



临床医学高级研修书系



# 幽门螺杆菌感染

## ——基础与临床

HELICOBACTER PYLORI INFECTION

范学工 夏华向/主编

湖南科学技术出版社

临床医学高级研修书系

## 幽门螺杆菌感染

——基础与临床

主 编：范学工 夏华向

责任编辑：张碧金

出版发行：湖南科学技术出版社

社 址：长沙市展览馆路 66 号

印 刷：湖南省新华印刷二厂

厂 址：邵阳市双坡岭

邮 编：422001

(印装质量问题请直接与本厂联系)

经 销：湖南省新华书店

出版日期：1997 年 12 月第 1 版第 1 次

开 本：787mm×1092mm 1/16

印 张：20

插 页：8

字 数：482000

印 数：1—3100

征订期号：京所科技新书目 439—422

书 号：ISBN 7—5357—2250—4/R·439

定 价：42.00 元

(版权所有·翻印必究)

# 目 录

## 本书缩略语英汉对照

### 第一篇 基础部分

第一章 历史回顾..... 3	第四节 尿素酶疫苗..... 46
第二章 微生物学特性..... 7	第六章 免疫/炎症反应..... 48
第一节 一般微生物学特性..... 7	第七章 胃粘膜上皮的抗原处理与提呈..... 58
第二节 分子微生物学特性..... 11	第八章 自由基的病理作用..... 65
第三章 流行病学..... 19	第一节 自由基与抗氧化剂..... 65
第四章 毒力因子..... 27	第二节 幽门螺杆菌感染与自由基损伤..... 68
第一节 空泡/细胞毒素..... 27	第三节 抗氧化治疗应用于幽门螺杆菌感染的评价..... 72
第二节 其他毒力因子..... 30	第九章 胃肠激素和胃酸分泌紊乱..... 76
第五章 尿素酶..... 38	第一节 胃肠激素..... 76
第一节 结构与功能..... 38	第二节 激素变化..... 78
第二节 致病机制..... 41	第三节 胃酸分泌变化..... 79
第三节 尿素酶的检测方法与临床意义..... 43	

### 第二篇 临床部分

第十章 胃、十二指肠疾病..... 85	第一节 侵人性诊断..... 131
第一节 非溃疡性消化不良..... 85	第二节 非侵人性诊断..... 136
第二节 胃炎..... 90	第十三章 治疗..... 149
第三节 消化性溃疡..... 96	第一节 消化不良的处理：幽门螺杆菌感染的作用..... 149
第四节 胃癌..... 101	第二节 幽门螺杆菌感染的治疗..... 156
第五节 胃淋巴瘤..... 108	第三节 pH 和 Hp：抑酸疗法在治疗幽门螺杆菌感染中的意义..... 164
第六节 儿童胃肠疾病..... 115	第四节 儿童幽门螺杆菌感染的治疗
第十一章 其他相关性疾病..... 126	
第十二章 诊断..... 131	

.....	170	第七节 幽门螺杆菌感染根除后的复发： 复燃抑或再感染.....	192
第五节 幽门螺杆菌对抗生素的耐药性 .....	178	第八节 幽门螺杆菌感染治疗展望.....	198
第六节 抗幽门螺杆菌感染治疗的几点思 索.....	188	第十四章 免疫预防——幽门螺杆菌疫苗展望 .....	203

### 第三篇 附录部分

附录 A 幽门螺杆菌与消化性溃疡病（美国 国立卫生研究所统一意见）.....	229	幽门螺杆菌（世界卫生组织文件） .....	231
附录 B 幽门螺杆菌与人类胃癌——人类致癌 危险因素的评价：血吸虫、肝吸虫及		附录 C 部分国外作者英文章节原文（按章节顺 序排列）.....	233

# 基础部分

PART I: BASIC PRINCIPLES



## 第一章 历史回顾

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是 1982 年由澳大利亚医师 B Marshall 在一个带有偶然性的机会下分离培养出来的, 至今已 15 年了。

目前幽门螺杆菌感染作为慢性胃炎、消化性溃疡的最主要病因已经得到了国际医学界的首肯。

近来的研究还证实幽门螺杆菌感染与胃癌和胃淋巴瘤的发生密切相关。实际上, 怀疑胃、十二指肠疾患的发生与某种细菌的感染有联系却已经有 100 多年的历史了。回顾一下其中的曲折历史过程, 我们或许可以从中得到某些启示。

### 一、细菌感染与胃十二指肠疾病

早在 1892 年, 意大利学者 Bizzozero 第一次观察到有螺形的细菌定居在哺乳动物的胃内。通过对各种动物胃肠上皮细胞的显微镜观察, 他发现在他所研究的 6 只狗的胃腺和壁细胞处均有这种螺旋体样微生物存在。有趣的是, Bizzozero 当时也发现这种螺旋形微生物的存在与胃上皮细胞空泡形成之间存在联系 (现已证实至少一半以上的幽门螺杆菌株可以产生空泡毒素, 导致上皮细胞空泡形成)。1896 年, Salomon 也证实了在狗胃内有螺形微生物存在。Salomon 还检查了人、猿、猴子、牛和猪等动物的胃, 但没有发现类似的微生物。Balfour 证实了在狗和猴子的胃、小肠溃疡部位有螺旋体样微生物存在。Lucet 观察到患有出血性胃肠炎的狗胃内有类似的微生物。Salomon, Kasai 和 Kobayashi 还证实这种螺形样微生物可由猫或狗传播给鼠。

首次报道人胃内有螺旋体微生物定居是在本世纪初。

Krienitz 和 Luger 在进行人尸体解剖时发现, 胃癌性溃疡的表面有螺旋样细菌存在, 但直到 1939 年以前, 未见关于人胃螺旋样微生物工作的进一步报道。1939 年, Doenges 对 242 例尸体解剖胃行苏木素-伊红染色观察时发现, 其中 43% 的尸解胃中存在螺旋体样微生物, 这类微生物大多位于腺腔部位, 但亦能在壁细胞处发现。由于尸体组织的自溶现象, 因而要评价这种螺形细菌在胃病理学上的意义是困难的。为了解决这一问题, Freedberg 和

Barron对胃标本重新切片,行苏木素-伊红和银染色,发现在他们观察的35例个体中,37.1%的标本为螺旋样微生物阳性标本。然而,在许多情况下,细菌仅能在多次切片后的检查中被检出。这类细菌的检出大多与胃溃疡和胃癌病例有联系。但是也有相反的报道,在13例同时有慢性胃炎的十二指肠球部溃疡病人中,仅两例被发现螺旋样细菌阳性。在另一个试图证实胃粘膜存在螺形细菌的研究中,Palmer应用苏木素-伊红染色观察了1000例病人的1180个胃活检标本,无一例发现有这种微生物定居。

1924年,一个胃上皮细胞有细菌定居的间接证据被发现。Luck和Seth发现胃内存在相当高的尿素酶活性。Lieber和Lefevre 1959年发现,通过抗生素治疗,可逆转许多尿毒症病人的低胃酸状态,从而提示了胃内尿素酶活性来源于细菌。然而,尽管动物实验肯定了胃尿素酶活性来源于细菌,但在1984年以前,这种尿素酶活性与胃内螺形细菌之间的联系却一直未得到进一步证实。

今天人人都知道,具有极高的尿素酶活性是幽门螺杆菌的重要生物学特性之一。

在1954年Palmer的报道以后直到1975年以前,没有进一步的关于胃螺形菌的报道见诸文献。1975年,有人描述了胃溃疡病人的胃上皮细胞的腔面存在螺形菌。这种细菌被观察到至少有一根鞭毛;位于粘液深层;与不存在这种细菌的正常胃比较,有细菌胃的上皮细胞粘液量是减少的;电镜发现这种细菌可被多形核中性白细胞所吞噬;还注意到有肠化生的部位没有这种细菌存在等。

之所以前述结果未得到重视或受到怀疑、否定,是因为当时流行的观点认为:胃内是高酸环境,因而是一个无菌器官,任何细菌都不可能胃酸中存活。

并且还认为,那些组织学检查所发现的胃粘膜上存在细菌的报道是由于检查时标本被污染的原故。

## 二、幽门螺杆菌的发现

80年代初,在澳大利亚佩斯(Perth)医院病理科工作的R Warren教授不断发现,取自慢性胃炎和消化性溃疡病人的多数胃内镜活检标本上定居有弯曲菌样的细菌。这些弯曲样细菌常难被苏木素-伊红染色,而易于被银染色法染色。这时一个前瞻性的研究被设计来试图从胃活检标本中分离培养出该细菌,这一工作交给了佩斯医院年轻的住院医师B Marshall来完成。由于当时认为这种细菌非常接近于弯曲菌属,所以用非选择性的标准的弯曲菌培养基对这一不知名的细菌进行分离培养,所用的培养条件也是根据弯曲菌确定的,如微需氧和培养时间48小时等。遗憾的是连续34个胃活检标本的培养均未发现细菌生长,培养皿被扔掉。到接种培养第35个标本时,一个偶然性的机遇来临了。接种第35个胃活检标本时,正是1982年4月西方的复活节。由于是节日假期,Marshall没有在48小时以后去医院观察细菌生长情况。在5天的复活节假期后,Marshall一上班就惊喜地发现培养基上长满了许多弯曲菌样的菌落。以后的工作表明该细菌生长非常缓慢,其最佳培养时间是3~5天。前面34个标本未能培养出该细菌是因为培养皿仅孵育了48小时而被过早丢弃的原故。该细菌就是现在被广泛研究的革兰氏阴性、微需氧螺形杆菌——幽门螺杆菌。可以说幽门螺杆菌的发现



是科学敏锐性和幸运相结合的结果。从此，对胃肠疾病的研究来说，一个新的纪元开始了。

### 三、一个志愿者的试验

为了提供更确切的证据来证实幽门螺杆菌感染是胃疾病的直接致病因素，该细菌的分离发现者 B Marshall 于 1984 年 7 月进行了一次吞服该菌的人体自愿者试验，自愿者就是 Marshall 自己。

B Marshall，当时 32 岁，男性，偶有吸烟和饮酒，既往无胃肠疾病，亦无溃疡病家族史。吞服细菌前，Marshall 接受了胃镜检查，并从胃体、胃窦和十二指肠球部分别取活检组织送组织学和超微结构检查，以及幽门螺杆菌的培养。胃镜、组织学和超微结构检查均显示正常，组织学染色未发现幽门螺杆菌，细菌培养也阴性，而从另外两例病人（一例是球部溃疡，另一例是胃炎病人）所取胃活检组织同时接种培养，均生长出幽门螺杆菌。一个月以后，当认为胃活检部位已愈合时的一天上午，Marshall 吞服了 10ml 纯培养的约  $10^9$  菌落形成单位的细菌悬液。在服入细菌的最初 24 小时内，Marshall 除感到肠蠕动增加外，余无特殊不适；第 7 天，Marshall 出现晚餐后腹部饱胀感，以及清晨因饥饿而早醒；第 8 天，清晨 6 点出现轻微呕吐，无发热，但感头痛；随后出现大便变软，但并未发展到腹泻。在试验的第 2 周，Marshall 显得有些烦躁，显然是生病了。他的同事们观察发现他呼吸时有“腐烂”气味呼出。为了了解是否已形成感染，在第 10 天进行了胃镜的复检。与第一次不同的是，Marshall 对胃镜检查的耐受力显著降低；尽管他的胃粘膜似乎显得正常，但内镜医师在取活检标本时却明显感到胃组织很“软”，即活检组织能很容易被钳下。一共取了两块组织，一块送组织学检查，另一块送幽门螺杆菌培养。组织学检查显示固有层和粘膜表层有大量中性粒细胞浸润；上皮细胞异常和细胞内粘液缺失；同时可见幽门螺杆菌粘附在上皮细胞和腺体处，或位于在粘液层的中性粒细胞之间。电镜检查亦发现在上皮细胞的腔面粘附有该细菌。细菌培养的生长菌经鉴定为幽门弯曲菌（即现在的幽门螺杆菌），该细菌已被冷冻保存。Marshall 除了继续于清晨因为饥饿而早醒外，没有出现新的症状。第 14 天，又进行了胃镜复查。活检标本的组织学检查表明，此时炎症已明显减轻；浸润的中性粒细胞已消失，仅残留少量的单个核细胞；上皮细胞的粘液量增加，但仍较正常为少；超微结构发现上皮细胞表面仍有螺杆菌定居。第 14 天时 Marshall 开始服用替硝唑（Tinidazole）治疗，每次 500mg，每天 2 次，服用了 1 周。在治疗开始后 24 小时内，他的症状得到了完全的缓解。长期随访表明，Marshall 的感染已被根除。

Marshall 的这一工作证实了幽门螺杆菌感染确实可引起急性胃炎。如果宿主的免疫系统不能清除这一感染，或感染未经治疗根除，那么这类急性胃炎就将进展为慢性胃炎。

在 Marshall 之后不久，新西兰的 A Morris 医师作为自愿者也进行了吞服幽门螺杆菌的自身感染试验。试验同样也导致了胃炎的发生。所不同的是 A Morris 的感染未能被根除，而是发展成了慢性感染和慢性组织性胃炎。

### 四、细菌名称的变迁

幽门螺杆菌是幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*, Hp）的简称。最初当该菌被分离培养出来时，称之为未鉴定的弯曲样杆菌（unidentified curved bacillus）。该菌为一种呈 S 形、U 形或弧形的革兰氏阴性微需氧细菌，由于该菌在光学显微镜下的形态及 DNA 的鸟嘌呤和胞嘧啶含量与弯曲杆菌相似，一度称之为弯曲菌样微生物（Campylobacter like organism，

CLO), 并曾定名为幽门弯曲杆菌 (*Campylobacter pyloridis*)。但由于其外文命名中的种称 *pyloridis* 一词在语法上不正确, 1987 年正式定名为幽门弯曲杆菌 (*Campylobacter pylori*, CP), 并归入弯曲菌属。然而该菌的超微结构和脂肪酸组成与弯曲杆菌属有很大不同。确定细菌属别基本上依据基因组分析, rRNA 序列研究清楚的表明该菌不属于弯曲杆菌属。许多研究还显示该菌更近似于 *Wolinella succinogenes*。后来, Owen 的研究又证明该菌与 *W. succinogenes* 之间具有 14 个表型上的差别; 1989 年 Goodwin 等人对该菌分类学特征上的 5 个主要特征即: 超微结构特征、细胞脂肪酸构成、呼吸醌、生长特点和酶性能进行了详细分析, 结果表明该菌和 *W. succinogenes* 间存在着显著的表型上的不同, 从而使人信服地认为该菌应归属于一独立属别。Goodwin 同时还建议更名为幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*), 他的这一建议很快得到了国际医学界的广泛认可和接受。1989 年幽门弯曲菌正式易名为幽门螺杆菌。新的名称不仅有其在分类学上的重要意义, 而且还可避免关于“弯曲菌感染” (*campylobacter infection*) 一词引起的混淆, 后者通常指由空肠弯曲菌所致的腹泻。

螺杆菌属是一种新的菌属。除幽门螺杆菌外, 从雪貂 (*ferret*) 胃内分离到的螺旋形细菌已被正式命名为鼬鼠螺杆菌 (*Helicobacter mustelae*), 是该菌属的第二位成员; 平顶猴胃内有 A、B 两型尿素酶阳性的螺旋形细菌, 其中 B 型有独特的脂肪酸组成, 有人建议将其命名为平顶猴螺杆菌 (*Helicobacter nemistrinae*); 从猫的胃内分离出了一种螺旋形细菌, 有胞周纤丝, 可以引起无菌小鼠和狗胃的炎症性组织学改变, 被称为猫螺杆菌 (*Helicobacter felis*)。

关于 *Helicobacter pylori*, 前段至少有两个中译名: 幽门螺旋菌和幽门螺杆菌。但大多数学者认为后者较为合适, 因为 *helicobacter* 一词来源于希腊文的“*helix*”, 是螺旋形的意思, “*bacter*”则是杆状的意思, Goodwin 选用 *helicobacter*, 正是因为它反应了这种细菌的两种形态学特征: 即在活体内呈螺旋形, 而在活体外则呈杆状。而又由于该菌主要引起胃幽门 (*pylori*) 部位的炎症等病变, 故全称为“幽门螺杆菌”。

### 主要参考文献

- [1] Goodwin CS, et al. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J Clin Pathol*, 1986; 39: 353.
- [2] Warren JR, et al. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1983; 1: 1273.
- [3] Marshall BJ, et al. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*, 1985; 142: 436.
- [4] Morris A, et al. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol*, 1987; 82: 192.
- [5] Marshall BJ, et al. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbio Lett*, 1984; 25: 83.

[范学工, 谭金莲]

## 第二章

### 微生物学特性

幽门螺杆菌被发现十余年来,已有大量涉及该菌细菌学特性的研究报道,内容从一般微生物学到分子微生物学。对幽门螺杆菌微生物学特性的认识,将有益于我们理解其致病机制,制定正确的治疗方案,以及对该菌疫苗的设计。本章将从两个方面介绍幽门螺杆菌的微生物学特点,使大家能更深入地了解这一“智慧型”(multi-talent)细菌。

#### 第一节 一般微生物学特性

##### 一、生物学特性

###### (一) 形态染色

幽门螺杆菌染色体大小为1.60~1.72mb。G+C含量为34.1%~37.5%。它是有4~6根鞭毛的螺杆菌状细菌、革兰氏染色阴性、宽0.5~1.0 $\mu\text{m}$ 、长2.5~4.0 $\mu\text{m}$ 、鞭毛长2~5 $\mu\text{m}$ 。在胃粘膜中,幽门螺杆菌常常为弯曲、S形或弧形,在胃粘液层中常呈鱼群样排列。经传代培养后,细菌往往会失去特有弯曲状而成杆状。在细菌菌体表面有一层多糖蛋白复合物。若周围环境不利细菌生长,如延长培养,暴露空气中,遇抗生素或细菌在不利环境中等,幽门螺杆菌会变成圆球体,一般认为这是细菌一种静止状态。

###### (二) 培养特性

幽门螺杆菌属于微需氧菌。

该菌营养要求高,常用气体培养条件有:①85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 和 5% O<sub>2</sub>; ②5%~10% CO<sub>2</sub>; ③厌氧袋:袋内置有化学药品(枸橼酸、碳酸氢钠、硼氢钠、氯化钴),加水激活发生反应,产生一定比例的H<sub>2</sub>和CO<sub>2</sub>(袋内不加钯)。固体培养基可选用脑心浸液、血琼脂2号、Wilkins-Chalgren和哥伦比亚等。以上述培养基为基础,加5%羊血、马血或人血,有报告人血优于其他种类血源。液体培养基可选用脑心浸液加0.4%酵母浸液和10%马血清。幽门螺杆菌培养时间较长需3~7天。细菌菌落1~2mm,开始呈针尖样透明,以后菌落稍

大呈灰白色，无明显溶血。在液体培养基中，幽门螺杆菌生长呈细颗粒状，2~3天后可见细菌明显生长，易与其他细菌区别。幽门螺杆菌最适培养温度为35~37℃。30℃和42℃生长不佳。

### (三) 生化反应

**幽门螺杆菌产生大量尿素酶，能迅速分解尿素，这是幽门螺杆菌的一个重要特性。**

尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶阳性，这三项试验是鉴定幽门螺杆菌最主要生化反应。其他生化反应包括：不还原硝酸盐，马尿酸水解阴性，产生碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、组氨酸氨基肽酶、亮氨酸氨基肽酶、DNA酶及一些脂酶(C<sub>4</sub>~C<sub>12</sub>)。

### (四) 分型

Lior 报告可以把幽门螺杆菌分为5个血清型。按照幽门螺杆菌生化反应可以把细菌分为Ⅲ型。用不同核酸内切酶消化PCR扩增的尿素酶基因，根据PCR扩增产物的酶切图谱，Foxall等把22株细菌分成10型，其中2个型分别包括4株和5株细菌。也有一些学者用核糖分型(ribotyping)或重复PCR(rep-PCR)分型幽门螺杆菌。目前幽门螺杆菌分型不成熟，还没有一种公认的简单、可靠、易行的分型方法。

## 二、致病性

定居是致病菌致病最基本条件之一。幽门螺杆菌定居因素包括：

1. 动力：在许多肠道致病菌中，如霍乱弧菌、沙门氏菌和弯曲菌，动力是细菌定居肠道表面必不可少的。用甲基纤维素做动力试验，证明幽门螺杆菌能穿过很粘稠的环境。动物试验也证明无动力的幽门螺杆菌突变株不易定居悉生小猪，而有动力的幽门螺杆菌感染悉生小猪后引起慢性胃炎。
2. 尿素酶：幽门螺杆菌分泌大量尿素酶，其分子量为600kD，它由两个亚单位组成，分子量约为62kD和30kD。尿素酶分解尿素产生氨，中和幽门螺杆菌周围的酸，使幽门螺杆菌能在酸性环境中存有时间生存而穿过胃粘液定居于胃上皮细胞表面。体外试验表明，只要有足量尿素，幽门螺杆菌能在pH 2时存活120分钟。动物试验中尿素酶阴性突变株不能定居悉生小猪。
3. 粘附：幽门螺杆菌虽然在体外能粘附许多细胞系，但在体内却有组织倾向性。在十二指肠中，幽门螺杆菌可定居在胃化生细胞上，而邻近十二指肠上皮细胞无细菌粘附。在胃内，幽门螺杆菌只见于胃上皮细胞上，而十二指肠肠化细胞上未见有幽门螺杆菌。有学者报告在胃窦上皮细胞内有一种糖脂受体可以与幽门螺杆菌结合，也有学者认为有多种血凝素与幽门螺杆菌粘附有关。一种保守的幽门螺杆菌纤毛被认为粘附素。在体内究竟何种物质与粘附有关，有待进一步研究证实。

**幽门螺杆菌只定居于胃上皮细胞。**

幽门螺杆菌定居胃上皮细胞表面后分泌大量因子，包括尿素酶、蛋白酶、脂酶、磷酸酶、细胞毒素、化学趋化因子等。尿素酶分解尿素产生的氨不仅可以中和胃酸有利细菌生存，而且对许多哺乳类细胞有直接毒性作用。氨可以阻止胃腺分泌氢离子，使上皮细胞氨离

子反流导致胃酸缺乏症。幽门螺杆菌分泌细胞毒素，50%~60%幽门螺杆菌培养上清液和溶解产物对不同细胞系有毒性作用，引起细胞空泡变性。这种毒素对热不稳定，易被蛋白酶分解，表明是由蛋白质参与细胞空泡变性。现已知细胞毒素是由87 kD亚单位组成的970 kD复合体。研究发现从溃疡病病人体内分离的菌株比从浅表性胃炎病人体内分离的菌株更易产生空泡变性。分泌细胞毒素的菌株同时分泌128 kD的蛋白质，编码这种128 kD蛋白质的基因被称为 *cagA*，此基因可能调控毒素表达。

### 三、免疫性

幽门螺杆菌感染可引起机体特异体液及细胞免疫。抗体主要包括 IgG 和 IgA，IgM 持续时间短，少见。产生的抗体识别许多幽门螺杆菌表面抗原，包括抗尿素酶亚单位 62 kD 和 30 kD，56 kD 热休克蛋白和 54 kD 鞭毛蛋白。有些机体产生的抗体还可以识别 128 kD 和 87 kD 细胞毒素相关抗原。

幽门螺杆菌感染后可以见到局部炎症和免疫反应。T 淋巴细胞对幽门螺杆菌感染反应不是很清楚。白细胞介素 8 (IL-8) 明显增加，可以激活中性细胞。其他细胞因子如 TNF $\alpha$ ，随幽门螺杆菌炎症而增加，并改变胃粘膜功能。尽管机体产生特异的局部和全身体液和细胞免疫，但是不能有效地清除该菌。

### 四、微生物学检查

#### (一) 标本收集和运输

幽门螺杆菌在胃内呈灶性分布，主要定居于胃窦，因此建议取两块胃窦部胃粘膜标本。幽门螺杆菌悬液在 4℃ 蒸馏水及生理盐水中可以存活数天。运送标本可以采用生理盐水、20% 葡萄糖溶液、营养肉汤、布氏肉汤或司徒氏肉汤。运送标本温度 4℃ 比室温效果好。如果要运送已分离出的幽门螺杆菌菌株，可采用有密封盖的巧克力斜面，室温下细菌可以存活数天。

#### (二) 微生物学鉴定

一部分胃粘膜可以直接涂片（涂片时必须注意标本粘膜面朝载玻片），染色可以采用革兰氏染色（稀释石炭酸、复红复染时可延长至 5 分钟）。其他单染方法如：石炭酸复红染色，姬姆萨染色或吡啶橙染色也可以使用。有报道相差显微镜观察效果优于涂片染色。方法是把胃粘膜在一滴生理盐水中切碎，用载玻片及盖玻片将标本压紧，在相差显微镜下观察。

培养阳性率受标本处理方法的影响。用研磨器把胃粘膜标本磨碎效果理想。但用这种方法做涂片染色，常会产生假阴性。阳性标本经微需氧培养 3 天以后可见针尖样菌落。大多数菌株 1 周之内可以生长，但有少数菌株生长很慢，需 2 周时间。在低酸血症或胃癌病人胃中，常有其他杂菌过度生长。当仅采用 1 种非选择性培养基时，由于污染菌过度生长，掩盖幽门螺杆菌生长，使一些阳性标本被遗漏。因此最好同时使用抗生素选择性培养基和非选择性培养基，这样可以提高阳性检出率。对可疑菌落革兰氏染色，可见弧状、弯曲状革兰氏阴性细菌。如尿素酶阳性，过氧化氢酶阳性和氧化酶阳性，可初步确定为幽门螺杆菌。其他生化反应包括马尿酸水解阴性和硝酸盐反应阴性。幽门螺杆菌与一些类似细菌区别见表 2-1。对分离到的阳性菌株可以继续做药物敏感试验。

除了常规的细菌学检查方法，其他检测方法包括检测血清或唾液中特异性抗幽门螺杆菌 IgG 抗体，<sup>13</sup>C 或 <sup>14</sup>C 尿素呼吸试验及 PCR 技术检测胃粘膜中幽门螺杆菌。选择哪一种方法应

根据当地的条件、设备、经验和经费而取舍。

## 五、保存

常用冷冻干燥保存其他细菌的方法会损伤幽门螺杆菌。可以使用脑心浸液加 20% 甘油与 10% 马血清或 25% 甘油蛋白胨水，另外也可以采用脱脂牛奶， $-70^{\circ}\text{C}$  可保存数年。

自 1982 年从胃粘膜中分离出幽门螺杆菌以来，目前胃细菌学研究已引起越来越多学者重视，对定居于胃内幽门螺杆菌特性认识更深入，可以进一步了解这个细菌在胃内生存机制及它的致病性，这就有助于学者们设计一个更有效可靠的根治幽门螺杆菌的方案。

表 2-1 幽门螺杆菌和有关细菌生化特征

生化特征	幽门螺杆菌	猫螺杆菌	鼬螺杆菌	空肠弯曲菌	琥珀沃林氏菌
尿素酶	+	+	+	-	-
过氧化氢酶	+	+	+	+	-
氧化酶	+	+	+	+	+
产生硫化氢	-	-	-	+	-
还原硝酸盐	-	+	+	+	+
马尿酸盐水解	-	-	-	+	-
碱性磷酸酶	+	+	+	-	-
精氨酸氨基肽酶	+	+	+	+	+
组氨酸氨基肽酶	+	+	+	-	-
亮氨酸氨基肽酶	+	+	+	+	+
谷氨酸转胺酶	+	+	+	-	-

## 主要参考文献

- [1] Marshall BJ, et al. Unidentified curved bacillus in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1983; ii: 1311.
- [2] Nomura AG, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med*, 1991; 325: 1132.
- [3] Taylor DE, et al. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at genome level. *J Bacteriol*, 1992; 21: 6800.
- [4] Beji A, et al. GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging or related to the genus *Campylobacter*. *Ann Inst Pasteur/Microbiol*, 1988; 139: 527.
- [5] Goodwin CS, et al. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin Nor Am*, 1993; 22: 5.
- [6] Goodwin CS, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int Syst Bacteriol*, 1989; 39: 397.
- [7] Westblom TU, et al. Improved isolation of *Campylobacter pylori* from gastric biopsies using a biphasic transport media. *Gastroenterology*, 1988; 94: A494.
- [8] Megraud F, et al. Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile, and protein content. *J Clin Microbiol*, 1985; 22: 1007.
- [9] Lior H. Serological characterization of *Helicobacter pylori*--a provisional serotyping scheme. *Ita J Gastroenterol*, 1991; 23 (suppl 2): 42.
- [10] Kung JSL, et al. Biotyping of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 1989; 29: 203.

- [11] Foxall PA, et al. Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. J Clin Microbiol, 1992; 30: 739.
- [12] Tee W, et al. Ribotyping of *Helicobacter pylori* from clinical specimens. J Clin Microbiol, 1992; 30: 1562.
- [13] Go MF, et al. Cluster analysis of *Helicobacter pylori* genomic DNA fingerprints suggests gastroduodenal disease-specific associations. Scand J Gastroenterol, 1995; 30: 640.
- [14] Hazell SL, et al. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces adaptation to an environment of mucus and important factors in colonization of the gastric epithelium. J Infect Dis, 1986; 153: 658.
- [15] Eaton KA, et al. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. Infect Immun, 1989; 57: 1119.
- [16] Eaton KA, et al. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect Immun, 1991; 59: 2470.
- [17] Lambert JR, et al. *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol, 1995; 30 (suppl 208): 33.
- [18] Cover TL, et al. Purification and characterization of the vacuolation toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem, 1992; 267: 10570.
- [19] Covacci A, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 5791.
- [20] Ernst PB, et al. Overview of the immune response to *Helicobacter pylori*. In: Hunt RH, Tytgat GNJ, eds. *Helicobacter pylori*: Basic mechanisms to clinical cure. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1994; 295.
- [21] West AP, et al. Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. J Clin Pathol, 1990; 43: 609.
- [22] Xia HX, et al. Transportation of *Helicobacter pylori* cultures by optimal systems. J Clin Microbiol, 1994; 32: 3075.
- [23] Drumm B, et al. Long term storage of *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol, 1989; 27: 1655.

[华杰松, 胡 森]

## 第二节 分子微生物学特性

自首次分离到幽门螺杆菌, 以及认识到幽门螺杆菌在胃炎、胃溃疡和胃癌形成中的作用以来, 分子生物学家对该病原体进行了积极的研究。

本节将论述至 1996 年初为止的关于幽门螺杆菌分子生物学方面的研究进展。以下重点讨论三个主要方面: 首先, 阐述基因交换(或交配行为)机制以及抗生素耐药机制。第二, 列表并简介已克隆的幽门螺杆菌基因及其已知的功能。第三, 将讨论幽门螺杆菌的基因结构图及基因组的多样性。

1992 年, 我综述过弯曲菌和螺杆菌的基因学, 读者可参考这一综述和了解一些早期的工作。

### 一、基因交换机制和抗生素耐药性

源于幽门螺杆菌的多个质粒的特征已在基因水平上进行了研究。研究的质粒中, 大部分为小质粒, 亦未发现这些质粒能从一个细菌传递给另一个细菌。到目前为止, 在幽门螺杆菌

的质粒中仍未鉴定出抗生素耐药基因。然而,随着联合应用抗生素根除胃内幽门螺杆菌的情形日益增多,将不可避免地使幽门螺杆菌获得质粒介导的耐药性。

1993年, Von Heinegg 等通过电镜已将噬菌体的特点识别出来,经过多次传代后在电镜下可观察到溶原现象。然而,我们并不知道转导是否存在,转导即细菌间通过噬菌体而发生DNA的转移。

自然转化可能是幽门螺杆菌最重要的基因交换机制。用三种不同的抗生素耐药标志,即耐利福霉素( $Rif^R$ )、耐链霉素( $Str^R$ )及耐灭滴灵( $Mtr^R$ ),实验证实每个活细胞的自然转化频率是 $Rif^R$ 和 $Str^R$ 为 $4 \times 10^{-4}$ , $Mtr^R$ 为 $3 \times 10^{-5}$ ,这些转化频率相当高,可比得上或超过其他的能发生自然转化的革兰氏阴性菌如淋球菌或流感嗜血杆菌的转化率。

尽管幽门螺杆菌的上述耐抗生素的机制目前研究不多,但目前认为获得性耐药可能为染色体基因突变所致。RNA多聚酶的 $\beta$ -亚单位发生突变,并阻止与3-利福霉素结合,从而引起耐3-利福霉素。类似地,耐链霉素可能因30S的核糖体蛋白基因发生突变所致。类似的突变特点在大肠杆菌已得到了广泛的研究。

目前亦观察到对灭滴灵的耐药性。灭滴灵常用于经典的三联疗法来根除幽门螺杆菌。幽门螺杆菌耐灭滴灵的机制涉及到丙酮酸盐/ $\alpha$ -酮戊二酸盐:铁氧还蛋白氧化还原酶(POR/KOR)。当灭滴灵浓度较低时,该酶活性受到抑制。另外,异柠檬酸盐裂解酶活性的表达使得 $Mtr^R$ 耐药菌能冲破因KOR活性缺乏而形成的代谢障碍。

幽门螺杆菌的某些菌株对红霉素及克拉霉素发生交叉耐药(法国约占10%,美国为3%~4%)。许多胃肠病学专家常用克拉霉素加上奥美拉唑根除幽门螺杆菌,该菌对红霉素和克拉霉素耐药则是由于23S核糖体RNA(rRNA)基因发生突变。在V区第2058位或第2059位氨基酸位点发生的改变,导致了大环内酯类的耐药。变异可发生在两个23S rRNA基因的一个或两个拷贝上。并且可决定对克拉霉素不同程度的耐药。

氟喹诺酮类耐药性非常容易在实验室或病人身上出现,因而这类药物不提倡用于抗幽门螺杆菌。耐环丙沙星是因多个突变所引起,且已确定这些突变发生在 $gyrA$ 基因,在“耐喹诺酮决定区”的第87位、88位和91位以及91、97双位点氨基酸替代改变。 $gyrA$ 基因编码DNA复制所需要的螺旋酶A亚单位。常用于抗幽门螺杆菌的其他抗生素如铋剂,羟氨苄青霉素及四环素尚未观察到耐药现象。

## 二、克隆的幽门螺杆菌基因

1. 尿素酶基因:幽门螺杆菌能产生一种在发病机制中起作用的尿素酶,该酶能将尿素分解为二氧化碳和氨。

**尿素酶在幽门螺杆菌的定居上很重要,因为尿素酶阴性突变株不能在动物模型如无菌小猪定居。**

尿素酶的产生和表达涉及到一组基因,且有9个基因已克隆成功。在限氮条件下,目前尿素酶亦能在大肠杆菌中进行表达。 $ureA$ 和 $ureB$ 为结构基因,编码尿素酶A和B亚单位。 $ureE$ 、 $ureF$ 、 $ureG$ 、 $ureH$ 基因是在大肠杆菌表达结构基因所必需。相反,尽管 $ureC$ 、 $ureD$ 、 $ureI$ 是尿素酶群的一部分,但在通过大肠杆菌表达尿素酶时并不需它们的参与。除了 $ureA$ 和 $ureB$ 外,所有其他基因产物的功能尚不



清楚。

2. 空泡细胞毒素基因：空泡细胞毒素能在数个哺乳动物的细胞株产生明显的空泡。在体内胃上皮细胞亦可发生类似的病变。*vacA* 基因已分别被四个不同的研究组克隆出来，毒素蛋白首先被合成为 140 kD 的毒素前体，再进一步加工成完整的具有活性的毒素，其分子量为 94 kD。虽然不是所有的幽门螺杆菌菌株都能产生该毒素，但所有的菌株都含有 *vacA* 基因。产毒素株具有更明显的病理损害作用。在鼠胃内可观察到高度纯化的 *vacA* 毒素能产生与人体相似的损伤，但并非所有的症状都相同。
3. *cagA* 及其相关基因：由于不是所有的幽门螺杆菌菌株都具有 *cagA* 基因，因而 CagA 蛋白具有变异性。CagA 蛋白具有高度的免疫原性，且与毒力增强有关。如从 90%~100% 的十二指肠溃疡患者分离的幽门螺杆菌为 *cagA*<sup>+</sup>，而仅 50%~60% 的浅表性胃炎病人分离的菌株为 *cagA*<sup>+</sup>。Cag 与诱导胃上皮细胞产生 IL-8 有关。新近，Blaser 组和 Crabtree 组通过诱导耐卡那霉素基因来破坏 Cag A，产生出 *cagA*<sup>-</sup> 突变株。他们发现 *cagA*<sup>-</sup> 突变株仍可诱导 IL-8 产生。

*cagA* 上游的两个基因已确定并命名为 *picA* 和 *picB* (有诱导细胞因子产生功能)。*picA* 产物与诱导 IL-8 的产生有关。氨基酸同源性研究提示 *picB* 与百日咳杆菌毒素分泌蛋白有相关性。需要进一步的研究来确定幽门螺杆菌如何刺激胃上皮细胞产生细胞因子 (特别是 IL-8)。

4. 粘附基因：幽门螺杆菌为了粘附到胃上皮细胞，需一种或更多的粘附因子。Evans 等克隆了一个名为 *hpaA* 的基因，他们认为这是一种血凝素，可能为一种粘附因子。但 O'Toole 等的最新研究提示该基因根本不编码粘附素，而只是一种脂蛋白。

表 2-2 克隆的幽门螺杆菌基因

基因	蛋白	功能	基因	蛋白	功能
<i>ureA</i>	UreA	尿素酶结构 亚单位	<i>hspA</i>	HSP A	热休克蛋白
<i>ureB</i>	UreB		<i>hspB</i>	HSP B	热休克蛋白
<i>ureC</i>	UreC	不清楚	<i>pfr</i>	Pfr	细菌铁蛋白
<i>ureD</i>	UreD	不清楚	<i>nixA</i>	Hpn	镍转运
<i>ureE</i>	UreE	尿素酶在大肠杆菌中表达所需	<i>hpn</i>	CopA	金属结合蛋白
<i>ureF</i>	UreF		<i>copA</i>	SodB	铜转运
<i>ureG</i>	UreG		<i>sodB</i>		超氧化物歧化酶
<i>ureH</i>	UreH		26kD	26kD Protein	不清楚
<i>ureI</i>	UreI	不清楚	<i>flaA</i>	flagellinA	鞭毛亚单位
<i>cagA</i>	CagA	不清楚	<i>flaB</i>	flagellin B	鞭毛亚单位
<i>picA</i>	PicA	不清楚	<i>gyrA</i>	DNA gyrase A	DNA 复制
<i>picB</i>	PicB	能诱导细胞因子产生 (IL-8)		亚单位	
<i>vacA</i>	VacA	空泡细胞毒素	<i>recA</i>	RecA	DNA 重组
<i>hpaA</i>	HpaA	脂蛋白 (粘附因子?)	16S rRNA	N/A	编码 16S rRNA
<i>lpp 20</i>	lipoprotein 20	脂蛋白	23S rRNA	N/A	编码 23S rRNA
			5S rRNA	N/A	编码 5S rRNA

整个系列的不同的幽门螺杆菌基因已被克隆 (表 2-2)。这些基因可能与细菌保护自身的功能以及可能使细菌更能抵抗宿主防御功能有关；包括热休克蛋白基因 *hspA* 和 *hspB*,