

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.10.002

重组人乳铁蛋白对幽门螺杆菌抑菌作用的实验研究*

罗娟¹, 成国祥², 袁渝萍¹, 张爱民², 刘雪芳¹, 刘思国²,
边莉³, 陈建泉², 张磊¹, 董向前¹, 杨刚¹, 南琼¹, 马岚青^{1△}

(1. 云南省消化疾病研究所/昆明医科大学第一附属医院消化内科, 昆明 650032; 2. 杰隆生物工程
有限公司, 上海 200000; 3. 昆明医科大学第一附属医院病理科 650032)

[摘要] **目的** 评估重组人乳铁蛋白(rhLF)对幽门螺杆菌(*H. pylori*)的抑菌作用及其对细胞毒素相关蛋白 A(CagA)、尿素酶(Ure)和胃黏膜白介素 8(IL-8)的影响。**方法** 测定最低抑菌浓度(MIC)和不同药物浓度对 *H. pylori* 增殖的影响。通过实时定量 PCT 和 Western blot 检测 rhLF 对 *H. pylori* CagA 和 Ure 的 mRNA 和蛋白表达的影响。动物实验, 144 只 BALB/c 小鼠, 分为 4 组, 标准三联+rhLF 组(A 组)、rhLF 组(B 组)、标准三联组(C 组)、生理盐水组(D 组), 组织病理学苏木素-伊红(HE)染色观察不同分组间胃黏膜炎症反应, ELISA 法检测各组胃组织 IL-8 水平。**结果** MIC 为 0.5 mg/mL, 且 rhLF 抑制细菌生长增殖呈现浓度依赖性过程。rhLF 能降低 *H. pylori* 主要毒力因子 CagA、Ure mRNA 和蛋白的表达。A 组胃黏膜组织炎症积分和匀浆液 IL-8 水平与 B、C、D 组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** rhLF 抑制 *H. pylori* 生长及增殖, 并不同程度抑制 *H. pylori* 主要毒力因子 CagA、Ure mRNA 及蛋白的表达, 削弱该菌的致病性, 同时降低小鼠胃黏膜 IL-8 水平, 减轻 *H. pylori* 相关性胃黏膜炎症反应。

[关键词] 螺杆菌; 幽门; 乳铁蛋白; 细胞毒素相关蛋白 A; 尿素酶; 白介素 8

[中图分类号] R573 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)10-1302-04

Experimental study on bacteriostatic effect of recombinant human lactoferrin on *Helicobacter pylori**

Luo Juan¹, Cheng Guoxiang², Yuan Yuping¹, Zhang Aiming², Liu Xuefang¹, Liu Siguo²,
Bian Li³, Chen Jianquan², Zhang Lei¹, Dong Xiangqian¹, Yang Gang¹, Nan Qiong¹, Ma Lanqing^{1△}

(1. Yunnan Provincial Research Institute of Digestive Diseases/Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Jielong Bioengineering Co., Ltd., Shanghai 200000, China;
3. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the bacteriostatic effect of recombinant human lactoferrin(rhLF) on *Helicobacter(H.) pylori* and its influence on CagA, Ure and gastric mucosal IL-8. **Methods** The minimum inhibitory concentration(MIC)and the influence of different drug concentrations on the proliferation of *H. pylori* were detected. The effects of rhLF on the mRNA and protein expressions of CagA and Ure in *H. pylori* were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. The animal study; Balb/c mice were adopted and assigned randomly into four groups, including the standard triple+ rhLF(group A), rhLF(group B), standard triple(group C) and normal saline(group D). The histopathological HE staining was used to observe the gastric inflammation and ELISA was used to detect the IL-8 level of gastric tissue in each group. **Results** MIC was 0.5 mg/mL, moreover rhLF inhibited the bacterial growth and proliferation with a concentration-dependent manner. rhLF could reduce the expression of *H. pylori* major virulence factor CagA, mRNA and protein of Ure. Comparing the group A with the group B, C and D, the gastric mucosal inflammation score and the IL-8 levels of gastric tissue homogenates had statistically significant differences($P < 0.05$). **Conclusion** rhLF inhibits the growth and proliferation of *H. pylori*, moreover inhibit the expression of major virulence factor CagA in *H. pylori*, mRNA and protein of Ure in different degrees, weakens its pathogenicity, meanwhile reduces the IL-8 level in mice gastric mucosa, and alleviates *H. pylori* related gastric mucosal inflammatory response.

[Key words] helicobacter pylori; lactoferrin; cytotoxin associated gene A; urease; interleukin-8

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是引起慢性胃炎和消化性溃疡的常见病原菌^[1-2], 它的致病性与其分泌的许多毒力因子相关, 包括尿素酶(Ure)、细胞毒素相关蛋白 A(CagA)和空泡毒素 A 等^[3-5]。这些毒力因子在引起病变的过程中发挥不同的作用, 其中 CagA 是 *H. pylori* 最重要的毒力因子之一^[6], 由 CagA 基因编码。CagA 与胃上皮表面相互作用引起级联反应, 强烈干扰细胞的信息传导通路, 通过各种机制引起病理细胞应答, 如活力、程序性细胞凋亡和形态学的改变。

实验研究表明, 慢性胃炎程度与 CagA 的阳性率相关, 提示 CagA 与炎性细胞的浸润有关^[7]。Ure 对 *H. pylori* 有保护作用^[8], 但对宿主直接毒性作用造成胃黏膜屏障的损害, 并且通过免疫反应和炎症反应引起损伤。CagA 能诱导胃黏膜组织产生更多的白介素 8(IL-8), 从而加强 *H. pylori* 对胃黏膜损伤的作用。近年来 *H. pylori* 根除率呈逐年下降趋势, 其对抗菌药物的耐药率逐年增加^[9-11], 故寻找非抗菌药物的其他治疗成为必要。

* 基金项目: 云南省联合专项基金资助项目(2012FB027)。 作者简介: 罗娟(1985-), 主治医师, 硕士, 主要从事消化内科基础和临床研究。 △ 通讯作者, E-mail: malanqing@aliyun.com。

乳铁蛋白(lactoferrin)是哺乳动物体内一种重要的非血红素铁结合糖蛋白^[12],具有抗炎性反应、免疫调节和铁离子结合功能。乳铁蛋白被认为是一种天然免疫因子和广谱抗菌剂^[13],国外已有少数报道牛乳铁蛋白抗 *H. pylori* 的效果,但乳铁蛋白抗 *H. pylori* 作用的结论具有不确定性。本文旨在探讨重组人乳铁蛋白(recombinant human lactoferrin, rhLF)抗 *H. pylori* 作用及相关机制的研究,为 rhLF 联合基础方案治疗 *H. pylori* 感染提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及动物 *H. pylori* 国际标准菌株 ATCC43504 由上海交通大学附属仁济医院消化内科陆红教授馈赠;健康成年 BALB/c 小鼠,体质量 20~25 g,由昆明医科大学动物实验室提供。

1.1.2 实验药物及试剂 rhLF 由杰隆生物工程有限公司提供;哥伦比亚培养基、脑心浸液培养基自青岛海博;胎牛血清购自美国 Thermo Fisher 公司,微需氧产气袋购自日本 Mitsubishi 公司,混合抗菌药物购自北京宝生物公司,实时定量 PCR(RT-PCR)试剂盒购自日本 Takara 公司;抗-CagA 抗体、抗-Ure 抗体购自美国 Santa 公司。

1.1.3 主要仪器设备 密闭厌氧盒(日本 Mitsubishi 公司);超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);电热恒温培养箱(上海精宏试验设备有限公司);快速梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);ABI Prism 7000 型荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);真空干燥机(SP 公司 VirTis, 2KBTES-55)

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 的培养和鉴定 *H. pylori* 菌株接种于制备好的哥伦比亚完全培养基中,均匀涂布,厌氧培养盒中微需氧产气袋环境下,恒温培养箱中 37 °C 恒温培养 3~5 d 后进行菌种鉴定,取对数生长期细菌,采用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后测细菌光密度($OD_{600\text{ nm}}$ 值($OD=1\times 10^9$ CFU/L),调整细菌浓度为 1×10^9 CFU/L 进行后续实验。

1.2.2 测定 rhLF 对 *H. pylori* 最低抑菌浓度(MIC) 分别采用固体及液体法按照美国临床实验标准化委员会(NCCLS)制订的倍比稀释法经预实验了解 rhLF 抑菌的浓度范围后,将 rhLF 以 4 mg/mL 开始作连续 6 次倍比稀释,制备成各种浓度的培养基,使 rhLF 的终浓度为:2.000、1.000、0.500、0.250、0.125、0.063 mg/mL,取 100 μ L 1×10^9 cfu/L 对数生长期菌液接种于含不同药物浓度的培养基中,每个浓度做 3 个复板,固体培养基上培养 3 d 后观察细菌生长情况,液体培养基中培养 48 h 后再接种于固体培养基中培养 3 d。以无细菌生长平皿的最小药物浓度作为该药物的 MIC。

1.2.3 rhLF、Fe³⁺ 对 *H. pylori* 生长的影响 *H. pylori* 培养于含不同 rhLF 浓度的脑心浸液液体培养基的 24 孔细胞培养板中,固定培养板,37 °C,180 r/min,恒温振荡培养,分别于 0、8、16、24、32、40、48、56、64 h 测定细菌菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 并更换一次产气袋,观测 rhLF 对细菌生长曲线的影响。并在 MIC 环境中加入不同浓度的高氯酸铁或柠檬酸铁拮抗 rhLF 铁结合能力,观察 *H. pylori* 生长情况。

1.2.4 RT-PCR 使用 Trizol 试剂提取不同 rhLF 浓度作用下的 *H. pylori* 总 RNA,测定各样本的 $OD_{260\text{ nm}}$ 和 $OD_{280\text{ nm}}$,并行普通电泳检测 RNA 质量,选取 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} > 1.8$,RNA 质量佳者进行后续实验,用相当于 1 μ g RNA 采用 primeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser(Takara)试剂盒,

两步法进行逆转录反应,体系及方法具体参照试剂盒说明书进行。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒(Takara)说明书,每个样本行 3 个副孔实验,以 cDNA 为模板,16 s RNA 为内参,分析 CagA、Ure 表达水平,CagA 引物为:正向 5'-GGG CGT GTT TGA TGA GTC CT-3',反向 5'-TGT ATG TCG GTG GTG GTA GTG-3',产物长度 190 bp;Ure 引物为:正向 5'-AAC GGC TGG TGG TAT TGA C-3',反向 5'-TTC TTC TGC CTG GAG TGA TAG T-3',产物长度为 149 bp;16 s RNA 引物为:正向 5'-TGT GGG AGA GGT AGG TGG AA-3',反向 5'-CAT CGT TTA GGG CGT GGA CT-3',产物长度为 168 bp;应用 Applied Biosystems 7000 Fast RT-PCR system,反应条件为:95 °C 30 s,预变性;95 °C 5 s,60 °C 31 s 40 个循环,根据扩增曲线取溶解曲线单峰所得 Ct 值,并利用其 Δ Ct 值进行定量,得到处理组相对 16s RNA PCR 产物的浓度比值。

1.2.5 细菌总蛋白样本制备 收集含不同药物浓度的液体培养细菌及上清,真空干燥机(-60 °C)隔夜处理后,使用 RIPA 裂解液(强)+PMSF(100 mmol/L)混合试剂提取不同 rhLF 浓度处理的 *H. pylori* 总蛋白,经 BCA 试剂盒测定样本蛋白浓度,分装,-80 °C 保存。

1.2.6 Western blot 取 75 μ g 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,10%分离胶 80 V 20 min,5%浓缩胶 100 V,60 min。100 mA 恒流转膜 1 h,5%脱脂奶粉 TBST 封闭 1 h,分别加入 1:3 000 CagA(Santa,sc-25766)、Urea(Santa,sc-21016)、GAPDH(Thermo,GA1R)单抗,4 °C 孵育过夜,TBST 洗 3 次(5、15、10 min),分别加入对应的 1:5 000 稀释的 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次(5、15、10 min)。取等量 ECL 发光液(Thermo,NCI4106)混匀,浸膜,曝光 3~5 min,显影 3 min,定影 1 min,所得条带使用 ImageJ 软件分析各条带密度值,结果用目的蛋白/GAPDH 密度值之比表示。

1.2.7 动物实验 取 144 只 BALB/c 小鼠分为 4 组,标准三联+rhLF 组(A 组)、rhLF 组(B 组)、标准三联组(C 组)、生理盐水(D 组),*H. pylori* NCTC 11637 灌胃建模,不同药物处理 7 d 后处死小鼠,行组织病理学苏木素-伊红(HE)染色观察胃黏膜炎性反应及 ELISA 法检测胃组织 IL-8 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌鉴定 (1)菌落形态:平板上的 *H. pylori* 菌落肉眼可见圆形、扁平、半透明灰白色小菌落;(2)形态学检查:经革兰染色后,油镜下观察可见革兰阴性、S 形、弧形或海鸥型,散在或成簇排列;(3)生化鉴定:快速 Ure 实验、触酶实验及氧化酶试验均阳性,可确认为 *H. pylori*^[14]。

2.2 rhLF 对 *H. pylori* 生长抑制作用 本实验采用琼脂稀释法和脑心浸液液体法测定 rhLF 对 *H. pylori* 的 MIC,结果显示其 MIC 均为 0.5 mg/mL。

2.3 不同浓度 rhLF 及 Fe³⁺ 对 *H. pylori* 生长的影响 本实验检测了不同浓度的 rhLF 对 *H. pylori* 生长增殖的影响,选取不同浓度的 rhLF 干预 *H. pylori* 生长,并以生理盐水作对照组,结果显示:rhLF 抑制 *H. pylori* 生长繁殖呈现浓度依赖性,且进一步验证 rhLF 0.5 mg/mL 时 *H. pylori* 成完全抑制状态,见图 1。同时加入不同浓度的 Fe³⁺ 拮抗 rhLF 铁结合作用后显

示:(1)培养基中加入 25 μmol/L Fe³⁺ 后铁达到饱和;(2)在培养基中铁完全饱和的前提下,H. pylori 生长仍未达到对照水平,与对照组相比差异有统计学意义(P<0.01),见图 2。

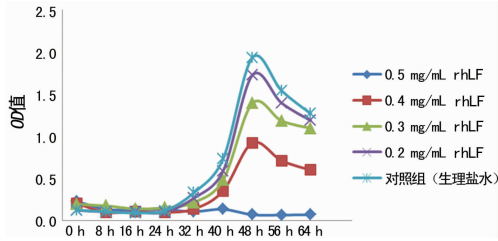


图 1 不同浓度 rhLF 对 H. pylori 生长抑制作用

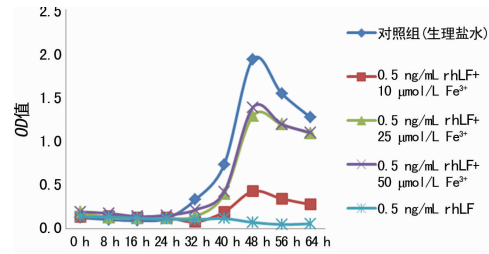
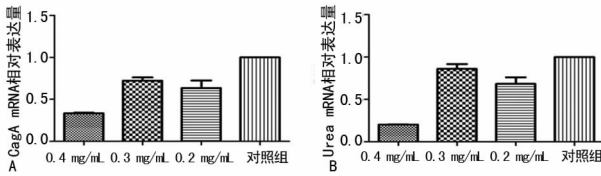


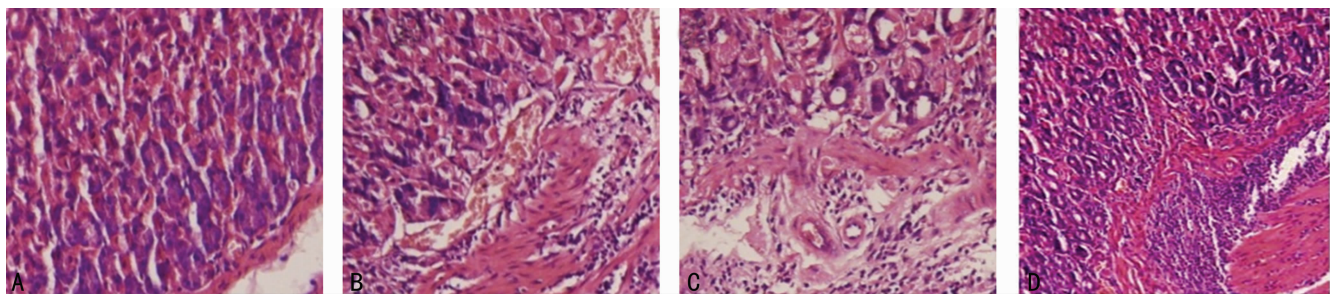
图 2 Fe³⁺ 及 rhLF 对 H. pylori 生长的影响

2.4 rhLF 对 CagA、Ure mRNA 影响 采用不同浓度的 rhLF 干预细菌 24 h,收集细菌菌体检测 CagA、Ure mRNA 的表达水平,以加生理盐水组为对照。结果显示:与对照组相比,不同浓度 rhLF 能抑制 H. pylori CagA 及 Ure 的表达(P<0.05),图 3。



A: CagA; B: Ure.

图 3 rhLF 对 H. pylori CagA、Ure mRNA 的影响



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

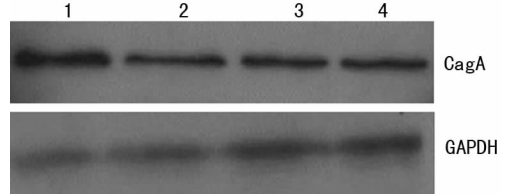
图 6 各组胃黏膜组织 HE 染色镜检形态学比较(×300)

表 1 rhLF 对 H. pylori 胃炎小鼠胃黏膜 IL-8 水平的影响(̄x±s, pg/m², n=48)

组别	IL-8 水平
A 组	22.58±4.59
B 组	107.95±10.9 ^a
C 组	25.84±10.7 ^a
D 组	503.38±64.18 ^a

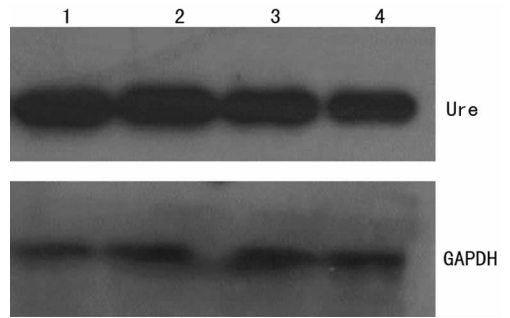
^a: P<0.05, 与 A 组比较。

2.5 rhLF 对 H. pylori CagA、Ure 蛋白的影响 采用不同浓度的 rhLF 干预细菌 24 h,收集细菌菌体及培养上清液检测 CagA、Ure 蛋白的表达水平,以加生理盐水组为对照。结果显示:与对照组相比 rhLF 能抑制 H. pylori 毒力因子相关蛋白 CagA 及 Ure 的表达(P<0.05),见图 4、5。



1: 0.4 mg/mL rhLF 组; 2: 0.3 mg/mL rhLF 组; 3: 0.2 mg/mL rhLF 组; 4: 对照组。

图 4 rhLF 对 H. pylori CagA 蛋白表达的影响



1: 0.4 mg/mL rhLF 组; 2: 0.3 mg/mL rhLF 组; 3: 0.2 mg/mL rhLF 组; 4: 对照组。

图 5 rhLF 对 H. pylori Ure 蛋白表达的影响

2.6 动物实验 与 D 组比较,A、B、C 3 组炎症程度积分明显降低(P<0.05);与 B 组比较,A、C 组炎症积分明显降低(P<0.05);与 C 组比较,A 组炎症积分明显降低(P<0.05),见图 6;ELISA 检测小鼠胃黏膜组织匀浆液中 IL-8 水平,结果见表 1。

3 讨论

H. pylori 为慢性胃炎和十二指肠溃疡的主要致病因素,同时与胃溃疡关系密切。目前针对 H. pylori 的主要治疗为以抗菌药物为基础的标准三联或四联治疗方案^[15-16]为主,随着根除治疗的普及和抗菌药物的广泛应用,H. pylori 对抗菌药物耐药现象日益严重^[17],对抗菌药物的耐药成为根除失败的首要因素^[18]。这也促使人们转换思维,从新的视角去审视 H. pylori 的治疗方案。rhLF 是利用转基因技术获得的,既解决了来源问题,并能特异结合胃内人乳铁蛋白受体,更符合人体利用的分子特点。国外已有少许研究观察了牛乳铁蛋白抗 H. py-

lori 的作用, Dial 等^[19] 的研究显示牛乳铁蛋白抗与 *H. pylori* 共培养, 其浓度大于或等于 0.5 mg/mL 可抑制 *H. pylori* 的增殖, 对人乳铁蛋白抗 *H. pylori* 的研究方面, Miehke 等^[20] 体外实验发现对 13 株临床分离菌株具有抑制作用。本研究观察到 rhLF 对 *H. pylori* 具有明显生长抑制作用, 其 MIC 与 Dial 等^[19] 研究结果相符, 结果显示 rhLF 对 *H. pylori* 抑制作用呈浓度依赖型作用效果。已有研究显示乳铁蛋白通过螯合 Fe^{3+} 限制细菌生长所必需的金属离子^[13], 此为其抗菌作用的基础, 本实验观察了其抑菌作用是否仅为其铁结合能力所致, 结果显示, 在提供充足的铁以拮抗 rhLF 铁结合力后, *H. pylori* 仍然受到不同程度的抑制, 提示 rhLF 抗 *H. pylori* 作用为多种机制参与的结果。

本研究继续在 CagA、Ure 等 *H. pylori* 主要毒力因子形成的 mRNA 及蛋白表达水平上进一步论述了 rhLF 抗 *H. pylori* 的可能作用机制, 结果显示, rhLF 对菌体及其分泌的 CagA、Ure mRNA 和蛋白具有不同程度的抑制作用, 从而可能减弱了 *H. pylori* 致病性。

体内实验结果显示, rhLF 联合标准三联疗法可以降低小鼠胃黏膜 HE 染色炎症程度的积分, 减轻胃黏膜炎症损伤程度, 且减轻胃黏膜炎症损伤作用优于单独使用 rhLF 或标准三联疗法。*H. pylori* 主要通过微生物 IV 型分泌系统 (typesecretion system, TISS) 将 CagA 基因编码的毒力蛋白过度表达与分泌, 进而将大量嗜中性粒细胞趋化到胃黏膜部位, 并导致炎症反应的加重^[21], 注入胃黏膜上皮细胞中, 并诱导胃上皮细胞 IL-8 过度表达与分泌。本研究显示: rhLF 可以降低 IL-8 在 *H. pylori* 感染的小鼠胃黏膜表面的水平, 从而减轻胃黏膜炎症反应。

虽然本研究显示 rhLF 对 *H. pylori* 具有抑制生长、减弱致病性, 同时保护胃黏膜、减轻炎症反应等特点, 但其具体机制仍有待进一步研究。总之, 其在治疗消化道疾病方面的价值值得开发研究。

参考文献

- [1] Deng B, Li YF, Zhang Y, et al. Helicobacter pylori infection and lung cancer; a review of an emerging hypothesis [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6): 1189-1195.
- [2] Sutton P, Chionh YT. Why can't we make an effective vaccine against Helicobacter pylori [J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(4): 433-441.
- [3] Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in Helicobacter pylori [J]. J Dig Dis, 2013, 14(7): 341-349.
- [4] Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EM, Zeitune JM. Virulence factors of helicobacter pylori; a review [J]. Clin Med Insights Gastroenterol, 2014, 7: 9-17.
- [5] Kim SH, Park M, Woo H, et al. Inhibitory effects of anthocyanins on secretion of Helicobacter pylori CagA and VacA toxins [J]. Int J Med Sci, 2012, 9(10): 838-842.
- [6] 贾克东, 丁元军, 刘东林, 等. 标记人血清抗体 IgG 胶体金免疫法对不同标本幽门螺杆菌抗原的测定 [J/CD]. 中华

实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009(1): 1-5.

- [7] 王海滨, 张建中. 幽门螺杆菌 CagA 与宿主细胞相互作用机制的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(12): 1147-1150.
- [8] Andersen LP. Colonization and infection by helicobacter pylori in humans [J]. Helicobacter, 2007, 12 Suppl 2: 12-15.
- [9] 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌耐药研究现状 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2008, 17(7): 517-518.
- [10] Seck A, Burucoa C, Dia D, et al. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in helicobacter pylori isolates from Senegalese patients [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2013, 12: 3.
- [11] 黄健, 莫非. 家蝇幼虫抗菌肽对幽门螺杆菌抗菌作用分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(10): 981-985.
- [12] Sachdeva A, Rawat S, Nagpal J. Efficacy of fermented milk and whey proteins in Helicobacter pylori eradication; a review [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(3): 724-737.
- [13] Jenssen H, Hancock RE. Antimicrobial properties of lactoferrin [J]. Biochimie, 2009, 91(1): 19-29.
- [14] Sugizaki K, Sakata Y, Arai T, et al. A multicenter prospective observational study of triple therapy with rabeprazole, amoxicillin and metronidazole for Helicobacter pylori in Japan [J]. Intern Med, 2012, 51(22): 3103-3108.
- [15] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组/全国幽门螺杆菌研究协作组, 刘文忠, 谢勇, 等. 第 4 次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告 [J]. 中华消化杂志, 2012, 32(10): 655-661.
- [16] Malfertheiner P, Megraud F, O' morain CA, et al. Management of helicobacter pylori infection--the maastricht IV/florence consensus report [J]. Gut, 2012, 61(5): 646-664.
- [17] Basyigit S, Kefeli A, Yeniova AO, et al. Different treatment choice for first-line treatment of Helicobacter pylori in an area with a high antibiotic resistance [J]. Turk J Gastroenterol, 2014, 25 Suppl 1: 293-294.
- [18] Fashner JG. Treatment of peptic ulcer disease, *H. pylori* infection [J]. Am Fam Physician, 2015, 91(4): 236-242.
- [19] Dial EJ, Hall LR, Serna H, et al. Antibiotic properties of bovine lactoferrin on Helicobacter pylori [J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(12): 2750-2756.
- [20] Miehke S, Reddy R, Osato MS, et al. Direct activity of recombinant human lactoferrin against Helicobacter pylori [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(10): 2593-2594.
- [21] Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. CagA protein of Helicobacter pylori; a hijacker of gastric epithelial cell signaling [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(11): 1697-1702.

(收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-01-25)