

抗幽门螺杆菌递药策略的研究进展

陈小楠, 孙莹莹, 李彭宇, 饶义琴, 于世慧, 胡海燕*

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 可引发多种消化道疾病甚至胃癌。 *H. pylori* 全球感染率超过 50%, 其耐药性持续升高导致根除率不断下降, 进而促使大量顽固性感染发生, 严重威胁人类健康。目前临床上以增加抗生素联用种类或提高抗生素剂量为主的应对策略难以获得满意的疗效。本文总结了 *H. pylori* 的临床治疗方案, 分析了 *H. pylori* 感染特点及其难根除的原因, 重点介绍了提高 *H. pylori* 清除率的药物递送策略, 如提高胃内药物浓度 (胃酸稳定型)、提高药物在 *H. pylori* 定植部位的浓度 (胃滞留型、*H. pylori* 靶向型)、克服 *H. pylori* 耐药性 (金属纳米粒、抗生物被膜制剂) 及增强宿主免疫应答 (疫苗制剂) 等。细胞膜仿生和噬菌体等新型递药系统虽然报道较少, 但展现了较好的应用前景。本综述为提高 *H. pylori* 根除率的治疗策略的开发和应用提供参考与借鉴。

关键词: 幽门螺杆菌; 细菌感染; 耐药; 根除; 药物递送系统

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2495-10

Advances in drug delivery strategies against *Helicobacter pylori*

CHEN Xiao-nan, SUN Ying-ying, LI Peng-yu, RAO Yi-qin, YU Shi-hui, HU Hai-yan*

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) can cause a variety of digestive tract diseases, the serious may develop into gastric cancer. Nowadays, *H. pylori* infection rate exceeds 50%, and its eradication rate is declining due to the continuous increase of drug resistance, leading to the occurrence of plenty of stubborn infections, which seriously threaten human health. At present, it is difficult to achieve satisfactory curative effect by increasing the types of antibiotics combination or increasing their dose. In this review, the clinical treatments of *H. pylori* were introduced. Proceed from the characteristics and pathological background of *H. pylori* infection that makes *H. pylori* difficult to eradicate, the research advances of drug delivery strategies for improving *H. pylori* eradication rate were reviewed, such as strategies that could increase drug concentration in stomach (e.g. drug delivery systems with gastric acid-stabilized ability), increase drug concentration in *H. pylori* colonization sites (e.g. drug delivery systems with gastric retention or *H. pylori* targeted abilities), overcome *H. pylori* resistance (metal nanoparticles, anti-biofilm delivery systems), enhance host immune response (vaccine preparation) and so on. Novel drug delivery systems, such as cell membrane coating technology and phage therapy, are comparatively rare in the field of anti-*H. pylori*, but have broad application prospects. This review would provide reference for the development and application of therapeutic strategies to improve *H. pylori* eradication rate.

Key words: *Helicobacter pylori*; bacterial infection; drug resistance; eradication; drug delivery system

收稿日期: 2021-03-31; 修回日期: 2021-04-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773659, 81973264); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019A1515011954, 2020A1515010593, 2021A1515012621).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-39336119, E-mail: lsshhy@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0471

1 幽门螺杆菌概述

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是一种螺杆菌形状、微需氧的革兰阴性菌, 可定植于胃上皮细胞的腔表面, 由 Barry Marshall 和 Robin Warren 在 1982 年首次分离得到^[1]。最新资料表明, *H. pylori* 全球感染率

超过 50%，尤其在公共卫生条件较差的地区感染率更高。全球范围内 *H. pylori* 感染率最高的地区分别是非洲、南美洲及西亚，分别高达 70.1%、69.4% 及 66.6%^[2]。

H. pylori 持续性地定植于人胃及十二指肠黏膜，通过释放空泡毒素 (VacA)、细胞毒素相关基因 A 蛋白 (CagA) 等毒力因子造成胃上皮细胞的空泡变性、非正常增殖分化等直接损伤，以及诱发胃黏膜炎症导致间接损伤，继而引发相关的胃部疾病。大量研究表明，*H. pylori* 是消化性溃疡、慢性胃炎及胃恶性肿瘤的主要致病因素之一。早在 1994 年，*H. pylori* 就被世界卫生组织列为 I 级致癌因子，*H. pylori* 相关性胃癌约占所有胃恶性肿瘤的 60%。Kyoto global 共识报告指出，*H. pylori* 感染是一种疾病状态，除非有抗衡因素，否则应接受根除治疗^[3]。

2 幽门螺杆菌临床疗法及难根除的原因

用于治疗 *H. pylori* 感染的药物主要分为 3 类：抗生素、质子泵抑制剂 (proton-pump inhibitor, PPI) 及铋剂。目前临床常用治疗方案是将这 3 种类型药物以合适的比例配伍使用，并设置适宜的给药间隔，以期达到理想的清除效果。

2.1 临床疗法

2000 年，欧洲 Maastricht V/Florence 共识报告^[4]提出的 *H. pylori* 根除方案是由 PPI、阿莫西林和克拉霉素或甲硝唑组成的标准三联疗法。然而，甲硝唑和克拉霉素耐药菌株的出现使标准三联疗法的根除率不断下降。为此，全球各地区出台了新的应对策略，最具代表性的 3 个用药指导原则是 2016~2017 年期间发布的加拿大 Toronto 共识^[5]、欧洲 Maastricht V/Florence 共识^[6] 及美国 ACG 共识^[7]。3 个共识指出，当克拉霉素耐药率低于 15% 时，推荐使用克拉霉素三联疗法 (PPI+克拉霉素+抗生素) 作为一线用药；而当发生克拉霉素和甲硝唑双耐药时，推荐使用含有铋剂的四联疗法 (铋剂+PPI+两种抗生素)。其中，Maastricht V/Florence 共识报告推荐在克拉霉素耐药率 >15% 的地区，使用铋剂四联疗法或伴同疗法 (PPI+克拉霉素+甲硝唑+阿莫西林，疗程 10 天)，其中优先使用铋剂四联疗法。

在我国，虽然 *H. pylori* 对克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的耐药率有一定的地区差异，但总体呈现上升趋势，且 3 种抗生素的耐药率均大于 20%，甚至产生二重、三重耐药。因此，我国目前推荐铋剂四联疗法作为主要的经验性治疗根除方案^[8]。铋剂四联疗法有效提高了 *H. pylori* 根除率。

为了提高患者服药依从性，将抗生素和铋剂置于同一胶囊中的新型复方制剂 Pylera (含枸橼酸铋钾 140 mg、甲硝唑 125 mg、四环素 125 mg) 于 2006 年 9 月

被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市，使用时需联合 PPI (如奥美拉唑) 组合成 10 天的治疗方案。相较于铋剂四联方案，Pylera+PPI 服用更方便，依从性更高。2011 年，欧洲的一项关键性临床试验证实，Pylera+PPI 根除率超过 90%，可作为根除 *H. pylori* 的一线疗法^[9]。为了更好地解决克拉霉素疗法高耐药率而导致的疗效下降，FDA 于 2019 年批准 Talicia 胶囊 (含奥美拉唑镁 10 mg、阿莫西林 250 mg、利福布汀 12.5 mg) 用于治疗 *H. pylori*，这是 FDA 批准的唯一一个以利福布汀为基础的 *H. pylori* 疗法。为了减少后续耐药菌的产生，保持 Talicia 的有效性，Talicia 仅用于治疗或预防已证实或高度怀疑由 *H. pylori* 引起的感染。临床研究数据显示，Talicia 中利福布汀耐药率为零，对 *H. pylori* 有较高根除率。

2.2 幽门螺杆菌难根除的病理生理机制

如图 1 所示，*H. pylori* 主要定植在人胃内，其外膜表面的尿素酶能将环境中的尿素分解为氨和二氧化碳，进而形成“氨云”围绕在 *H. pylori* 表面，营造 *H. pylori* 周围接近中性的微环境，保护 *H. pylori* 免受胃酸侵蚀。与此同时，大多数抗菌药物在胃内的极端强酸环境下活性降低甚至失活。

除了能对抗极酸的 pH 环境，*H. pylori* 也能应对周期性胃排空。这是因为 *H. pylori* 依靠其螺旋形态与有力的鞭毛可以持续地运动，并穿透接近 200 μm 的胃黏液层后锚定于胃黏膜上皮细胞表面 (偏中性 pH 环境)，不仅有效避免了胃酸侵蚀，还显著降低了胃排空的影响。相反地，定期的胃排空却使抗菌药物很难长时间滞留于胃内，降低了其在感染部位的蓄积浓度。由于 *H. pylori* 定植在黏液层深处，机械隔绝了抗菌药物对菌体的有效接触，使药物难以发挥药效，进一步增大了根除胃内 *H. pylori* 的难度。

此外，*H. pylori* 菌体之间常相互交换 DNA，导致了高基因重组概率及高变异率，从而使 *H. pylori* 在持续感染中产生高度可变的菌株^[10]。*H. pylori* 基因突变是其产生耐药性的重要原因。因此，即使抗菌药物在胃内感染部位能达到常规有效治疗的浓度阈值，耐药菌株对抗菌药物敏感性的降低同样使抗菌药物无法达到理想的杀菌效果。此外，*H. pylori* 感染一般是慢性且持续的，长期感染易形成生物被膜。Stark 等^[11]于 1999 年首次证实 *H. pylori* 具有形成生物被膜的能力。当 *H. pylori* 感应到外界的不利环境时，会嵌入自身分泌的胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 内形成多细胞的三维结构，即生物被膜。Yonezawa 等^[12]研究发现，*H. pylori* 形成生物被膜后会增强其对克拉霉素的耐药程度：当 *H. pylori* 形成成熟生物被膜

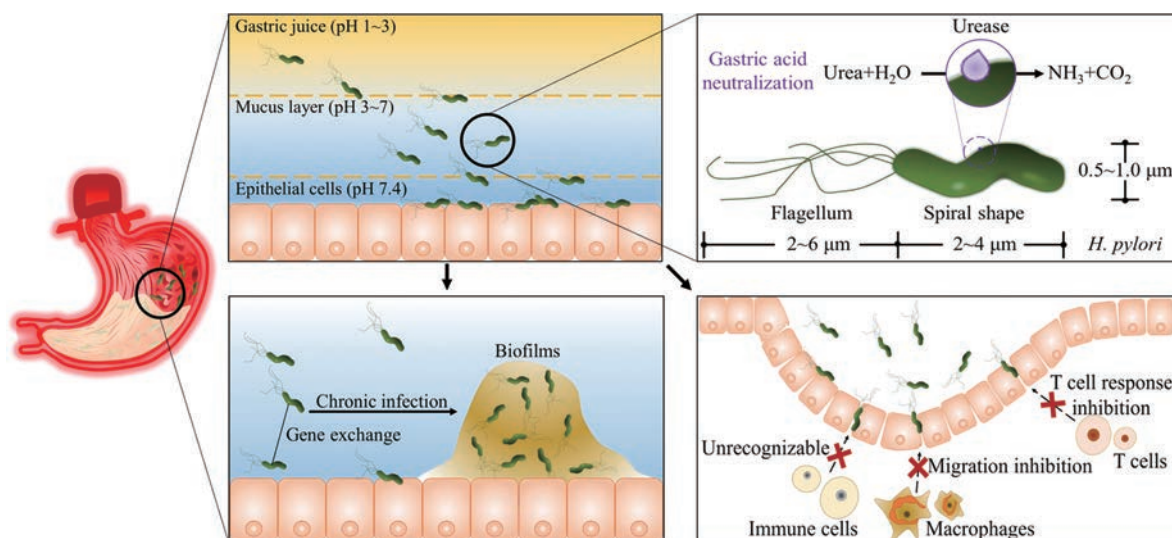


Figure 1 Pathophysiological mechanism of stubborn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infections. *H. pylori* can survive and colonize in human body for a long time by fighting gastric acid environment, periodic gastric emptying, evolving highly mutated strains, forming bacterial biofilms, escaping immune and so on, eventually leading to stubborn *H. pylori* infections

后,克拉霉素的最小抑菌浓度(MIC)可升高16倍。

由于药物治疗很难确保完全杀灭*H. pylori*,残余的病原菌可导致反复且顽固性感染。正常情况下免疫细胞、抗体等参与机体对*H. pylori*感染的免疫识别与应答,可以清除体内少量的残余菌。然而,*H. pylori*可以通过改装其外膜蛋白来逃避机体的识别、下调免疫细胞的迁移和摄取、促使巨噬细胞凋亡、抑制T细胞免疫应答等多种途径,成功逃避宿主的免疫应答,从而导致长期定植并引起持续性感染。因此,恢复机体对*H. pylori*的免疫应答对提高*H. pylori*根除率极为重要。

3 提高幽门螺杆菌清除率的药物递送策略

虽然计算机深层神经网络、基因挖掘等新技术的发展为研发新抗生素提供了新的思路和高效的途径,但新抗生素研发的速度和种类仍远不能满足临床的需求^[13]。现阶段,临床*H. pylori*三联或四联疗法均涉及抗生素较长时间的应用,这不仅易引发菌群失调及多重感染,还会加速和加重多重耐药细菌的产生,这是由于抗生素在杀灭病原菌的同时也能筛选有相应抗性的病原菌甚至诱导发生基因突变,即新抗生素的成功研发只能暂时控制感染,而无法阻挡耐药性的发展,使*H. pylori*治疗面临严峻挑战。

基于目前清除*H. pylori*临床治疗方案的局限性及*H. pylori*感染特点,构建适宜的递药系统实现已有抗菌药物在感染部位的高效递送,相对于新化合物的发现及新复方的探索,是相对低风险高回报的关键平台技术,一经建成可实现批量药物的高效递送。依据*H. pylori*感染难以根治的病理生理机制(如抗菌药物对胃酸不稳定导致药物失效、*H. pylori*生物被膜对

抗菌药物抗性强并可进行免疫逃逸等),综述了提高*H. pylori*清除率的抗菌药物的高效递送系统(图2)。

3.1 提高药物在胃内的浓度

虽然*H. pylori*体外对很多抗菌药物敏感,但大多数抗菌药物在酸性环境下不稳定,胃酸成为阻碍*H. pylori*根除的关键障碍。目前临床上使用PPI减少胃酸分泌以增加抗菌药物在胃内的稳定性。然而,长期使用PPI可能导致低镁血症,增加痉挛和心律不齐的风险。因此,设计对胃酸稳定的递药系统,可以提高药物在胃内的稳定性而规避使用PPI带来的风险。

pH敏感材料在口服递药系统中有广泛且良好的应用前景。Su等^[14]合成了聚谷氨酸-精氨酸的复合多肽,这种多肽在不同pH环境中呈现不同的形态从而控制药物释放。当pH 2.5(胃液&空腹状态)时,多肽自组装形成的纳米粒呈现紧凑的完整球形,阿莫西林几乎不释放;而当pH 7.0(*H. pylori*感染部位),多肽纳米粒呈现舒展状态,其松散的结构促进阿莫西林快速释放。这种多肽纳米粒对阿莫西林的保护作用及控制释放使其对*H. pylori*生长的抑制率比游离阿莫西林高约5.1倍。Thamphiwatana等^[15]将壳聚糖修饰的金纳米粒(pKa ≈ 6、10 nm)附着在载多西环素的阴离子脂质体(70 nm)的外表面。在胃酸环境下,金纳米粒通过异种电荷相互吸引自发地结合在阴离子脂质体表面,有效地延缓药物释放。一旦到达中性pH环境,金纳米粒表面电荷降低使其脱离脂质体,暴露出载药脂质体,后者通过与*H. pylori*细胞膜融合释放药物。与游离多西环素相比,金纳米粒包裹的脂质体对*H. pylori*显示出更强的抗菌效果。

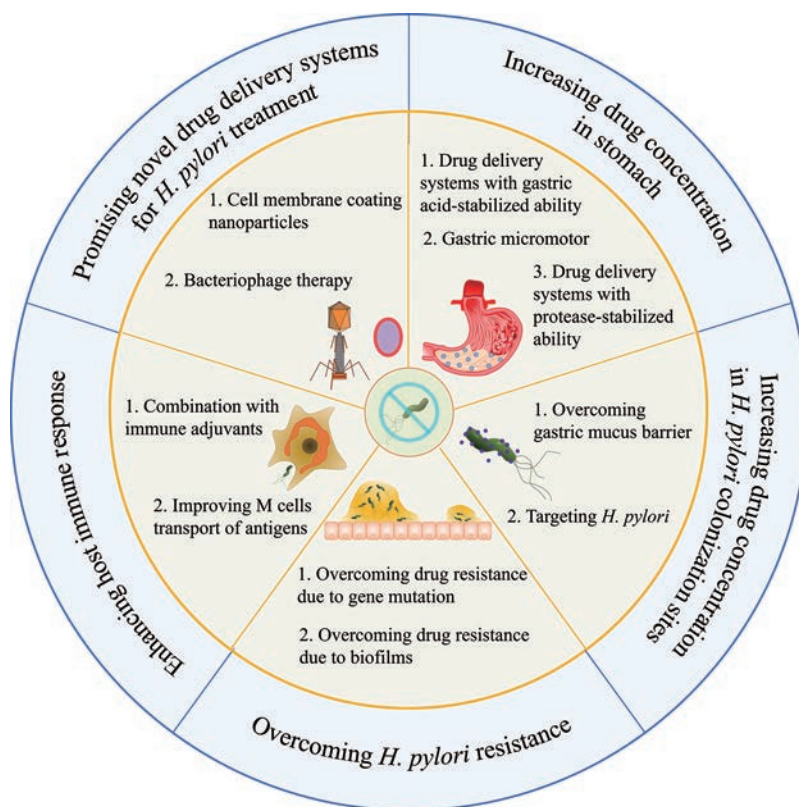


Figure 2 Drug delivery strategies for improving *H. pylori* clearance rate. Strategies that increase drug concentration in stomach, increase drug concentration in *H. pylori* colonization sites, overcome *H. pylori* resistance and enhance host immune response can improve *H. pylori* clearance rate. Some promising novel drug delivery systems also have broad application prospects in *H. pylori* treatment

新兴的合成微马达可动态响应胃酸环境。Li等^[16]报道的基于镁的微马达可通过快速消耗胃内局部质子来自主中和胃酸,并转化为推进力推动其在胃内的前进;而微马达诱导的胃酸中和还可进一步触发其表面覆盖的pH敏感聚合物Eudragit®L100-55涂层载药的响应释放。类似地,de Avila等^[17]将载克拉霉素的聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]涂层和壳聚糖涂层(最外层)依次覆盖于镁核表面,利用镁核迅速消耗质子,实现在使用微马达20 min内将胃内pH值提高到中性,从而提高克拉霉素的抗菌作用,显著减少了小鼠胃内*H. pylori*负荷。与PPI的酸抑制相比,这些微马达只是暂时中和了局部的胃酸环境而没有阻断质子泵的功能,减少了对胃正常功能的干扰,消除了常规PPI使用可能带来的毒副作用。此外,与传统的pH响应型递药系统被动地响应周围环境来释药相比,这些微马达可自主调整其周围环境,达到触发载药释放所需的条件。因此,这些微马达具有中和胃酸和pH响应载药释放的双重功能,是极具前景的*H. pylori*治疗平台。

此外,微马达中的酸驱动力可转化为推动力,这种推进力可推动微马达前进,显著延长了微马达在胃内

的滞留。Esteban-Fernandez等^[18]制备得到一种具有空间分辨隔间的管状微马达,其包括后端锌发动机和由pH响应材料保护的载药舱,中间使用明胶间隔。这种多室微马达在胃酸环境下显示出强大的推进力,显著促进其在胃内的分布。与单室微马达相比,胃内滞留量增加了4倍,且没有显示出明显毒性。因此,微马达不仅可以提高药物在胃酸环境中的稳定性,提高其胃内的有效浓度,还可以提高其在胃内的滞留,进一步减少药物浓度的损失。

除了胃酸的影响外,胃内蛋白酶的存在会降解口服蛋白类药物,使其在胃内的有效浓度显著下降,无法达到治疗的阈值。在HP55/PLGA-CCF耐酸纳米粒{HP55[羟丙甲纤维素邻苯二甲酸酯(hydroxypropyl methyl cellulose phthalate, HPMCP)的一种特殊类型]对胃酸有高抵抗力,使*H. pylori*重组抗原CCF(CTB-UE-CF)在酸性环境下释放量接近零}的基础上^[19],Liu等^[20]选用聚氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)替换PLGA,构建了同时具备抗酸和抗蛋白水解特性的HP55/PBCA-CCF纳米粒。结果表明,HP55/PBCA-CCF纳米粒在模拟胃液(pH 1.2,胃蛋白酶)中孵育1 h后,仅13.4% CCF释放被降解,即纳米粒对CCF起到有效的保护作用,最终

CCF通过激发免疫应答减少了*H. pylori*的胃内定植。

3.2 提高药物在幽门螺杆菌定植部位的浓度

3.2.1 克服胃黏液屏障

胃蠕动加速了抗菌药物的排空,而*H. pylori*定植在黏液层下使抗菌药物更难到达作用部位,进一步削弱药物疗效。生物黏附和黏液穿透策略能通过克服胃黏液屏障来增强抗菌药物的递送。

3.2.1.1 生物黏附型递药系统 生物黏附聚合物通常是亲水凝胶性高分子材料,包含大量如羧基、羟基、酰胺和硫酸盐等易形成氢键的基团。用于胃黏液生物黏附的高分子材料有壳聚糖及其衍生物、麦醇溶蛋白、聚氰基丙烯酸烷酯 (polyalkylcyanoacrylate, PECA) 及卡波姆等。由于荷正电,壳聚糖及其衍生物能与带负电荷的黏液层发生静电相互作用而具有黏附特性。有些壳聚糖衍生物可与聚阴离子络合形成纳米粒,其在pH酸性环境下仍可保持黏附特性^[21]。麦醇溶蛋白的亲脂氨基酸残基通过疏水作用能与生物组织相互作用^[22],然而麦醇溶蛋白纳米粒容易受pH、温度和盐等因素的影响而引起聚集,从而影响其黏附性。

将不同功能的胃滞留体系结合可以达到更好的胃滞留效果。Rajput等^[23]以聚丙烯酰胺、羟丙基甲基纤维素E15LV和卡波姆934P为原料,通过模具制备了十字棱柱形的双功能型漂浮-黏附系统 (funicular cylindrical system, FCS),可同时递送制酸剂和抗菌药物。FCS有较高的比表面积,能很好地黏附在胃壁上且不易滑动,因此能在胃内停留较长时间。此系统装载克拉霉素后与雷尼替丁颗粒共同装入胶囊中,其中雷尼替丁被快速释放 (1 h, 98.8% ± 1.2%) 而抑制胃酸分泌,之后克拉霉素被缓慢释放 (8 h, 97.72% ± 0.4%) 用于杀菌,共同治疗*H. pylori*感染。

3.2.1.2 黏液穿透型递药系统 胃黏液层主要由疏水黏蛋白构成,是一种呈网络结构的生物黏弹性凝胶,厚度为50~300 μm,是阻碍抗菌药物递送至*H. pylori*定植部位的重要屏障。此外,胃壁上的黏液以4~6 h的周期不断更新,导致递药系统的实际黏附情况难以预测^[24]。而且,胃内容物高度水合,也降低了聚合物的黏附。另外,黏液成分、聚合物特性及疾病状态等因素也会影响体内黏附效果。由于*H. pylori*定植于黏液层下,因此,黏液穿透剂有助于药物到达感染部位从而提高清除率。

黏液穿透型制剂的挑战在于如何克服生理条件下黏液的不不断更新。根据黏液中主要成分黏蛋白的特性推测,表面亲水、荷负电及粒径较小的纳米粒能有效穿透黏液层。Zhang等^[25]基于黏液穿透策略,以负电荷材料为载体,通过静电吸附自组装技术制备修饰有聚

乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 的粒径约为150 nm纳米粒,内包载有*H. pylori*尿素酶B亚单位疫苗。结果显示,该纳米粒口服后能克服黏液屏障实现疫苗的有效递送。与表面带正电荷的壳聚糖纳米粒相比,PEG修饰的纳米粒减弱了其黏蛋白之间的相互作用,可有效穿透黏液层到达感染部位,进一步提高了对*H. pylori*的清除率。同理,Li等^[26]将荷正电的壳聚糖纳米粒包封于荷负电的脂质体内部,有效避免了壳聚糖与黏蛋白聚集,且在表面修饰PEG后进一步减弱了其黏蛋白的相互作用,显著提高了纳米粒的黏液穿透能力及对*H. pylori*的清除率。

除了构建表面亲水、荷负电及粒径较小的纳米粒外,外加磁场也可以促使递药系统有效地穿透胃黏液层而到达*H. pylori*感染部位。如Yang等^[27]制备的磁性纳米颗粒SPIO@APTES暴露在外加磁场中时,可显著增强在胃黏液层中的穿透,提高*H. pylori*清除率。结果显示,外加磁场作用10 min后,所有纳米颗粒均聚集于黏液层底部,表明所制备的磁性纳米颗粒的黏液穿透效率可以通过施加磁场来控制。类似地,Walker等^[28]模拟*H. pylori*运动穿过胃黏液层,制备表面固定化脲酶的磁性微螺旋系统。结果表明,外加磁场允许该系统在胃黏液层中有效推进,而表面固定化脲酶则可以显著提高微颗粒的流动性。

3.2.2 靶向幽门螺杆菌

根据*H. pylori*表面特性设计靶向*H. pylori*的递药系统,以期将大量药物快速递送至*H. pylori*定植部位,进而提高疗效。

*H. pylori*所有菌株均有尿素酶基因,其结构亚单位尿素通道蛋白转运体 (UreI) 已被用作设计抗*H. pylori*递药系统的有效靶点。Luo等^[29]报道,尿素修饰的壳聚糖 (ureido-conjugated chitosan, UCCs-2) 可以靶向至*H. pylori*特异表达的UreI。在此基础上构建的AMX-PLGA/UCCs-2纳米粒可经UreI介导靶向*H. pylori*。体内外实验结果显示,与游离药物和*H. pylori*非靶向纳米粒比较,*H. pylori*靶向纳米粒清除杀灭*H. pylori*的能力显著提高。类似地,Cong等^[30]将修饰有硬脂酸的羧甲基壳聚糖与尿素偶联,同样显示出了优异的*H. pylori*靶向性和抗*H. pylori*疗效。

诚然,配体修饰的递药系统能特异性地识别*H. pylori*细胞膜表面受体,不失为一种重要的靶向策略。然而,天然配体的稳定性差、免疫原性高等极大地影响了其靶向效率。分子印迹技术通过功能单体印迹模板分子形成初级聚合物后,脱模板最终形成印迹聚合物 (molecular imprinted polymers, MIPs),当MIPs再次遇到靶标 (模板分子) 时,会发生特定的结合,从而

实现特异性靶向。与天然配体相比, MIPs 具有制备可控、性质稳定和抗干扰能力强等优点。此外, MIPs 的合成成本低, 且其特异识别能力在室温下可保持数年。Han 等^[31]以长链脂肪酸修饰的 *H. pylori* 表面抗原片段 NQA 为模板分子, 利用反相微乳液聚合法制备表面分子印迹纳米粒 Myr-NQA-MIPs。结果显示, Myr-NQA-MIPs 与 *H. pylori* 的结合率高达 72.87%, 而非印迹纳米粒与 *H. pylori* 的结合率仅为 23.73%。基于此, Wu 等^[32]以 NQA 和阿莫西林钠为双模板, 制备了载阿莫西林钠的双分子印迹纳米粒 Dual-MIPs。结果表明, Dual-MIPs 不仅具有较强的 *H. pylori* 结合力, 还具有较高的体内 *H. pylori* 清除效果。小鼠给予 Dual-MIPs 后, 其在 *H. pylori* 感染小鼠胃内滞留时间延长, 并使 75% 的感染小鼠体内 *H. pylori* 转阴 (细菌培养和快速尿素酶实验)。而游离阿莫西林钠组仅 25% 的感染小鼠 *H. pylori* 转阴。

3.3 克服幽门螺杆菌耐药性

3.3.1 克服基因突变相关的耐药

目前临床 *H. pylori* 疗法主要是抗生素疗法。每种抗生素都有其特定的靶点, 当对应靶点发生结构改变时, 抗生素无法发挥其原有药效。 *H. pylori* 基因突变使其容易在感染中产生高度可变的菌株, 从而导致靶点单一的常用抗菌药物失效, 是 *H. pylori* 产生耐药的重要原因。将多靶点抗菌机制集成于递药系统中加以实现, 有望降低 *H. pylori* 耐药性, 提高清除率。

金属纳米粒可通过金属离子释放、氧化应激及非氧化应激等途径发挥抗菌作用^[33]。基于多种抗菌机制, 金属纳米粒能在较低浓度下起效, 并且不容易诱导产生耐药性。目前研究最广泛的金属纳米粒是银纳米粒, 其抗菌活性基团是带正电荷的 Ag^+ 。银纳米粒粒径小, 其优良的表面效应、量子尺寸效应及表面荷电等特性使银纳米粒的抗菌效果远高于普通银。不同粒径的银纳米粒抗菌效果不同, 抗菌效果随粒径的减小而增强。研究表明, 银纳米粒的抗菌活性不仅表现为抑制 *H. pylori* 的呼吸系统和电子传输链, 还表现在直接干扰 *H. pylori* 脲酶中的镍使脲酶失活, 进而发挥抗菌效果^[34]。

然而, 大多数金属纳米粒倾向于积聚在肾、肝、肺和脾等器官, 加上金属纳米粒对胃细胞系的毒性未被充分研究, 均限制了金属纳米粒在 *H. pylori* 治疗中的应用。值得一提的是, 氧化锌纳米粒 (ZnO NPs) 已被 FDA 批准符合一般公认安全认证 (generally recognized as safe, GRAS), 其对正常细胞是安全的。但 ZnO NPs 的表面能高, 极易在水中形成团聚体。Chakraborti 等^[35]使用聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 功能化 ZnO NPs (ZnO-PEI NPs), 大大地降低了 ZnO NPs 的表面能。ZnO-PEI NPs 对 *H. pylori* 甲硝唑耐药菌株有效,

其作用机制包括促使细胞内活性氧的产生及导致细胞膜和 RNA 损伤。

此外, 将金属离子、物理化学疗法及抗菌药物联合使用可产生协同作用进而增强对 *H. pylori* 的杀灭作用。Wu 等^[36]研究表明, 在中等的交流磁场作用下, 超低浓度的双功能金属磁性纳米粒 $\text{Mn}_{0.3}\text{Fe}_{2.7}\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 即可在局部有效沉积热量, 在体外有效抑制 *H. pylori* 的生长以及毒力因子的释放。与单独阿莫西林或空白金属纳米粒 (加热处理) 相比, 经负载阿莫西林的 $\text{Mn}_{0.3}\text{Fe}_{2.7}\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 处理后, *H. pylori* 存活率分别降低至其 1/7 和 1/5。其机制可能是加热损伤了 *H. pylori* 细胞膜, 增加了阿莫西林对 *H. pylori* 的渗透, 从而提高了对耐药菌株的杀伤作用。

3.3.2 通过清除生物被膜克服耐药

细菌形成生物被膜是细菌耐药的重要机制, 临床上常见的耐甲氧西林金葡菌和大肠杆菌等都容易形成生物被膜^[37]。自从在临床患者体内发现 *H. pylori* 生物被膜后, *H. pylori* 生物被膜引起的耐药问题成为关注的热点。研究表明, *N*-乙酰半胱氨酸、硫酸多糖和姜黄素等天然产物可以抑制 *H. pylori* 生物被膜的形成, 而海藻酸裂解酶可以通过破坏生物被膜结构达到清除 *H. pylori* 生物被膜的目的^[37]。Gurunathan 等^[38]研究证实, 银纳米粒具有抗 *H. pylori* 生物被膜活性, 而 *N*-酰基高丝氨酸乳糖酶稳定的银纳米粒可以显著抑制 *H. pylori* 生物被膜的形成, 推测可能与其抑制生物被膜的群体感应有关^[39]。

目前, *H. pylori* 生物被膜的研究更多是聚集于如何抑制生物被膜的形成, 而事实上临床面临的是患者体内已经形成成熟的 *H. pylori* 生物被膜, 即如何根除的问题。生物被膜在体内长期定植可引发顽固性感染久治不愈。笔者所在团队针对 *H. pylori* 的定植部位 (黏液层下) 以及生物被膜的生长周期, 首创程序式抗生物被膜策略, 简称“除膜四步曲” (biofilms eradication tetralogy), 见图 3 (1)、(2)、(3) 和 (4) 步骤: 药物穿透黏液层到达感染部位, 进而破坏生物被膜的结构, 使内部细菌充分暴露出来, 暴露的细菌由于恢复了对抗菌药物的敏感性从而更易被杀灭; 生物被膜结构破坏的同时也使抗菌药物更易进入生物被膜内部而发挥杀菌作用; 最后还需具有抑制残余菌再黏附的作用, 避免其再形成生物被膜。可预见的是, 该抗生物被膜策略并不局限于 *H. pylori*, 不涉及黏液屏障的生物被膜感染通过“除膜三步曲” (biofilms eradication trilogy) 也能得到有效清除, 思路如图 3 (2)、(3) 和 (4) 所示。

基于以上设计, 以磷脂和鼠李糖脂 (rhamnolipid, RHL) 为脂质外层、果胶硫酸酯聚合物和阿莫西林为亲

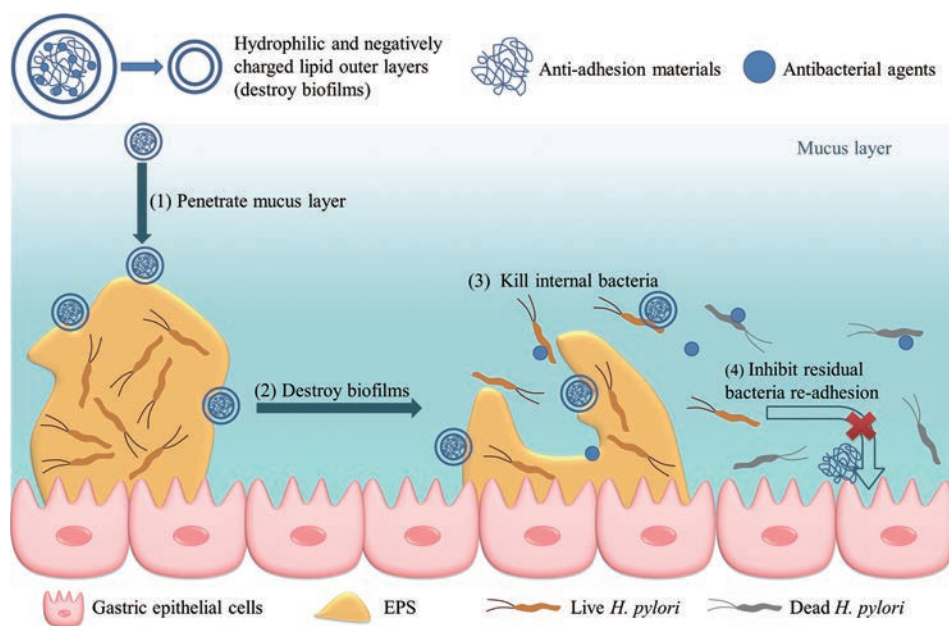


Figure 3 Schematic diagram of programmed anti-biofilms drug delivery strategy "biofilms eradication tetralogy". Drug delivery systems first penetrate mucus layer and effectively reach *H. pylori* infection sites, then destroy biofilms and kill the internal bacteria. Finally, by inhibiting residual bacteria re-adhesion, new biofilm formation can be avoided. EPS: Extracellular polymeric substances

水内核构建了脂质聚合物纳米粒。纳米粒脂质外层可与 *H. pylori* 生物被膜外部的 EPS 融合, 破坏生物被膜结构并暴露出内部细菌, 其脂质外层解体后释放阿莫西林杀灭暴露出的 *H. pylori*, 同时释放果胶硫酸酯抑制细菌再黏附, 从而阻断生物被膜的再形成。结果显示, 该脂质聚合物纳米粒能清除 80% 的 *H. pylori* 生物被膜^[40]。当采用单一脂质 RHL 构建脂质聚合物纳米粒的脂质外层时, *H. pylori* 生物被膜清除率超过 90%。且构建的脂质聚合物纳米粒表面亲水、带负电, 具有穿透黏液层作用, 可直达 *H. pylori* 定植部位^[26]。虽然 Yang 等^[27]将超顺磁性氧化铁纳米颗粒与药物共载制备成纳米粒达到了抗 *H. pylori* 生物被膜目的, 但体系较复杂, 需辅以磁场作用才能到达 *H. pylori* 感染部位。此外, 值得注意的是, *H. pylori* 感染往往伴随胃黏膜损伤, 与经典三联疗法相比, Shen 等^[41]构建的小檗碱衍生物与 RHL 构建的自组装纳米药物不仅能达到更高的 *H. pylori* 清除率, 还可显著减轻胃组织的炎症损伤。

3.4 增强宿主免疫应答

H. pylori 感染后虽能诱导宿主产生免疫应答, 但应答强度不足以根除 *H. pylori*, 且 *H. pylori* 能通过多种途径逃避宿主的免疫反应, 继而长期定植于宿主体内。因此, 增强宿主对 *H. pylori* 的免疫应答有利于提高 *H. pylori* 清除率。疫苗因保留了病原菌免疫原性的同时去除了病原菌的致病性, 成为增强宿主免疫应答安全且有效的途径。必须注意的是, 只有同时具备合

适的抗原、安全有效的佐剂及合理的递送系统 3 个条件时, 疫苗才能有效地刺激宿主产生免疫反应。为了实现 *H. pylori* 疫苗的高效递送, 可通过设计高效的疫苗递送系统来提高疫苗的免疫应答。

增加免疫佐剂后疫苗能诱导产生更广泛的黏膜免疫反应。Yang 等^[42]发现, 将 *H. pylori* 抗原 HpaA 与佐剂 CpG 联合经鼻腔给药可降低小鼠 *H. pylori* 定植量。而在此基础上制备的 HpaA 鼻内纳米乳能显著延长抗原在鼻腔的停留时间, 促进了其在鼻腔的摄取。同样地, 在联合 CpG 佐剂后, 该疫苗的保护作用得到进一步增强, *H. pylori* 定植量进一步降低^[43]。此外, Tan 等^[19]使用 HP55/PLGA 耐酸纳米粒包载双抗原表位-双佐剂疫苗, 口服接种后可观察到更高水平的 *H. pylori* 特异性 IgG、IgA 表达与 T 细胞浸润。

黏膜免疫应答对抵御经黏膜入侵的病原菌有重要作用, 将抗原直接接种到黏膜表面可有效诱导黏膜的免疫应答。其中, M 细胞负责胞吞抗原并将其跨黏膜转运, 递呈给树突状细胞, 激活后续免疫反应。因此, 改善抗原的 M 细胞转运及经黏膜转运能增强 *H. pylori* 疫苗的有效性。Chen 等^[44]研究发现, 与未改性的纳米粒相比, 海藻酸盐改性纳米粒渗透性增强, 具有更强的跨细胞转运能力。鉴于聚乙交酯丙交酯 (PLG) 可经过胃肠道被 M 细胞很好地吸收, Kim 等^[45]制备的载 *H. pylori* 裂解物 PLG 纳米粒可诱导小鼠体内产生较强的 *H. pylori* 特异性黏膜及全身反应。

随着重组DNA技术的发展, 益生菌作为疫苗的新型载体受到广泛关注。乳酸菌等具有良好的诱导宿主先天和获得性免疫的潜力, 被认为是理想的重组疫苗载体。Corthesy等^[46]评估了重组乳酸菌产生*H. pylori*脲酶B (Ure-B) 亚基以及递送至胃肠道的潜力。结果显示, 重组乳酸菌经口服给药后可以产生Ure-B特异性抗体使小鼠*H. pylori*负荷量减少。Zhang等^[47]将*H. pylori* HpaA基因的完整编码区克隆到乳酸菌中, 合成的工程菌株被诱导表达HpaA并用于小鼠口服疫苗接种。研究表明, 重组乳酸菌给药处理后, 小鼠血清中IgG水平明显高于对照组, 说明HpaA能有效地到达免疫部位, 刺激黏膜免疫系统, 从而引发体液免疫反应。

4 提高幽门螺杆菌清除率的新型递药策略

迄今为止, 有关抗*H. pylori*递药系统的研究不多。药剂学领域研究较热的递药系统在*H. pylori*上的应用也较少。

4.1 细胞膜仿生

天然细胞膜由于可延长体内循环时间, 具有同源靶向性等特性, 使其近年来在仿生纳米医学领域的应用受到广泛关注。比如将天然细胞膜作为外壳, 在其内核包载纳米粒, 从而使纳米粒具备天然细胞的生物学性质。细胞膜仿生纳米粒在肿瘤治疗领域倍受瞩目, 近年来在抗菌领域的应用研究也越来越多。如红细胞膜构建仿生纳米海绵吸附病原菌毒素因子、制备抗感染疫苗等。Angsantikul等^[48]将胃上皮细胞膜涂覆在负载克拉霉素的聚合物表面, 由于仿生纳米粒具有与胃上皮细胞相同的表面抗原, 当与*H. pylori*体外孵育时, 纳米粒优先黏附积聚在*H. pylori*表面而呈现出更好的治疗效果。

除宿主细胞膜仿生外, 病原菌细胞膜仿生纳米粒也能干扰病原菌与宿主的相互作用。病原菌细胞膜仿生纳米粒通过细胞膜上细菌黏附素蛋白与宿主细胞进行竞争性结合, 从而产生抗黏附的作用。Zhang等^[49]使用*H. pylori*外膜包裹PLGA纳米粒构建OM-NPs。结果显示, 预先使用OM-NPs处理能显著抑制*H. pylori*在胃上皮细胞表面的黏附, 且OM-NPs可与*H. pylori*竞争宿主细胞上的结合位点, 使黏附的*H. pylori*脱离, 具有显著的抗黏附效果。

4.2 噬菌体

噬菌体是一类能感染细菌等微生物的病毒总称, 能引起宿主菌的裂解。噬菌体通过尾部的尾丝特异性识别细菌表面的保守受体, 能与特定的病原菌结合。为提高噬菌体的抗菌能力, 基因工程及化疗药物偶联技术已用于噬菌体的改装修饰及药物递送。Cao等^[50]构建了修饰的丝状噬菌体M13, 使其表达的外壳蛋白

能与*H. pylori*细胞膜表面特异性抗原融合。结果显示, 重组噬菌体M13表现出杀菌效果, 特异性抑制了6种*H. pylori*菌株的生长; 且使用M13口服预处理后, 可显著降低*H. pylori*在小鼠胃中的定植。

目前抗*H. pylori*的噬菌体研究较少, 未见其作为药物载体在抗*H. pylori*领域的研究。噬菌体杀菌机制与抗菌药物完全不同, 且其与病原菌存在共同进化的途径。因此, 噬菌体疗法有望成为解决*H. pylori*多药耐药的重要途径。

5 总结与展望

*H. pylori*是胃癌的I类致癌因子, 60%的胃癌发生与*H. pylori*相关。围绕*H. pylori*的检测、诊断与治疗的指南/共识意见不断更新, 耐克拉霉素的*H. pylori*在2017年被世界卫生组织列入抗生素耐药重点病原体中的II类重点^[51]。然而, 相对金葡菌和铜绿假单胞菌等病原菌的治疗, 针对*H. pylori*清除治疗的研究较少, 但却极端重要。Kyoto global共识报告明确提出: 除非有抗衡因素, 所有*H. pylori*感染者都应该接受根除治疗^[5]。而全球不得不面对的现状是, 随着抗菌药物耐药性增强, *H. pylori*的根除率正在持续下降。

为了提高*H. pylori*的根除率, 临床方案优先选择耐药率较低的抗菌药物或药物组合。然而, 简单地增加抗菌药物的剂量和种类以及延长用药时长, 不仅会使毒副作用相应增加, 而且会使耐药范围扩大与耐药性提高。因此, 针对*H. pylori*的感染特点及其难以根治的病理生理机制来优化*H. pylori*根除方案至关重要。*H. pylori*通过多机制多路径能在宿主免疫、抗菌治疗等层层“打压”下存活下来, 其感染具有高度复杂性。本文总结了*H. pylori*的临床治疗方案, 分析了*H. pylori*感染特点及其难根除的原因, 重点介绍了提高*H. pylori*清除率的药物递送策略。药物递送策略主要围绕胃内极端环境、病原菌本身特性以及与宿主的关系展开, 如提高胃内药物浓度(胃酸稳定型)、提高*H. pylori*定植部位的药物浓度(胃滞留型、*H. pylori*靶向型)、克服*H. pylori*耐药性(金属纳米粒、抗生物被膜制剂)及增强宿主免疫应答(疫苗制剂)。尽管这些递药系统在体内外疗效显著, 但其安全性及免疫原性需要进一步深入研究。

此外, 本文还讨论了两种新型递药系统——细胞膜仿生和噬菌体疗法, 目前它们在抗*H. pylori*的研究还非常有限。细胞膜仿生抗*H. pylori*主要体现在同源靶向与干扰优势上, 但其工艺复杂、成本高, 稳定性和安全性的有待进一步验证均限制了其临床转化。噬菌体疗法在抗*H. pylori*领域初露头角, 其特异性强、不易产生耐药性及来源广泛等诸多优势使其有望成为防控细

菌感染 (*H. pylori*) 的首选。当然, 噬菌体疗法也同时存在裂解谱窄、治疗剂量与时间难以把握及其潜在毒性问题, 其作为新的递药系统还需要广泛深入的研究。

综上, 抗 *H. pylori* 递药策略尽管取得了一些成绩, 但鉴于 *H. pylori* 感染的高度复杂性, 抗 *H. pylori* 递药策略仍然面临诸多挑战, 但新型递药系统的巨大潜能毋庸置疑。在全球细菌耐药问题亟待解决的大环境下, 未来 5~10 年一定会迎来抗菌药物新型递药系统发展的历史性机遇。

作者贡献: 陈小楠负责文章的资料收集整理、示意图构思、正文撰写与修改完善; 孙莹莹负责文章示意图的绘制与正文修改; 李彭宇、饶义琴和于世慧对文章正文进行修改完善; 胡海燕设计并完善文章架构、指导写作, 对正文与示意图进行修改完善。

利益冲突: 本文所有作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis [J]. *Lancet*, 1983, 1: 1273-1275.
- [2] Hooi J, Lai WY, Ng WK, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis [J]. *Gastroenterology*, 2017, 153: 420-429.
- [3] Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis [J]. *Gut*, 2015, 64: 1353-1367.
- [4] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16: 167-180.
- [5] Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, et al. The Toronto consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151: 51-69.
- [6] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht V/Florence Consensus Report [J]. *Gut*, 2017, 66: 6-30.
- [7] Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, et al. ACG clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Am J Gastroenterol*, 2017, 112: 212-239.
- [8] Liu G, Xie J, Lu ZR, et al. Fifth Chinese national consensus report on the management of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi (中华内科杂志)*, 2017, 56: 532-545.
- [9] Malfertheiner P, Bazzoli F, Delchier JC, et al. *Helicobacter pylori* eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2011, 377: 905-913.
- [10] Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 12619-12624.
- [11] Stark RM, Gerwig GJ, Pitman RS, et al. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 28: 121-126.
- [12] Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, et al. Impact of *Helicobacter pylori* biofilm formation on clarithromycin susceptibility and generation of resistance mutations [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e73301.
- [13] Chen X, Shen Y, Li P, et al. Bacterial biofilms: characteristics and combat strategies [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 2040-2049.
- [14] Su YR, Yu SH, Chao AC, et al. Preparation and properties of pH-responsive, self-assembled colloidal nanoparticles from guanidine-containing polypeptide and chitosan for antibiotic delivery [J]. *Colloid Surface A*, 2016, 494: 9-20.
- [15] Thamphiwatana S, Fu V, Zhu J, et al. Nanoparticle-stabilized liposomes for pH-responsive gastric drug delivery [J]. *Langmuir*, 2013, 29: 12228-12233.
- [16] Li J, Angsantikul P, Liu W, et al. Micromotors spontaneously neutralize gastric acid for pH-responsive payload release [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56: 2156-2161.
- [17] de Avila BE, Angsantikul P, Li J, et al. Micromotor-enabled active drug delivery for *in vivo* treatment of stomach infection [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 272.
- [18] Esteban-Fernandez DAB, Lopez-Ramirez MA, Mundaca-Urbe R, et al. Multicompartment tubular micromotors toward enhanced localized active delivery [J]. *Adv Mater*, 2020, 32: e2000091.
- [19] Tan Z, Liu W, Liu H, et al. Oral *Helicobacter pylori* vaccine-encapsulated acid-resistant HP55/PLGA nanoparticles promote immune protection [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 111: 33-43.
- [20] Liu H, Liu W, Tan Z, et al. Promoting immune efficacy of the oral *Helicobacter pylori* vaccine by HP55/PBCA nanoparticles against the gastrointestinal environment [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15: 3177-3186.
- [21] Date AA, Hanes J, Ensign LM. Nanoparticles for oral delivery: design, evaluation and state-of-the-art [J]. *J Control Release*, 2016, 240: 504-526.
- [22] Arango MA, Ponchel G, Orecchioni AM, et al. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11: 333-341.
- [23] Rajput P, Singh D, Pathak K. Bifunctional capsular dosage form: novel fanicular cylindrical gastroretentive system of clarithromycin and immediate release granules of ranitidine HCl for simultaneous delivery [J]. *Int J Pharm*, 2014, 461: 310-321.
- [24] Lai SK, Wang YY, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61: 158-171.
- [25] Zhang Y, Li H, Wang Q, et al. Rationally designed self-assembling nanoparticles to overcome mucus and epithelium transport barriers for oral vaccines against *Helicobacter pylori* [J]. *Adv*

- Funct Mater, 2018, 28: 1802671-1802675.
- [26] Li P, Chen X, Shen Y, et al. Mucus penetration enhanced lipid polymer nanoparticles improve the eradication rate of *Helicobacter pylori* biofilm [J]. J Control Release, 2019, 300: 52-63.
- [27] Yang SJ, Huang CH, Yang JC, et al. Residence time-extended nanoparticles by magnetic field improve the eradication efficiency of *Helicobacter pylori* [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12: 54316-54327.
- [28] Walker D, Kaesdorf BT, Jeong H, et al. Enzymatically active biomimetic micropellers for the penetration of mucin gels [J]. Sci Adv, 2015, 1: e1500501.
- [29] Luo M, Jia YY, Jing ZW, et al. Construction and optimization of pH-sensitive nanoparticle delivery system containing PLGA and UCCs-2 for targeted treatment of *Helicobacter pylori* [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 164: 11-19.
- [30] Cong Y, Geng J, Wang H, et al. Ureido-modified carboxymethyl chitosan-graft-stearic acid polymeric nano-micelles as a targeted delivering carrier of clarithromycin for *Helicobacter pylori*: preparation and *in vitro* evaluation [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 129: 686-692.
- [31] Han J, Sun Y, Hou J, et al. Preliminary investigations into surface molecularly imprinted nanoparticles for *Helicobacter pylori* eradication [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5: 577-582.
- [32] Wu Z, Hou J, Wang Y, et al. Preparation and evaluation of amoxicillin loaded dual molecularly imprinted nanoparticles for anti-*Helicobacter pylori* therapy [J]. Int J Pharm, 2015, 496: 1006-1014.
- [33] Zaidi S, Misba L, Khan AU. Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era [J]. Nanomedicine, 2017, 13: 2281-2301.
- [34] Amin M, Anwar F, Janjua MR, et al. Green synthesis of silver nanoparticles through reduction with *Solanum xanthocarpum* L. berry extract: characterization, antimicrobial and urease inhibitory activities against *Helicobacter pylori* [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 9923-9941.
- [35] Chakraborti S, Bhattacharya S, Chowdhury R, et al. The molecular basis of inactivation of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* using polyethyleneimine functionalized zinc oxide nanoparticles [J]. PLoS One, 2013, 8: e70776.
- [36] Wu T, Wang L, Gong M, et al. Synergistic effects of nanoparticle heating and amoxicillin on *H. Pylori* inhibition [J]. J Magn Magn Mater, 2019, 485: 95-104.
- [37] Bugli F, Palmieri V, Torelli R, et al. *In vitro* effect of clarithromycin and alginate lyase against *Helicobacter pylori* biofilm [J]. Biotechnol Prog, 2016, 32: 1584-1591.
- [38] Gurunathan S, Jeong JK, Han JW, et al. Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells [J]. Nanoscale Res Lett, 2015, 10: 35.
- [39] Gopalakrishnan V, Masanam E, Ramkumar VS, et al. Influence of *N*-acylhomoserine lactonase silver nanoparticles on the quorum sensing system of *Helicobacter pylori*: a potential strategy to combat biofilm formation [J]. J Basic Microbiol, 2020, 60: 207-215.
- [40] Cai J, Huang H, Song W, et al. Preparation and evaluation of lipid polymer nanoparticles for eradicating *H. pylori* biofilm and impairing antibacterial resistance *in vitro* [J]. Int J Pharm, 2015, 495: 728-737.
- [41] Shen Y, Zou Y, Chen X, et al. Antibacterial self-assembled nano-drugs composed of berberine derivatives and rhamnolipids against *Helicobacter pylori* [J]. J Control Release, 2020, 328: 575-586.
- [42] Yang WC, Sun HW, Sun HQ, et al. Intranasal immunization with immunodominant epitope peptides derived from HpaA conjugated with CpG adjuvant protected mice against *Helicobacter pylori* infection [J]. Vaccine, 2018, 36: 6301-6306.
- [43] Yang Y, Chen L, Sun HW, et al. Epitope-loaded nanoemulsion delivery system with ability of extending antigen release elicits potent Th1 response for intranasal vaccine against *Helicobacter pylori* [J]. J Nanobiotechnology, 2019, 17: 6.
- [44] Chen F, Zhang ZR, Yuan F, et al. *In vitro* and *in vivo* study of *N*-trimethyl chitosan nanoparticles for oral protein delivery [J]. Int J Pharm, 2008, 349: 226-233.
- [45] Kim SY, Doh HJ, Jang MH, et al. Oral immunization with *Helicobacter pylori*-loaded poly(*D,L*-lactide-co-glycolide) nanoparticles [J]. Helicobacter, 1999, 4: 33-39.
- [46] Corthesy B, Boris S, Isler P, et al. Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis* [J]. J Infect Dis, 2005, 192: 1441-1449.
- [47] Zhang R, Wang C, Cheng W, et al. Delivery of *Helicobacter pylori* HpaA to gastrointestinal mucosal immune sites using *Lactococcus lactis* and its immune efficacy in mice [J]. Biotechnol Lett, 2018, 40: 585-590.
- [48] Angsantikul P, Thamphiwatana S, Zhang Q, et al. Coating nanoparticles with gastric epithelial cell membrane for targeted antibiotic delivery against *Helicobacter pylori* infection [J]. Adv Ther (Weinh), 2018, 1: 1800016.
- [49] Zhang Y, Chen Y, Lo C, et al. Inhibition of pathogen adhesion by bacterial outer membrane-coated nanoparticles [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58: 11404-11408.
- [50] Cao J, Sun Y, Berglindh T, et al. *Helicobacter pylori*-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage prevent bacterial growth [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1474: 107-113.
- [51] Lu H, Zhang D, Huang H. Recent advances in study of drugs against Gram-negative pathogens [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1554-1563.