酸 (图 1 右下), 以 2.2 节中所提及方法, 进行抑菌性试验, 测定平板形成抑菌圈大小, 试验结果如表 3 所示, 结论显示: 以 1% 醋酸溶液为溶剂, 质量浓度为 1, 5, 10, 20, 50 mg/mL 的壳聚糖溶液均未产生抑菌环, 说明以 1% 醋酸溶液为溶剂配置的不同质量浓度的 1~50 mg/mL 壳聚糖溶液以及对照 1% 醋酸对幽门螺旋杆菌生长均没有抑制作用, 但以 2% 醋酸溶液为溶剂, 配置的壳聚糖溶液, 质量浓度为 20, 50

3.1.1 不同溶剂溶解壳聚糖、壳寡糖及羧甲基壳聚糖的效果 壳聚糖是一种在酸性条件下溶解性好的生物大分子多糖, 常用的溶解溶剂包括无机酸和有机酸。选择不同种类的酸, 配置成质量浓度 20 mg/mL 的壳聚糖溶液, 观察溶液的溶解情况, 试验结果如表 2 所示: 壳聚糖溶液在无机酸中的溶解速度和效果优于有机酸, 其中醋酸溶解速度快, 所形成的溶液性质为透明均一的液体。

目前大多关于壳聚糖溶液的研究一般以充分溶解的低浓度壳聚糖溶液为研究对象, 溶液多以醋酸稀溶液为主, 质量分数为 1%~2%。故后续选择质量分数为 1%、2% 的醋酸溶液作为溶剂, 研究不同浓度下的壳聚糖的抑菌效果。由于壳寡糖、羧甲基壳聚糖极易溶于水, 所以本次抑菌性试验所选择的溶剂为无菌 ddH<sub>2</sub>O, 羧甲基壳聚糖是一种由壳聚糖的羧甲基化衍生物, 水溶性较好, 其在水中的最大溶解度为 20 mg/mL。

mg/mL 的壳聚糖溶液均出现极小的抑菌环, 阴性对照 2% 的醋酸溶液的抑菌圈半径为 1 mm, 从结果分析可能是 2% 醋酸溶液对幽门螺旋杆菌有抑菌作用, 阳性对照为 10 mg/mL 甲硝唑溶液。

以无菌水为溶剂溶解, 配置不同浓度的羧甲基壳聚糖, 根据表 2 抑菌环测试显示, 不同浓度的羧甲基壳聚糖均未形成抑菌环, 说明这些浓度的羧甲基壳聚糖不具备抑制幽门螺旋杆菌的作用, 另外表中的阳性对照为 10 mg/mL 甲硝唑溶液, 阴性对照为无菌 ddH<sub>2</sub>O。

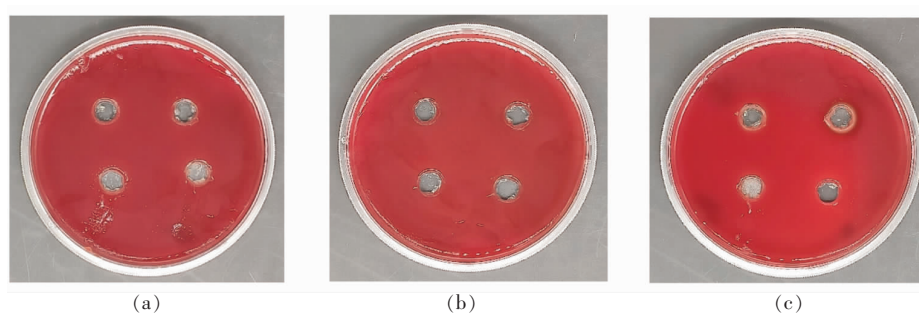
表 3 不同浓度下壳聚糖溶液和羧甲基壳聚糖溶液的抑菌环情况

Table 3 Chitosan and carboxymethyl chitosan's inhibit circle in different concentration

样品名称	阴性对照	阳性对照	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL	50 mg/mL
壳聚糖(1% HAc)	-	5.5 ± 0.20	-	-	-	-	-
壳聚糖(2% HAc)	1.1 ± 0.06	5.5 ± 0.15	-	-	-	1.1 ± 0.12	1.2 ± 0.21
羧甲基壳聚糖	-	5.5 ± 0.21	-	-	-	-	-

注: 以上抑菌半径单位为 mm, 以  $(\bar{x} \pm s)$  表示。





注:1)平板示意图如图 a 所示,10 mg/mL 壳聚糖(图 1 左上)、5 mg/mL 壳聚糖(图 1 右上)、1 mg/mL 壳聚糖(图 1 左下)以及空白对照 1%、2%的醋酸(图 1 右下);2)图 b 是待测物 20 mg/mL 壳聚糖(图 b 左上)、阴性对照 2%醋酸(图 b 右上)、阳性对照甲硝唑溶液(图 b 左下)以及空白对照(图 b 右下)的抑菌结果;3)图 c 是待测物 10 mg/mL 羧甲基壳聚糖(图 c 左上)、5 mg/mL 羧甲基壳聚糖(图 c 右上)、1 mg/mL 羧甲基壳聚糖(图 c 左下)以及对照无菌 ddH<sub>2</sub>O(图 c 右下)的抑菌结果。试验结果表明,3 种不同浓度的羧甲基壳聚糖溶液以及对照无菌 ddH<sub>2</sub>O 对幽门螺旋杆菌的生长均没有抑制作用。

图 1 壳聚糖以及羧甲基壳聚糖抑菌平板示意图

Fig.1 Inhibit circle picture of Chitosan and carboxymethyl chitosan

### 3.2 不同脱乙酰度的壳寡糖原料对幽门螺旋杆菌的抑菌作用研究以及最小抑菌浓度的确定

脱乙酰度是壳寡糖产品好坏的重要指标,脱乙酰度的高低直接决定其在溶液中的溶解性,脱乙酰度越高,抑菌性越高;目前,大部分已有报道推测壳寡糖对于幽门螺旋杆菌的抑菌作用可能与酶切方式、pH 值、浓度有关,但还并未有报道研究

脱乙酰度对于抗幽作用的影响。

通过对比两种不同脱乙酰度的壳寡糖原料,以无菌水为溶剂分别溶解配置成不同浓度的壳寡糖溶液,以 2.2 节中介绍的试验方法测定壳寡糖 A 和 B 的体外抑菌情况,以下是通过抑菌试验获得的抑菌环数据。

表 4 不同脱乙酰度下的壳寡糖抑菌环情况

Table 4 Inhibit circle of chitosan oligosaccharide in degree of deacetylation

名称	阴性对照	阳性对照	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL	50 mg/mL
壳寡糖 A	-	5.5 ± 0.20	-	-	-	-	-
壳寡糖 B	-	5.5 ± 0.15	-	-	-	-	4.1 ± 0.23

注:以上抑菌半径单位为 mm,以( $\bar{x} \pm s$ )表示。

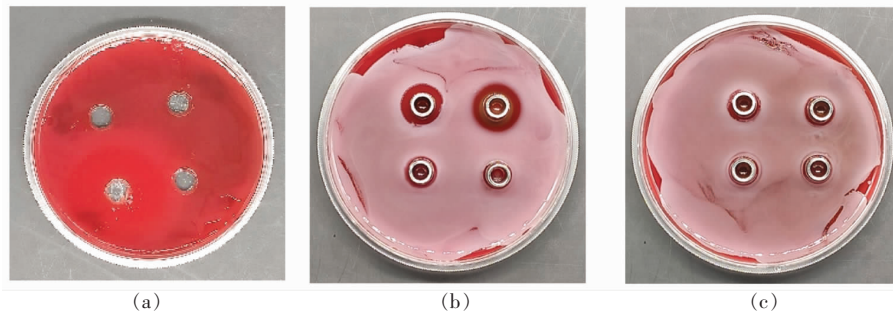
通过试验结果可以看到,不同浓度的壳寡糖 A 未能在平板上生成抑菌环,而壳寡糖原料 B 能够具备抑制幽门螺旋杆菌的作用,最小抑菌浓度为 50 mg/mL。在该浓度下,所配置而成的壳寡糖溶液能有效抑制幽门螺旋杆菌的生长,生成半径约为 4 mm 的抑菌圈,阳性对照为配置而成的 10 mg/mL 甲硝唑溶液,阴性对照为无菌 ddH<sub>2</sub>O。

### 3.3 高脱乙酰度壳寡糖 B 对于幽门螺旋杆菌生长曲线的影响

分别选择壳寡糖 A(50 mg/mL),壳寡糖 B(50 mg/mL)以及甲硝唑(10 mg/mL)作为研究对象,与幽门螺旋杆菌进行培养,对照组(control)为不添

加壳寡糖的幽门螺旋杆菌,初始菌浓度与试验组相同,所有组别保证溶液的初始菌浓度为 10<sup>7</sup> CFU/mL,以空白培养基溶液为吸光度值调零,以菌体吸光度 OD<sub>625</sub> 为考察指标,讨论不同壳寡糖溶液对于幽门螺旋杆菌生长曲线的影响。

根据图 3 的生长曲线试验结果显示:对照组的菌体正常生长,10~20 h 为菌体的对数生长期,20 h 后菌体生长进入稳定期。而试验组(COS B+HP)中由于加入质量浓度为 50 mg/mL 的壳寡糖,使得菌体的生长受到抑制作用,导致试验组所积累的菌体生物量远低于对照组(菌体的吸光度值下降),试验组(COS A+HP)中的生长曲线与对照



注:(1)图 a 中为 50 mg/mL 壳寡糖原料 A(图 a 左上)、20 mg/mL 壳寡糖(图 a 右上)、阳性对照 10 mg/mL 甲硝唑(图 a 左下)以及无菌 ddH<sub>2</sub>O(图 a 右下)的抑菌结果。试验结果表明,50 mg/mL 的壳寡糖 A 溶液以及 20 mg/mL 羧甲基壳聚糖对幽门螺旋杆菌的生长均没有抑制作用,阳性对照 10 mg/mL 甲硝唑能明显抑制幽门螺旋杆菌的生长,抑菌圈半径为 5.3 mm。2)图 b 是待测物:厦门蓝湾科技有限公司生产的壳寡糖原料 B 所配置的壳寡糖溶液:50 mg/mL 壳寡糖(图 b 左上)、10 mg/mL 甲硝唑(图 b 右上)、无菌 ddH<sub>2</sub>O(图 b 左下)以及 1%醋酸(图 b 右下)的抑菌结果。3)图 c 是待测物 10 mg/mL 壳寡糖(图 c 左上)、5 mg/mL 壳寡糖(图 c 右上)、1 mg/mL 壳寡糖(图 c 左下)以及 ddH<sub>2</sub>O(图 c 右下)的抑菌结果。

图 2 壳寡糖对幽门螺旋杆菌的抑菌平板示意图

Fig.2 Inhibit circle picture of chitosan oligosaccharide

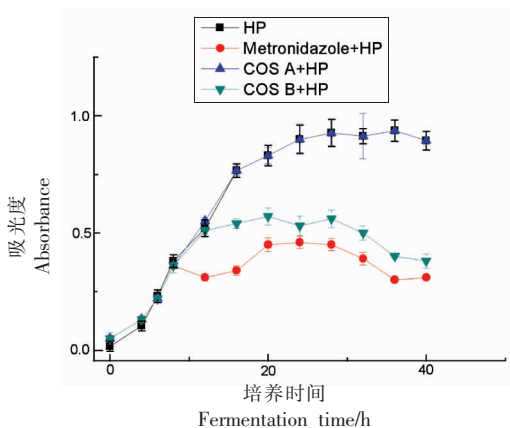


图 3 不同物料对幽门螺旋杆菌的生长曲线的影响

Fig.3 Effect on the HP's growth curve with different experiment group

组的生长基本一致,生长趋势和生物量无明显区别,加入甲硝唑的组别菌体生长受到明显抑制,生物量积累明显低于所有其它试验组和对照组,另外通过 t 检验显示所有试验组与对照组结果有显著差异( $P<0.05$ )。

#### 4 结论

近年来,学者们对于壳寡糖及其相关产物的体外抑制幽门螺旋杆菌的作用有了初步的研究成果<sup>[16]</sup>。谢勇等<sup>[17]</sup>在研究中提出壳聚糖、羧甲基壳聚糖对幽门螺旋杆菌具有抑制作用;薛海波等<sup>[18]</sup>提出通过内切酶制备工艺对产物抗幽作用的影响;

李温静<sup>[19]</sup>在研究中提到特殊的壳寡糖具备一定的体外抗幽门螺旋杆菌作用。陈建国等<sup>[20]</sup>提到内切酶、外切酶以及混合酶的制备工艺对于产物是否具有抗幽作用有重要影响。

在本次研究中选择自主制备的甲壳质衍生物中代表性产物、壳聚糖、壳寡糖以及羧甲基壳聚糖为研究对象,研究不同种物料对于幽门螺旋杆菌的最小抑菌浓度(MIC),一般来说,打孔法适用于溶解性好的样品;但壳聚糖的水溶性较差,所以本研究中采用不同浓度的醋酸溶液溶解壳聚糖进行研究,而羧甲基壳聚糖及壳寡糖的水溶性较好,可以直接选用无菌 ddH<sub>2</sub>O 进行溶解。采用不同浓度的壳聚糖和羧甲基壳聚糖进行试验,未发现其具备体外抑制幽门螺旋杆菌的作用,可能于不同取代位置与分子质量区间有关;而壳寡糖组试验结论显示,厦门蓝湾科技有限公司自主生产的高脱乙酰度壳寡糖经过验证在质量浓度为 50 mg/mL 时能够对幽门螺旋杆菌产生较强的体外抑菌作用,抑菌圈半径为 $(4.1\pm 0.23)$ mm,质量浓度为 10 mg/mL 阳性对照(甲硝唑)的条件下,所形成的抑菌环半径为 $(5.5\pm 0.15)$ mm,试验中采用的低脱乙酰度的壳寡糖未产生抑菌圈,同时从共培养结果来看,高脱乙酰度的壳寡糖 B(50 mg/mL)可以明显抑制幽门螺旋杆菌的生物量积累,反之壳寡糖 A(50 mg/mL)则不具备相应的抑制作用;分析原因

可能是由于高脱乙酰度的壳寡糖拥有较高的生物利用度,水溶性更好,能够更好的与细胞膜上的受体蛋白锚定并特异性结合,当与细胞体内带有阴离子的细胞质发生物理聚合作用,进而扰乱细胞正常的生理活动,抑制幽门螺旋杆菌的正常代谢,进而影响菌体的生长。

综上,在本研究中由厦门蓝湾科技有限公司生产的高脱乙酰度的壳寡糖具备一定的体外抑制幽门螺旋杆菌作用,未来可以进一步完善在抗幽试验的深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] 吴林苗,江剑平. 幽门螺杆菌致病机制及其治疗方式研究进展[J]. 保健医学研究与实践, 2021, 18(4): 144-148.  
WU L M, JIANG J P. Research progress in the pathogenic mechanism of *Helicobacter pylori* and its treatment modalities [J]. Health MedRes & Pra, 2021, 18(4): 144-148.
- [2] ZAMANI M, EBRAHIMTABAR F, ZAMANI V, et al. Systematic review with meta - analysis: The worldwide of *Helicobacter pylori* infection[J]. Alimant Pharmacol Ther, 2018, 47(7): 868-876.
- [3] 王婉婉, 颜玉. 幽门螺杆菌感染, 检验和药物开发的研究进展[J]. 广东化工, 2022, 49(4): 3.  
WANG W W, YAN Y. Research progress of helicobacter pylori infection, testing and drug development[J]. Guangdong Chemical Industry, 2022, 49(4): 3.
- [4] 李雨濛, 马军, 段芳龄. ACG 临床指南: 幽门螺杆菌感染的治疗[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(6): 601-624.  
LI Y M, MA J, DUAN F L. ACG clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2017, 26(6): 601-624.
- [5] 周雪亮, 周渊, 朱强, 等. 幽门螺旋杆菌的研究进展[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(33): 101-104.  
ZHOU X L, ZHOU Y, ZHU Q, et al. Recent advance on *Helicobacter pylori*[J]. China Continuing Medical Education, 2018, 10(33): 101-104.
- [6] HU Y, ZHU Y, LU N H. Recent progress in *Helicobacter pylori* treatment[J]. Chinese Medical Journal, 2020, 133(3): 335-343.
- [7] 高飞, 刘铁钢, 白辰, 等. 脑肠轴与胃肠动力之间相关性的研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(6): 520-524.  
GAO F, LIU T G, BAI C, et al. The research of the correlation between brain-gut axis and gastrointestinal motility[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 37(6): 520-524.
- [8] BUSJAHN A, MEHLING H. Non-Viable *Lactobacillus reuteri* DSMZ 17648 (Pylopass™) as a New Approach to *Helicobacter pylori* Control in Humans[J]. Nutrients, 2013, 5(8): 3062-3073.
- [9] 杨焕蝶, 张翔, 亚历山大·苏沃洛夫, 等. 壳聚糖与壳寡糖抑菌保鲜研究进展[J]. 山东农业科学, 2020, 52(2): 6.  
YANG H D, ZHANG X, SUVOROV A, et al. Research progress of chitosan and chito oligosaccharide in bacteriostasis and preservation[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2020, 52(2): 6.
- [10] ZHENG L Y, ZHU J F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54(4): 527-530.
- [11] 梁慧培, 覃小丽, 钟金锋. 壳寡糖制备和生理活性的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 384-388.  
LIANG H P, QIN X L, ZHONG J F. Research progress in preparation of chito oligosaccharide and its physiological activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(3): 384-388.
- [12] 涂莎, 阳惠湘. 幽门螺杆菌感染治疗的进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(9): 981-988.  
TU S, YANG H X. Progress in the treatment of *Helicobacter pylori* infection[J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2014, 39(9): 981-988.
- [13] 陈莲香, 舒建昌, 何香花. 益生菌对幽门螺杆菌阳性消化性溃疡治疗有效性的 Meta 分析[J]. 中国微生物生态学杂志, 2020, 32(12): 1391-1396.  
CHEN L X, SHU J C, HE X H. The efficacy of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* peptic ulcer: a Meta analysis[J]. Chinese Journal of Microecology, 2020, 32(12): 1391-1396.
- [14] 苏梦茹, 马培培, 李鑫鑫, 等. 9 种抗菌药物对大肠埃希菌最小抑菌浓度的测定[J]. 动物医学进展, 2020, 41(3): 52-56.

- SU M R, MA P P, LI X X, et al. Determination of minimum inhibitory concentration of nine antibacterial drugs to *Escherichia coli*. [J]. *Advances in Animal Medicine*, 2020, 41(3): 52-56.
- [15] 周蓉, 曹峰, 刘杨, 等. 茯苓甘草汤及单味中药对幽门螺旋杆菌体外抑菌实验研究[J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(2): 17-20.
- ZHOU R, CAO F, LIU Y, et al. Experimental study on bacteriostasis of *Helicobacter pylori in vitro* by poring liquorice decoction and single herb[J]. *Asia-pacific Journal of Traditional Medicine*, 2020, 16(2): 17-20.
- [16] 薛金玲, 李健军, 白艳红, 等. 壳聚糖及其衍生物抗菌活性的研究进展[J]. *高分子通报*, 2017, 30(11): 26-36.
- XUE J L, LI J J, BAI Y H, et al. Research development of chitosan and its derivatives in activity [J]. *Polymer Notification*, 2017, 30(11): 26-36.
- [17] 谢勇, 谢正兴, 周南进, 等. 壳聚糖及其衍生物体外抗幽门螺旋杆菌作用及影响因素[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(11): 1343-1347.
- XIE Y, XIE Z X, ZHOU N J, et al. The study of antibacterial effect of chitosan and their derivatives on *Helicobacter pylori in vitro* and influence factor [J]. *Chinese bulletin of Pharmacology*, 2005, 21(11): 1343-1347.
- [18] 薛海波, 周春燕, 李超, 等. 不同酶切方式制备壳低聚糖体外抗幽门螺旋杆菌的研究[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(4): 557-559.
- XUE H B, ZHOU C Y, LI C, et al. Research on lower molecular chitosan antibacterial effect on *Helicobacter pylori in vitro* by different enzymolysis manners[J]. *Journal of Practical Medicine*, 2010, 26(4): 557-559.
- [19] 李温静. 幽门螺旋杆菌致癌风险与壳寡糖抗幽门螺旋杆菌效应的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- LI W J. Study on the carcinogenic risk of *Helicobacter pylori* and the effect of chitooligosaccharide on *Helicobacter pylori*[D]. Qingdao: Qingdao University, 2020.
- [20] 陈建国, 郑连英. 不同酶切方式制备的壳寡糖抑菌活性的研究[J]. *浙江大学学报(工学版)*, 2006, 40(11): 1905-1908.
- CHENG J G, ZHENG L Y. Antimicrobial activity of chitooligosaccharides prepared by different enzymolysis manners[J]. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, 2006, 40(11): 1905-1908.

### The Antibacterial Effect of Chitosan Oligosaccharide and Its Derivative on *Helicobacter pylori*

Lin Yingjun<sup>1</sup>, Han Yaoyue<sup>2</sup>, Li Hua<sup>3</sup>, Jiang Faqin<sup>\*</sup>, Fu Lei<sup>1</sup>, Zhang Qian<sup>2</sup>, Lin Xiufen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, SJTU, Shanghai 200240

<sup>2</sup>Xiamen Bluebay Sci. Tech. Co., Ltd., Xiamen 361026, Fujian

<sup>3</sup>Gastroenterology of the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian)

**Abstract** We use hole method to study the antibacterial effect of the chitosan and its derivative on *Helicobacter pylori*, the results shows that it can not generate antibacterial circle in different concentration of chitosan and carboxymethyl chitosan. Chitosan oligosaccharide B (degree of deacetylation, DD=94%, 50 mg/mL). has generated the antibacterial circle of *Helicobacter pylori*, the radius of bacteriostatic ring is (4.1±0.23) mm, while positive control (metronidazole, 10 mg/mL) is (5.5±0.15) mm. Chitosan oligosaccharide B (50 mg/mL) can vividly decrease the biological mass of *Helicobacter pylori*, while the chitosan oligosaccharide A (50 mg/mL) can not influence the growth of strain. Conclusion shows that chitosan oligosaccharide B (50 mg/mL) has the ability to restrain the *Helicobacter pylori*. The chitosan oligosaccharide A (deacetylation degree of 80%), chitosan and carboxymethyl chitosan provided in this experiment did not have the effect of inhibiting *Helicobacter pylori*.

**Keywords** chitosan oligosaccharide; *Helicobacter pylori*; hole method; metronidazole; inhibit concentration