

## 2015年度“中国生命科学领域十大进展”：口服重组幽门螺杆菌疫苗研究



◀ 牵头科学家邹全明,第三军医大学国家免疫生物制品工程技术研究中心主任、教授,国务院学位委员会药学学科评议组成员,国家药典委员会委员。

中国科协生命科学学会联合体:幽门螺杆菌(*Hp*)是慢性胃炎、胃及十二指肠溃疡的致病菌,是胃癌的主要致病因子。中国胃病患者超过1亿,每年因胃癌死亡者达20万人。第三军医大学邹全明、中国食品药品检定研究院曾明和江苏省疾病预防控制中心朱凤才合作研究,发明了“*Hp*分子内佐剂黏膜疫苗”设计原理和安全高效的首个人用分子内黏膜免疫佐剂,设计与制造出全新的*Hp*疫苗组分;研究出国际上首个*Hp*疫苗生产与检定质量标准。历时15年,完成了5000余人参加的*Hp*疫苗临床试验,成功研发了具有完全自主知识产权的世界首个安全、有效的*Hp*疫苗,保护率达71.8%,获国家1.1类新药证书。为慢性胃炎和胃癌的防治提供了新方法。

# 幽门螺杆菌疫苗

邹全明

第三军医大学药理学系,重庆 400038

在20世纪80年代以前,一直认为消化性疾病是非感染性疾病,“无酸无溃疡”的定律决定着临床医师对这类患者的诊断、治疗与预防。然而,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*, 简称*Hp*)的发现从本质上更新了这一定律,并成为人类胃肠病防治与研究史上的一次革命。1982年由澳大利亚B. Marshall及R. Warren首次从患者胃黏膜活检标本中分离、培养出幽门螺杆菌,接着Marshall亲自吞服该菌进行感染试验,结果证实幽门螺杆菌感染可引起胃炎<sup>[1]</sup>。Marshall及Warren也因发现了幽门螺杆菌以及这种细菌在胃炎和胃溃疡等疾病中的作用,被授予2005年度诺贝尔生理学或医学奖。

### 1 幽门螺杆菌的病原学

#### 1.1 生物学特性

##### 1.1.1 形态学

幽门螺杆菌为革兰阴性细菌,呈弯曲、S形或海鸥形,长2.5~4.0 μm,宽

0.5~1.0 μm。在胃黏膜上皮细胞表面常呈螺旋状或弧形(图1),在固体培养基上有时会出现杆状或圆球状。在电子显微镜下菌体的一端有2~6根鞭毛,鞭毛长2~5 μm(图2)。



图1 胃上皮细胞表面*Hp*(电镜下)

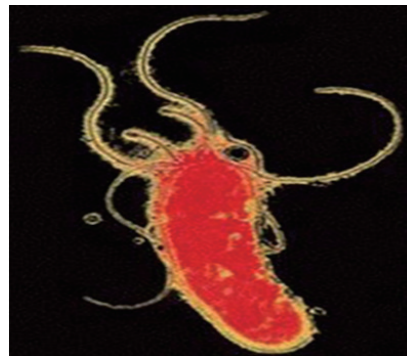


图2 *Hp*超微结构(电镜下)

引用格式:邹全明. 幽门螺杆菌疫苗[J]. 科技导报, 2016, 34(13): 31-39; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.13.005

### 1.1.2 培养特性

幽门螺杆菌属于微需氧菌,稳定生长需要5%~8%的O<sub>2</sub>、10%的CO<sub>2</sub>和85%的N<sub>2</sub>,在空气和绝对无氧条件下均不能生长。从临床标本中分离培养幽门螺杆菌需补充适量的CO<sub>2</sub>,且培养环境相对湿度要保持在95%以上。幽门螺杆菌培养的最适温度为35~37℃,营养条件要求较高,需要精氨酸、组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸等必需氨基酸,有些菌株尚需要丙氨酸或丝氨酸,葡萄糖可能仍然是幽门螺杆菌能量和碳源的重要来源之一。许多固体培养基都能用于幽门螺杆菌的分离培养,包括哥伦比亚琼脂、心脑浸液琼脂等,但都必须加入一定量的马、羊、人全血或胎牛血清作为补充营养成分。幽门螺杆菌培养的最适pH值为中性或弱碱性。幽门螺杆菌生长缓慢,培养时间较长,通常需3~5 d甚至1周。典型幽门螺杆菌培养菌落为圆形、无色、透明的露滴状,1~2 mm,开始呈针尖样,以后菌落稍大呈灰白色。为了避免杂菌的生长,在培养基中常需加入万古霉素、两性霉素、多黏菌素、甲氧苄啶等抗生素。幽门螺杆菌在液体培养基中也可以生长,但生长更加困难,这可能是由于在液体里更难保证菌体必须的微需氧环境和营养物质的稳定,以及有害产物的持续扩散。

### 1.1.3 生化反应

幽门螺杆菌生化反应及生物学特性详见表1。

### 1.1.4 抵抗力

与其他细菌相比,*Hp*有一定的耐酸性,尿素对*Hp*可起到保护作用,1%胆盐可抑制*Hp*生长。

### 1.1.5 耐药性

随着幽门螺杆菌根除治疗的广泛开展,*Hp*对抗生素的耐药率逐年上升,并成为含质子泵抑制剂(PPI)三联疗法根除率下降及根除治疗失败的主要原因。中国*Hp*菌株对甲硝唑和克拉霉素的耐药率高达80%以上,并已开始对阿莫西林产生耐药。

### 1.1.6 基因组及分型

1997年Jean-F Tomb和Owen White等首次完成了第一株*Hp*的基因组全序列测定工作,该*Hp*的代码为26695,来源于慢性胃炎患者。1999年又由R.A.Alm和L.L.Ling等完成了来源于十二指肠球部溃疡患者的J99菌株的测序工作<sup>[2]</sup>。目前已有7株幽门螺杆菌的全基因组序列被测定,重庆第三军医大学邹全明课题组2012年也完成了中国第一株幽门螺杆菌的全基因组序列测定<sup>[9]</sup>。幽门螺杆菌染色体为1.60~1.72 mb,G+C含量为34.1%~37.5%。对*Hp*全基因组序列的分析可进一步加深对*Hp*致病性、耐酸性、抗原变异和微需氧特性的了解和致病机制的阐明,也可对*Hp*的遗传多态性与疾病表征的相关性进行更广泛的评估,为*Hp*流行病学研究及其预防、控制和治疗提供理论指导(图3)。

根据 *CagA* (cytotoxin associated

gene A) 基因和 *VacA* (vacuolating cytotoxin gene A) 基因及蛋白表达的不同,将*Hp*菌株分为3型:I型含*CagA*基因,并表达*CagA*蛋白(cytotoxin-associated protein,细胞毒性相关蛋白)和*VacA*蛋白(vacuolating cytotoxin,空泡毒素),具有较强的细胞毒性,与消化性溃疡及胃癌有关;II型不含*CagA*基因,不表达*CagA*蛋白和*VacA*蛋白,细胞毒性较弱,感染后只引起慢性浅表性胃炎;中间型仅单独表达*CagA*蛋白或*VacA*蛋白。研究显示,*Hp*菌株感染时若含*CagA*基因,则胃的炎症增加,引起十二指肠溃疡和胃癌的危险性增大<sup>[4,5]</sup>。

### 1.2 主要抗原

*Hp*疫苗的研究重点之一就是候选抗原的筛选。目前,经筛选并在动物模型中得到验证的*Hp*保护性抗原有数种,主要包括尿素酶、黏附素、空泡毒素、毒素相关抗原、过氧化氢酶、热休克蛋白及其他蛋白成分。

#### 1.2.1 尿素酶

尿素酶(urease, Ure)在*Hp*定植感染过程中有分解尿素、中和胃酸的作用,对*Hp*的致病性具有重要意义。一般认为,分解尿素产生的氨可以中和盐酸,这一过程的低酸和高pH值使细菌能够顺利穿过胃黏液层,到达近中性黏膜表面。Ure分布在*Hp*的表面,占全菌蛋白的5%~10%,它由A、B 2个亚单位组成,呈六聚体,几乎所有*Hp*菌株均能产生Ure,且氨基酸同源性很高,因此,Ure作为*Hp*疫苗抗原具有显著优势。

表1 *Hp*生化反应及生物学特性

生物学特性	<i>Hp</i>	生物学特性	<i>Hp</i>
尿素酶	+	精氨酸氨肽酶	+
氧化酶	+	组氨酸氨肽酶	+
触酶	+	亮氨酸氨肽酶	+
硫化氢产生	-	含1%甘油生长	-
G+Cmol%	37	1.5% NaCl生长	-
硝酸盐还原	-	42℃生长	-
马尿酸水解	-	37℃生长	+
碱性磷酸酶	+	25℃生长	-

注:+表示阳性;-表示阴性。

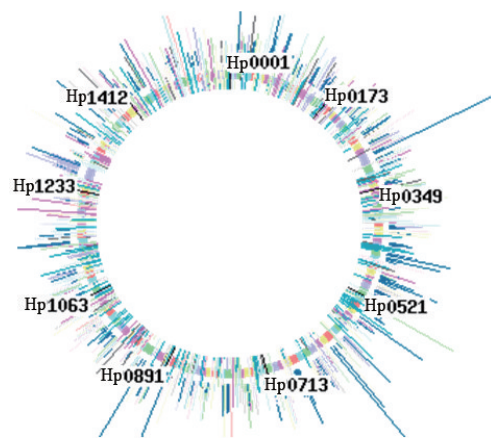


图3 *Hp*基因组全图

据统计,选择尿素酶作为疫苗抗原的研究报道占 *Hp* 疫苗研究文献总数的 70% 以上,因此,尿素酶已成为 *Hp* 疫苗的首选亚单位抗原。

### 1.2.2 黏附素

黏附素(adhesin)是由 *Hp* 产生于菌体表面并参与和胃上皮细胞发生特异性黏附而引起病理损害的一组蛋白质分子。目前已发现的有 N-乙酰神经氨酸乳糖结合原纤维血凝素(HpaA)、胞外酶 S 样黏附素、一种 31 kD 的黏附因子、一种 19.6 kD 的毛状蛋白和 Lewis B 血型抗原结合黏附素(BabA)等。由于这些黏附素在 *Hp* 定植过程中发挥重要作用且均存在于外膜,以它们作为免疫原进行疫苗开发也得到了较多关注。

### 1.2.3 热休克蛋白

热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)是 *Hp* 应激时所产生的的一种蛋白质分子,分 A 和 B 2 个亚单位。它有独特的镍结合区,在镍参与尿毒酶的功能上起协同作用。动物实验表明,重组 HspA 和 HspB 亚单位免疫动物可产生一定的保护效果。然而,由于 *Hp* 的 Hsp 属于 Hsp60 蛋白家庭,它与人体 Hsp60 蛋白具有较高的同源性和交叉反应性,可诱导抗人胃上皮细胞的自身抗体,造成胃上皮组织的炎症反应和损伤。因此,用 Hsp 作为 *Hp* 疫苗保护性抗原的有效性和安全性尚需进一步研究。

### 1.2.4 其他

其他的还有如过氧化氢酶(catalase, KatA)、空泡毒素(VacA)、细胞毒素相关抗原(CagA)、中性粒细胞激活蛋白(neutrophil-activating protein, NAP)等。

## 1.3 流行病学

*Hp* 嗜寄居于人类,但作为实验动物,蒙古沙鼠、小鼠等动物亦可被 *Hp* 感染。在自然环境中,人是唯一传染源,主要通过粪-口传播或口-口传播。

幽门螺杆菌感染是最常见的慢性感染之一,全世界人群中平均约 50% 的人有幽门螺杆菌感染。2004 年中国 10 余省区数 10 万人流行病学调查资料显示,幽门螺杆菌感染率 >54%。尽管大多数感染者平时无任何症状,但约 30%

的感染者发展为慢性胃炎,10%~20% 可发展为消化性溃疡(胃溃疡和十二指肠溃疡),还有一部分感染者可在慢性活动性胃炎的基础上,出现胃黏膜萎缩和肠上皮化生,其中有少数人还可发展为胃癌。*Hp* 在中国人群中的感染表现为农村高于城市,成人高于儿童,胃癌高发区高于胃癌低发区,性别之间、民族之间的 *Hp* 感染率无显著差异<sup>[6]</sup>。

对人群的大量血清流行病学调查资料显示,*Hp* 感染率随年龄上升,上升模式有两大类。第一类为儿童期易感型,儿童期为感染率剧增期,每年以 3%~10% 的速度急剧上升,至 10 岁有 40%~60% 人受感染,以后感染速度减慢,每年以 0.5%~1% 速度缓增,至 50 岁左右感染率基本不增,进入平坦期,发展中国家属这一类型。第二类为感染均衡型,感染率随年龄增加的速度在儿童和成年期基本一致,以每年 0.5%~1% 速度上升,有些地区 50 岁以后感染率非但不进入平坦期,而且还明显增高,经调查证实这是所谓出生队列(birth cohort)现象,这些地区过去战乱时感染率高,这代人在儿童期受感染,把高感染率带到现在,发达国家属这一类型<sup>[5]</sup>。

## 1.4 致病机制

### 1.4.1 致病因子及致病作用

*Hp* 致病因子很多,按其致病机制及其特点大致分成 4 类:1) 与 *Hp* 定植有关的致病因子;2) 以损伤胃黏膜为主的致病因子;3) 与炎症和免疫损伤有关的致病因子;4) 其他致病因子。

定植因子是 *Hp* 感染的首要条件。*Hp* 本身的动力装置、黏附特性、有毒性作用的酶以及多种毒素既有利于其定植,也有助于 *Hp* 在高酸环境下存活。*Hp* 产生的尿素酶在 *Hp* 的致病机制中起十分重要的作用。*Hp* 能水解尿素释放出氨(NH<sub>3</sub>),直接对胃黏膜造成损伤,而 *Hp* 本身在其产生的“氨云”包裹之中则免受胃酸、胃蛋白酶的侵袭,使其在很低的 pH 值环境中得以生存。

*Hp* 的基因多态性是造成不同临床结果的原因。*Hp* 的基因型是造成 *Hp* 感染后不同临床结果的主要原因,它包

括 *VacA* 基因(空泡细胞毒素基因)和 *CagA* 基因(细胞毒性相关基因)及相应基因表达的蛋白质。几乎所有 *Hp* 菌株均有 *VacA* 基因,但只有 50%~60% 的菌株对细胞出现空泡毒素,并依此将 *Hp* 分为 tox<sup>+</sup> 和 tox<sup>-</sup> 菌株,*Hp* tox<sup>+</sup> 表达 *VacA* 蛋白。*VacA* 基因包括 2 个显著多变的区域,即 S 区信号序列和 m 区中间序列,所有 *Hp* 菌株的 S 区分为 s1a、s1b、s1c、s2; m 区分为 m1a、m1b、m2 三型。由不同信号序列和不同中间序列而构成的不同 *Hp* *VacA* 基因型,不但其与 *Hp* 的毒力水平有关,而且有地区差异,其中以 s1a/m1 型空泡毒性最强,s1/m2 次之,而 s2/m2 则无细胞毒性。*VacA* 基因多态性在世界各地和中国不同地区都有所不同,中国是以 s1a/m2 为主。了解不同国家、地区、民族的 *Hp* *VacA* 基因型毒力差异及其与相关疾病的关系,对于临床上实施不同的针对性治疗措施具有一定意义。

*Hp* 的 *VacA* 基因编码产生分子量为 87 kD 的空泡细胞毒素(vacuating cytotoxin A, VacA)。VacA 作为 *Hp* 的主要毒力因子之一,在酸性环境 pH 值作用下,可与靶细胞膜上的特异性受体蛋白酪氨酸磷酸酶结合作用于靶细胞的 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶,使离子蛋白功能紊乱,破坏细胞的正常功能,并进入靶细胞内诱发细胞溶酶体及内质网损伤,造成细胞空泡变性;而且还直接损伤胃黏膜,抑制上皮细胞损伤修复,干扰细胞信号转导,引起细胞凋亡。同时 VacA 还影响 H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶,进而影响壁细胞的泌酸功能。另外, VacA 在膜上形成的孔道可作为尿素分子的一种被动转运子,促进尿素透过胃黏膜上皮进入腔内,为 *Hp* 的生存和定植创造了条件。VacA 可使宿主上皮细胞空泡形成、皱缩,最终死亡,与临床疾病的严重程度有密切关系。

*CagA* 基因为编码 *CagA* 蛋白的基因, *CagA* 基因只存在于具有空泡细胞毒素的菌株中,编码的蛋白为 *CagA* 蛋白。*CagA* 蛋白与毒素表达密切相关,与 *VacA* 的合成、修饰、转运有关。*CagA* 可使 *Hp* 表达大量的 LewisX 和

LewisY 蛋白,使黏膜局部排斥反应减轻,有利于 *Hp* 在胃黏膜的长久定居;而且 *CagA* 的表达与胃黏膜中 *Hp* 密度呈正相关,即 *CagA*<sup>+</sup> 的菌株更易在胃黏膜定植,引起更严重的胃炎。*CagA* 基因同 *Hp* 其他基因一样,具有显著的多态性,这表现在不同地区的 *CagA* 基因显著不同。

*Hp* 毒素与 *Hp* 的其他致病因子,如脂多糖、热休克蛋白(Hsp)、中性粒细胞活化蛋白(Hp-NAP)、蛋白酶、脂酶、磷脂酶 A2 等共同作用,对胃黏膜产生局部的炎症反应和免疫反应,使胃黏膜遭受炎症和免疫损伤,而损害的胃黏膜则更容易遭受胃酸、胃蛋白酶的侵袭。因此, *Hp* 通过各种致炎因子导致炎症反应。

#### 1.4.2 致病机制

目前已经确认 *Hp* 与慢性胃炎、消化性溃疡病、胃癌、胃黏膜相关性淋巴瘤组织 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) 淋巴瘤密切相关<sup>[7]</sup>。 *Hp* 感染导致胃十二指肠黏膜损伤的机制十分复杂,有关学说主要有 4 种:

1) “漏屋顶学说”。Goodwin 把发炎的胃黏膜比喻为漏雨的屋顶,无雨则暂时干燥,意思是说无胃酸就无溃疡。在给予抗分泌药之后,胃酸抑制,溃疡愈合,但只能获得短期疗效,因为终究没有把漏雨的屋顶修好,没有改变溃疡病的自然病程。消化性溃疡的自然病程中溃疡复发率 >70%。如果针对与炎症及与溃疡有关的 *Hp* 治疗(根除 *Hp*),则溃疡不易复发。所以只有通过黏膜修复才能达到溃疡病治愈的目的。

2) “促胃液素相关学说”。Levi 提出 *Hp* 周围的“氨云”可使胃窦部 pH 值增高,胃窦部促胃液素反馈性释放增加,因而胃酸分泌增加,在十二指肠溃疡的形成中起重要作用。对于 *Hp* 相关性十二指肠溃疡,如果能够真正根除 *Hp*,溃疡是不应该复发的,再感染的发生率很低,西方国家每年 1% 左右。

3) 胃上皮化生学。*Hp* 通过定植于十二指肠内的胃化生上皮,引起黏膜损伤并导致十二指肠溃疡形成。*Hp* 释放的毒素及其激发的免疫反应导致十

二指肠炎症的产生。由于炎症黏膜对其他致溃疡因子的攻击耐受力下降,导致溃疡的发生,或者重度炎症本身导致溃疡产生。在十二指肠内, *Hp* 仅在胃上皮化生部位附着定植,此为本学说的一个有力证据。

4) 介质冲洗学说。已经证实 *Hp* 感染导致多种炎性介质的释放,这些炎性介质在胃排空时冲至十二指肠而导致十二指肠黏膜损伤。加上 *Hp* 可以定植于有胃上皮化生的十二指肠黏膜,这就解释了 *Hp* 主要存在于胃窦,但可以导致十二指肠溃疡的发生。

*Hp* 不仅与上胃肠道疾病有关,也与胃肠道外疾病有关。*Hp* 感染可以引起全身的免疫反应和慢性炎症反应,诱导大量的炎症介质、细胞因子和急性反应物释放,这可能是它引起胃肠道外疾病的病理生理基础,这种联系可能是以炎性介质的激活或诱导自身免疫反应为特征的。近年来发现 *Hp* 与许多胃肠道外疾病也有一定关系。目前认为,与 *Hp* 感染关系最为肯定的胃肠道外疾病是缺铁性贫血和特发性血小板减少性紫癜,欧洲新近的 Maastricht-3 共识认为,对伴有 *Hp* 感染的缺铁性贫血和特发性血小板减少性紫癜患者应行 *Hp* 的根除治疗。此外, *Hp* 感染在冠心病、高血压、脑血管疾病、免疫性疾病、营养代谢性疾病和皮肤病等疾病的发病中也可能起一定作用。

#### 1.4.3 感染引起的免疫炎症反应及宿主基因多态性

*Hp* 感染后与宿主相互作用,介导体对细菌的免疫反应而导致 IL-6、IL-8、TNF 等一系列细胞因子表达上调,这些细胞因子构成一个复杂的炎症免疫调节网络,并通过旁分泌、内分泌等途径作用于 B 淋巴细胞、NK 细胞、巨噬细胞,使其在胃黏膜局部增殖、分化、激活,产生特异性和非特异性免疫反应,损伤局部组织,导致胃肠疾病的发生。最近研究表明, *Hp* 感染后可导致 Th17 细胞明显增高,通过调节 Th1 型细胞因子而促进胃炎的发生与发展<sup>[8]</sup>。

对 *Hp* 相关性胃炎与细胞因子多态性的研究发现,致炎因子 IL-1 多态性

(IL-1RN\*2/IL-1B-511T/-31C) 与 IL-1B 表达增加、炎症加重及肠化生、萎缩性胃炎发生率有关。IL-10-1082G/-819C/-592C 等位基因(GCC 单倍体)携带者黏膜 IL-10 mRNA 水平高于 ATA 单倍体型携带者,并且与毒性更大的 *CagA*<sup>+</sup>、*VacAs1*<sup>+</sup> 和 *babA2*<sup>+</sup> *Hp* 菌株建群有关<sup>[9]</sup>。IL-1B-511T 增加胃酸和胃黏膜异常增生的危险性。同时也有研究显示, *Hp* 阳性携带者 TNF- $\alpha$ 308G/G 的个体十二指肠溃疡发生率高于携带者 TNF- $\alpha$ 308G/A 或 APA 的个体<sup>[5]</sup>。TNF- $\alpha$  的基因多态性增加胃癌发生的危险,说明细胞因子多态性在 *Hp* 感染的发生及结局中起着作用。

*HLA* 基因多态性与 *Hp* 易感性及 *Hp* 感染的结局也有大量研究,认为不同宿主 *Hp* 感染危险性的变化与 *HLA* 等位基因有关, *HLA* 能够产生蛋白质,这些蛋白质能够影响炎症反应的严重程度,导致不同临床结果的产生。有研究显示, *HLA-DQA1\*0102* 基因在 *Hp* 阳性萎缩性胃炎患者比 *Hp* 阳性浅表性胃炎及正常对照组低,其在 *Hp* 阳性肠型胃癌中的分布也显著降低,提示 *HLA-DQA1\*0102* 基因可能与抵御 *Hp* 感染有关。中国的研究显示, *HLA-I* 类等位基因的多态性可能与山东临朐地区 *Hp* 感染有关, *CW\*15* 基因可能是 *Hp* 的易感基因, *A\*02*、*B\*15*、*CW\*08* 是保护基因,与 *HLA-II* 类等位基因的多态性可能无关。对台湾胃癌患者研究发现 *HLA-DQB1\*0301* 基因可能抵御 *Hp* 感染的保护性基因, *HLA-DQB1\*0602* 基因则可能是胃癌的易感基因。还有研究表明, *Hp* 阳性患者胃上皮 *HLA-DR* 抗原表达较 *Hp* 阴性患者更显著, *Hp* 定植密度与 *HLA-DR* 抗原表达程度呈正相关,感染 *CagA*<sup>+</sup> 菌株患者较 *CagA* 菌株患者 *HLA-DR* 抗原表达更显著。

#### 1.5 检测与诊断

检测幽门螺杆菌的方法很多,临床上较为常用的有 <sup>13</sup>C 尿素呼气试验、细菌分离培养、胃黏膜组织切片染色、快速尿素酶试验、ELISA 检测血清 *Hp* 抗体和粪便 *Hp* 抗原检测等<sup>[9]</sup>。



图4 尿素呼气试验示意

### 1.5.1 $^{13}\text{C}$ 尿素呼气试验

$^{13}\text{C}$  尿素呼气试验原理: *Hp* 中富含尿素酶, 尿素酶可将尿素分解成氨气和二氧化碳。当服用含有  $^{13}\text{C}$  标记的尿素试剂后, 如果患者胃内存在 *Hp* 感染, 其尿素酶即可将  $^{13}\text{C}$  尿素分解为  $^{13}\text{CO}_2$  和氨气,  $^{13}\text{CO}_2$  进入血液循环经肺排出, 其呼出的气体中  $^{13}\text{C}$  量将会增加, 通过高灵敏度的质谱仪或红外光谱仪精确地测定呼气中  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  值, 即可达到诊断幽门螺杆菌感染及其感染程度的目的(图4)。

由于口服的  $^{13}\text{C}$  尿素到达胃后呈均匀分布, 只要在  $^{13}\text{C}$  尿素接触的部位存在着 *Hp* 感染, 就可灵敏地检测到。该方法仅呼气 2 次便可迅速明确有无 *Hp* 感染, 准确性、特异性、敏感性都很高, 且具有无创性、无不良反应等优点, WHO 将其推荐为检测 *Hp* 的“金标准”, 尤其适用于老人、妇女、儿童等人群, 也特别适用于 *Hp* 根治疗效的重复检测。

### 1.5.2 细菌分离培养

幽门螺杆菌培养阳性是诊断 *Hp* 感染的“金标准”。对胃镜检查中的临床活检标本进行 *Hp* 的分离培养, 可采用厌氧袋或小型通气罐(1.5 L)代替厌氧培养箱, 设备和技术较为简便, 易于推广。但 *Hp* 培养阳性率并不高, 操作检验时间久, 需要 3~5 d 才能报告结果。

### 1.5.3 组织切片染色法

胃镜检查中的活检组织经特殊染色后观察, 被认为是诊断 *Hp* 感染准确可靠的方法。该法特异性较好, 但有的方法较繁琐(如 Warthin-Starry 银染色), 且易受菌体分布不均匀及其他革兰阴性杆菌存在的影响。

### 1.5.4 快速尿素酶试验

快速尿素酶试验用于胃镜检查中的活检组织诊断 *Hp* 感染, 试验试剂包括尿素、pH 指示剂(酚红)、缓冲液和防腐剂。在酸性条件下, 当  $\text{pH} \leq 6.8$  时, 酚红指示剂呈黄褐色, 如果活检标本中有 *Hp*, *Hp* 的尿素酶分解尿素产生  $\text{NH}_3$ , 使试剂  $\text{pH} \geq 8.4$ , 这时酚红指示剂由黄或橙色变为红或紫红色。由于胃内环境仅适于螺杆菌大量定植, 胃液中其他产生尿素酶的杂菌含量少、活性低, 改变试剂中 pH 值的能力被缓冲液所缓冲, 不致使试剂变色而出现假阳性结果。目前常用的尿素酶试剂在与胃镜活检标本接触后几分钟后便可显色, 称为快速尿素酶试验。尿素酶试验具有快速、简便的优点, 特别适合基层医院推广使用。但快速尿素酶试验属于间接试验, 标本数、细菌数、反应时间、温度和湿度均可影响试验结果。

### 1.5.5 ELISA 检测血清抗体

通过检测血清中幽门螺杆菌特异性的抗体来间接诊断幽门螺杆菌的感

染。ELISA 检测血清抗体的特异性和诊断效率均在 80% 以上, 且血清学方法具有无创伤和重复性好的优点。由于绝大多数 *Hp* 感染者可无症状(虽然胃黏膜组织学可能有炎性改变), 少部分有功能性消化不良症状的患者也可无 *Hp* 感染; *Hp* 感染后抗体出现需要半年左右的时间, 早期查抗体, 易出现假阴性, 而失去最佳治疗时机; *Hp* 被根除后, 抗体下降缓慢, 1~2 年才能转阴, 可能会使患者接受过渡治疗, 造成医疗资源浪费。因此, 血清学检测对 *Hp* 感染的治疗指导意义不大, 具有一定的局限性, 该法主要用于该菌感染的流行病学调查。

### 1.5.6 *Hp* 粪便抗原检测试验

*Hp* 粪便抗原检测试验也是一种非侵入性检查方法。由于 *Hp* 定植于胃上皮细胞表面, 随着胃黏膜上皮的快速更新脱落, *Hp* 也随之脱落, 并通过胃肠道从粪便排出。*Hp* 粪便抗原检测试验是基于快速层析免疫技术, 采用抗-*Hp* 抗体作为捕捉和检测抗体, 特异性诊断人体内 *Hp* 的感染。该方法操作简便、省时, 不需要昂贵的仪器。

### 1.5.7 常用 *Hp* 检测方法的比较

*Hp* 感染诊断标准原则上要求可靠、简单, 以便于实施和推广。常用 *Hp* 检测方法的敏感性和特异性比较见表 2。

根据中华医学会消化病学分会“幽门螺杆菌共识意见”(2003·安徽桐城), 幽门螺杆菌的临床诊断标准为以上方法中任 1 项现症感染诊断方法阳性即

表 2 常用 *Hp* 检测方法的敏感性及其特异性比较

检测项目	*敏感性/%	*特异性/%
现症感染的诊断方法		
细菌培养	70~92	100
组织学检查(Warthin-Starry 银染或改良 Giemsa 染色)	93~99	95~99
尿素呼气试验#	90~99	89~99
快速尿素酶试验#	75~98	70~98
粪便抗原检测	89~96	87~94
曾经感染的诊断方法		
血清 <i>Hp</i> 抗体	88~99	86~99

注: \*表示一些文献报告的结果, 实施时可因技术、试剂的不同而有很大差异; #表示两者均为尿素酶依赖试验。

可诊断为 *Hp* 感染; 科研诊断标准为细菌培养阳性或其他任 2 项阳性。血清 *Hp* 抗体单项检查可用于大样本流行病学调查。根除 *Hp* 疗效判断: 用于明确是否 *Hp* 根除的复查应在根除治疗结束至少 4 周后进行; 建议选用非侵入性的尿素呼气试验或粪便抗原检查; 如临床疾病有必要进行内镜复查, 也可用胃黏膜活检标本检测 *Hp*, 此时应同时取胃窦、胃体黏膜检测; 临床判断仅用快速尿素酶试验, 科研判断应再加另一基于活检标本的检查, 2 种方法均阴性可认为 *Hp* 根除。

## 1.6 幽门螺杆菌疫苗

### 1.6.1 疫苗对预防和控制幽门螺杆菌感染及其引起的相关疾病的意义

目前临床上主要应用抗生素加铋剂或 H<sup>+</sup>拮抗剂治疗幽门螺杆菌感染, 但存在较多不足: 1) 疗效不稳定, 易复发; 2) 易产生耐药性; 3) 毒副作用大; 4) 医疗费用高; 5) 最大的缺陷在于不能通过抗生素治疗而最终彻底消灭幽门螺杆菌细菌。由于幽门螺杆菌在胃内栖居部位的特殊性, 以及对一些抗生素容易产生耐药性, 单纯依靠药物根除幽门螺杆菌并不是一件易事, 况且人群中幽门螺杆菌感染率较高, 也不可能对所有的幽门螺杆菌感染者使用抗生素进行幽门螺杆菌根除治疗。所以, 对幽门螺杆菌感染所致的胃、十二指肠疾病的防治难度仍很大, 必须寻找新的有效途径。

人类与病原微生物长期斗争的历史表明, 有效控制和彻底消灭某种传染病的最佳途径是疫苗接种。耐药菌株不断增多以及发展中国家幽门螺杆菌感染率不断增高的事实, 使我们更寄希望于幽门螺杆菌疫苗。

早在 1991 年, Czinn 及 Nedrud 即获得了免疫接种具有保护性的实验结果, 提示建立一种免疫接种方案以预防幽门螺杆菌感染及其相关疾病是有可能的<sup>[10]</sup>。猫螺杆菌小鼠动物模型的建立使得验证这一假设成为可能<sup>[11,12]</sup>。更有意义的是, *Hp* 疫苗不单具有预防作用, 还同时具有显著的治疗效果。Doidge

等用粉碎的猫螺杆菌或幽门螺杆菌加 CT 经口接种小鼠能根除已感染的细菌。Corthesy-Theulaz 等亦证实了这一发现, 且均未观察到病变加重情况。这标志着选择有效的保护性抗原及佐剂在幽门螺杆菌感染的人群施行治疗性免疫接种是能够成功的。

疫苗控制 *Hp* 感染不仅能克服现行抗生素疗法存在的毒副作用等不足, 而且在个人防治费用上将大幅度节省, 群体防治效果更佳。因此, 发展有效幽门螺杆菌疫苗对预防和控制幽门螺杆菌感染, 大幅降低幽门螺杆菌相关性疾病具有重大社会效益和经济效益。

### 1.6.2 幽门螺杆菌疫苗研究概述

自从幽门螺杆菌被发现开始, 人们就对 *Hp* 疫苗给予了极大的关注, 全世界科学家在幽门螺杆菌疫苗的研制上进行了不懈的努力, 目前已取得了显著的进展。特别是随着幽门螺杆菌全基因组测序工作的完成, 包括尿素酶在内的众多幽门螺杆菌保护性抗原得到应用, 如黏附素、空泡毒素 (VacA)、毒素相关抗原 (CagA)、中性粒细胞激活蛋白 (NAP)、过氧化氢酶、热休克蛋白 A (HspA) 及其他一些蛋白成分; 加上幽门螺杆菌感染与免疫的机制逐渐被揭示, 新型黏膜佐剂型疫苗、聚合物微粒疫苗或减毒沙门菌载体疫苗技术的发展, 它们能将幽门螺杆菌的保护性抗原投递到机体黏膜表面, 进而诱发机体特异的体液和细胞免疫<sup>[13,14]</sup>。在接种途径方面, 幽门螺杆菌黏膜疫苗以口腔、鼻腔和直肠这 3 种途径为主, 尤其是口服接种途径更优<sup>[15]</sup>。许多研究表明, 无论是幽门螺杆菌全菌破碎物还是重组亚单位抗原成分, 如 Ure、HspA、VacA 或过氧化氢酶等, 结合黏膜佐剂 (大肠杆菌不耐热肠毒素或霍乱毒素及其亚单位) 或其他投递方式经口腔或胃内黏膜接种后可获得有效的保护性免疫<sup>[16,17]</sup>。

### 1.6.3 国外幽门螺杆菌疫苗研究

#### 1.6.3.1 *Hp* 全菌疫苗

2001 年, Kotloff 等首次报道了 *Hp* 全菌疫苗的人体志愿者试验<sup>[18]</sup>。该试验采用随机双盲设计, 共有 41 名健康成年人志愿者参与, 接种方式为口服, 3

次,  $2.5 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^8$ 、 $2.5 \times 10^{10}$  甲醛灭活的全菌 3 个剂量组均同时以 25  $\mu\text{g}$  大肠杆菌不耐热肠毒素 (heat-labile toxin, LT) LT 的突变体 (LTR192G) 作为黏膜佐剂。结果: 1010 CFU 的全菌免疫后, 在唾液和粪便中可检测到 *Hp* 特异性的系统和黏膜局部抗体 (包括 sIgA), 同时在循环血液和胃活检组织中可检测到特异性抗体分泌细胞 (antibody secretory cells), 尤其是在 *Hp* 感染阴性者; 另外, 在幽门螺杆菌阳性志愿者未观察到 *Hp* 的根除, 25  $\mu\text{g}$  的 LTR192G 可使 6 名志愿者发生腹泻。

HELIVAX 为 Antex Biologics 公司研制的一种灭活的多价全菌疫苗<sup>[19]</sup>, 用于预防和治疗幽门螺杆菌感染, 2003 年美国 FDA 批准其进入 II 期临床研究。Antex 计划进行 2 项临床试验对此疫苗进行评价, 1 项试验将评价疫苗的预防性作用, 另 1 项临床试验将评价疫苗的疗效。在其临床前的预防性动物实验模型中, HELIVAX 显示出 100% 的预防 *Hp* 感染的作用。2 项临床试验将探讨疫苗引起的黏膜免疫应答作用及减少被感染的受试患者体内 *Hp* 的生物负荷量。2 项试验均是随机开放标签试验, 共有 80 名患者在美国多个临床中心接受相关的研究。已完成的 I 期安全性及免疫原性试验显示, 疫苗不会引起严重不良反应, 无论在未感染还是已感染无症状患者体内, 疫苗均可引起对 *Hp* 的免疫应答。有关 II 期临床研究的结果目前还未见报道。

#### 1.6.3.2 以沙门菌为载体的基因工程 *Hp* 疫苗

以沙门菌为载体的基因工程 *Hp* 疫苗目前仅有志愿者人体试验文献报道, 未见获准进入临床研究的报道。

1999 年 Di Petrillo 等报道以表达 *Hp* 尿素酶的减毒沙门菌免疫志愿者, 未观察到严重副作用, 志愿者们获得了良好针对沙门菌抗原的黏膜免疫应答, 但对 *Hp* 尿素酶没有应答。2000 年, Angelakopoulos 等用鼠伤寒杆菌为载体重复同样的研究, 同样表明安全性良好, 且 6 个志愿者中 3 人产生了抗 *Hp* 尿素酶抗体<sup>[20]</sup>。Bumann 也进行了相似的

人体志愿者试验。

### 1.6.3.3 以尿素酶作为抗原制备的 *Hp* 疫苗

1999年 Gastroenterology 报道了由 Orovax 公司资助开发、Michetti 等研制的重组尿素酶(rUre)加LT的治疗性 *Hp* 疫苗的临床试验<sup>[12]</sup>。26个志愿者(*Hp* 感染阳性)被随机进行双盲试验,每隔1周口服 rUre+LT,其剂量分别为180、60和20 mg rUre和5 μg LT,共4次,同时设立LT组与安慰剂组。在免疫后各周进行毒副作用及免疫反应评估,分别于免疫后第1个月及第6个月使用内镜采集标本评估组织学及细菌定量培养试验。结果:试验组抗 rUre IgA 水平均显著增加,但在LT及安慰剂组未见任何变化;与安慰剂组比较,试验组抗 Ure IgA ASC 数量明显增加[(38.9 ± 13.6) × 10<sup>6</sup>/L vs (5.4 ± 3.1) × 10<sup>6</sup>/L, P=0.018],免疫后可明显减少 *Hp* 菌落定植数,其中低剂量尿素酶组(20 mg)细菌数量减少更多,但未观察到完全清除 *Hp* 的效果。此外,66%(16/24)试验者发生因LT引起的腹泻。该研究的最后总结为重组 *Hp* 尿素酶/LT对于 *Hp* 感染者来讲具有良好的耐受性及免疫原性,但需进一步改进与调整抗原与佐剂配伍方式。

2008年,Novartis 报道完成了 NAP、CagA 和 VacA 三亚单位(简称HP3)的I期临床研究(NCT00613665),并开始开展有效性临床研究。

另外,Acambis/Aventis Pasteur 公司宣布,其开发的以尿素酶作为抗原制备的 *Hp* 疫苗也进入了II期临床阶段,Iomai 公司开发的应用靶控输注(target-controlled infusion, TCI)技术给药的幽门螺杆菌疫苗进入了I期临床阶段,但未见上述2家公司的临床试验资料。

### 1.6.4 国内幽门螺杆菌疫苗研究

中国作为 *Hp* 高感染率和胃癌高发区以及 *Hp* 疫苗最大的潜在市场,若成功研制具有自主知识产权的 *Hp* 疫苗,成为防治 *Hp* 感染的生物制剂,具有十分重大的社会效益和经济效益。

由于 *Hp* 大规模培养困难,粗制抗

原中可能存在有潜在致癌物等有害成分,大大制约了全菌疫苗的研究进展。基因工程亚单位疫苗成分明确、安全,易于生产、质控及应用,是 *Hp* 疫苗的一个主攻方向。

第三军医大学与安徽芜湖康生物科技有限公司从1995年起开展 *Hp* 基因工程疫苗的研究。由于 *Hp* 在感染方式、免疫应答、致病机制等方面具有与众不同的特殊性, *Hp* 自然感染人体主要诱发以Th1型炎症反应为主的免疫应答,在血液中产生高水平IgG抗体,却无法防止 *Hp* 对人体的再感染,诱导以特异性sIgA抗体为主的Th2型黏膜免疫应答可以有效地预防 *Hp* 感染。本项目运用生物信息学表位预测、表位肽合成与步移、免疫DC细胞负载特异性抗原鉴定等技术从 *Hp* 的1600余个候选疫苗抗原中筛选鉴定出了外膜蛋白UreB的免疫保护性抗原优势表位。在此基础上,提出了“分子内佐剂黏膜疫苗”设计原理及其技术体系,借助计算机辅助设计与疫苗学理论,综合分析黏膜佐剂LTB与疫苗抗原活性中心的空间构象,优化佐剂与疫苗相连接的linker,避免空间位阻产生,确保所构建重组疫苗既具有良好免疫原性又有高效黏膜免疫佐剂活性,构建筛选获得了疫苗抗原(UreB)与佐剂(LTB)天然一体的重组 *Hp* 亚单位分子内佐剂疫苗工程菌株,具有易于质控、生产方便、成本低等优点。每一个疫苗抗原分子均有与之相连的分子内黏膜佐剂,从而特异性地高效激发Th2型局部黏膜免疫应答,产生特异性抗体,发挥预防 *Hp* 感染的功效。进一步完成了高密度发酵及疫苗蛋白的大规模纯化工艺,建立了长期、稳定的动物感染模型,按照I类新生物制品要求完成了相关的临床前研究,2003年5月“口服重组幽门螺杆菌疫苗”获准进入I、II期临床试验(临床批件号2003L01782)。2003年8月—2004年3月完成了I、II期临床研究,2004年12月获准进入III期临床试验(临床批件号2004L04702号)。2004年12月至2006年9月,对该制品完成了III期临床试验。2009年,中国自主研

制的口服重组幽门螺杆菌疫苗获国家食品药品监督管理局颁布的新药证书,成为世界上首个获批的幽门螺杆菌疫苗。

### 1.6.5 口服重组幽门螺杆菌疫苗

#### 1.6.5.1 口服重组幽门螺杆菌疫苗的成分、性状、接种对象等

1) 成分和性状。该疫苗主要成分为基因工程技术制备的幽门螺杆菌尿素酶亚单位与免疫佐剂的融合蛋白(下称疫苗蛋白),经纯化后,加入稳定剂冷冻干燥制成。本品疫苗为白色疏松体,加水复溶后为澄清溶液。

2) 接种对象。本品适用于6~15岁未感染幽门螺杆菌的易感人群。

3) 作用与用途。目前流行病学及病原学研究证实,幽门螺杆菌是慢性胃炎和消化性溃疡(胃溃疡、十二指肠溃疡)的重要致病因子,是胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤重要的致病因素,与胃癌的发生有关。1994年世界卫生组织将幽门螺杆菌列为一级致癌因子(carcinogen grade I)。

接种本疫苗后,可刺激机体产生抗幽门螺杆菌的免疫力,用于预防幽门螺杆菌感染及其所致相关疾病。

4) 免疫程序和剂量。本品推荐免疫程序:于第0、14和28 d各免疫接种1剂,共3剂。

用法用量:服用本品前,先须口服80 mL胃酸中和液,然后立即口服30 mL疫苗。

目前本疫苗的持续保护时间、加强免疫的时间和剂量尚未确定。

#### 1.6.5.2 口服重组幽门螺杆菌的I、II、III期临床试验有效性

共有5000余人参加本疫苗的I、II、III期临床试验。其中关键性III期临床试验中,对入选6~15岁未感染幽门螺杆菌的4000余例儿童进行了随机双盲安慰剂对照的临床研究。

以本疫苗预防幽门螺杆菌感染作为主要有效性指标进行评价,同时观察疫苗的免疫原性及其安全性。幽门螺杆菌感染的诊断按中华医学会消化病分会2003年“幽门螺杆菌共识意见”中的科研诊断标准实施,定义为同时符

合:1)  $^{13}\text{C}$  尿素呼气试验阳性;2) 血清幽门螺杆菌抗体检测阳性。

在Ⅲ期临床试验中,本品预防幽门螺杆菌感染1年期的保护效力FAS集和PPS集点估计值均为71.8%(95%CI: 50%~85%);免疫后1年试验组感染率/对照组感染率RR(95%CI)结果均为0.28(0.15~0.50),感染率组间比较有统计学显著性差异( $P<0.0001$ )。提示本品与安慰剂相比可降低幽门螺杆菌感染的发生率。

试验中还约800名(PPS集)受试者进行了免疫原性评估,采用ELISA法分别测定了血清UreB特异性IgG抗体和唾液UreB特异性sIgA抗体。在本次试验中将1:200作为血清UreB特异性IgG抗体保护性水平的预测标准,将1:8作为唾液UreB特异性sIgA抗体保护性水平的预测标准。3针免疫后12个月时,试验疫苗组特异性血清IgG抗体和唾液sIgA抗体的阳转率与安慰剂对照组相比有统计学显著性差异。

#### 1.6.5.3 口服幽门螺杆菌疫苗接种的安全性

共2718名6~15岁的健康儿童服用本品,参加了I、II、III期临床试验。按国际医学科学组织委员会(CIOMS)不良反应发生率的分类,即很常见( $\geq 10\%$ )、常见( $\geq 1\%$ 且 $<10\%$ )、偶见( $\geq 0.1\%$ 且 $<1\%$ )、罕见( $\geq 0.01\%$ 且 $<0.1\%$ )、非常罕见( $<0.01\%$ )进行描述。主要不良反应:全身性不良反应偶见发热、头晕、头痛;局部胃肠道的不良反应偶见呕吐、腹胀、腹痛。

在Ⅲ期临床试验全程服疫苗期间及免疫后4周的随访过程中,试验组有25例共发生44次与研究疫苗有关的不良事件,发生率为1.13%。以严重程度递减方式表述为:

全身性不良反应:偶见发热(0.36%)、头痛/头晕(0.36%);

胃肠道的不良反应:偶见呕吐(0.41%)、腹胀(0.32%)、腹痛(0.18%)。

在临床研究中观察到的以上不良反应程度均为轻度,未观察到严重的全身不良反应和局部(胃肠道)不良反应。

#### 1.6.5.4 口服重组幽门螺杆菌疫苗的检定和质量控制

口服重组幽门螺杆菌疫苗主要分为重组表达的幽门螺杆菌尿素酶亚单位(UreB)与大肠杆菌不耐热肠毒素B(LTB)的融合蛋白(rLTB-UreB),分子量约75 kD,等电点为5.0~7.0,最大吸收峰波长为280 nm $\pm$ 3 nm。rLTB-UreB能有效地刺激机体产生UreB的抗体,并表现出良好的抗原性和结合GM1神经节苷脂的活性。

口服重组幽门螺杆菌疫苗原液和半成品以及成品的质量检测方法和标准详见表3和表4。

## 2 问题与展望

虽然幽门螺杆菌疫苗研究已取得突破性进展,但其保护率仍有待进一步提高。未来研究将主要围绕以下方面进行:1)充分利用已完成测序的幽门螺杆菌基因组信息和蛋白质组学及生物信息学技术,挖掘和筛选特异性更高、保护性更强的抗原;2)寻找安全性更高和更能激发人体胃肠道黏膜免疫应答的新型佐剂;3)应用纳米等技术,研制靶向、缓释的疫苗投递方式,增加有效性维持时间;4)从细菌、宿主2方面研究幽门螺杆菌感染与免疫的机制,为新一代幽门螺杆菌疫苗研制提供科学的理论基础。

表3 口服重组幽门螺杆菌疫苗原液和半成品质量检测方法和结果

检测项目		检测方法	检测结果	
原液检定	分子量	SDS-PAGE电泳 (银染和考马斯亮蓝染色)	75 kD $\pm$ 10%	
	纯度	SDS-PAGE电泳 (银染和考马斯亮蓝染色)	>80%	
		RP-HPLC	>80%	
	等电点	薄板电泳	5.0~7.0	
	一般理化性质	紫外光谱扫描分析	连续紫外分光光度吸收	
	特异性分析	鉴别试验(抗原性)	免疫印迹法	阳性
	肽图分析	胰蛋白酶HPLC法	3批样品图形一致	
	N末端氨基酸序列	Edman降解法	与预期一致	
	残余物质检测	残余氨苄西林	抑菌法	阴性
	半成品检定	无菌试验	培养瓶法	无菌

表4 口服重组幽门螺杆菌疫苗成品质量检测方法和结果

检测项目	检测方法	检测结果
一般特性	直接观察	白色或微黄色疏松体
外观、溶解度	直接观察	加水溶解后无不溶性沉淀物
酸碱度	pH仪测定	pH: 10.0 $\pm$ 0.5
水分测定	费休法	<3%
蛋白含量	Lowry法	标示量的80%~150%
无菌试验	培养瓶法	无菌
鉴别试验(抗原性)	免疫印迹法	阳性
免疫力试验	BALB/c小鼠动物实验	免疫保护率>80%

## 参考文献

- [1] Warren J R, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis[J]. Lancet, 1983, 1: 1273-1275.
- [2] Alm R A, Ling L S, Moir D T, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. Nature, 1999, 397(6715): 176-180.
- [3] Guo Y, Guo G, Zou Q, et al. Genome of *Helicobacter pylori* strain XZ274, an isolate from a tibetan patient with gastric cancer in China[J]. Journal of Bacteriology, 194(15): 4146-4147.
- [4] 范工学, 夏华向. 幽门螺杆菌感染——基础与临床[M]. 长沙: 湖南科学出版社, 1997.
- [5] 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床[M]. 3版. 北京: 中国科学出版社, 2009.
- [6] 池肇春. 幽门螺杆菌及其相关疾病进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2008.
- [7] Eidt S, Stolte M. The significance of *Helicobacter pylori* in relation to gastric cancer and lymphoma[J]. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 1995, 7(4): 318-321.
- [8] Shi Y, Liu X F, Zou Q M, et al. *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice[J]. Journal of Immunology, 2010, 184(9): 5121-5129.
- [9] 董明庆. 董明庆. 临床检验病原生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [10] Czinn S J, Nedrud J G. Oral immunization against *Helicobacter pylori*[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(7): 2359-2363.
- [11] Chen M, Lee A, Hazell S. Immunisation against gastric *Helicobacter* infection in a mouse/*Helicobacter felis* model[J]. Lancet, 1992, 339(8801): 1120-1121.
- [12] Marchetti M, Arico B, Burroni D, et al. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease[J]. Science, 1995, 267(5204): 1655-1658.
- [13] Del Giudice G, Malfertheiner P, Rappuoli R. Development of vaccines against *Helicobacter pylori*[J]. Expert Review of Vaccines, 2009, 8(8): 1037-1049.
- [14] Rupnow M F, Chang A H, Shachter R D, et al. Cost-effectiveness of a potential prophylactic *Helicobacter pylori* vaccine in the United States[J]. Journal of Infectious Diseases, 2009, 200(8): 1311-1317.
- [15] Ikewaki J, Nishizono A, Goto T, et al. Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection[J]. Microbiol Immunol, 2000, 44(1): 29-39.
- [16] Banerjee S, Medina F A, Nichols R, et al. Safety and efficacy of low dose Escherichia coli enterotoxin adjuvant for urease based oral immunisation against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers[J]. Gut, 2002, 51(5): 634-640.
- [17] Sougioultzis S, Lee C K, Alsahli M, et al. Safety and efficacy of *E. coli* enterotoxin adjuvant for urease-based rectal immunization against *Helicobacter pylori*[J]. Vaccine, 2002, 21(3-4): 194-201.
- [18] Kotloff K L, Szein M B, Wasserman S S, et al. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(6): 3581-3590.
- [19] Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: A phase I study[J]. Gastroenterology, 2008, 135(3): 787-795.
- [20] Angelakopoulos H, Hohmann E L. Pilot study of phoP/phoQ-deleted Salmonella enterica serovar typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(4): 2135-2141.

(责任编辑 王媛媛)