

和厚朴酚对幽门螺杆菌生长和空泡毒素 A 表达及活性的影响

刘丹 廖顺花 王莉新 王易*

(上海中医药大学 免疫学与病原生物学教研室 上海 201203)

摘要:【目的】幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是胃炎和消化性溃疡的病原体,但其具有潜在的正常菌群的特性。本研究通过评价临床常用中药厚朴的活性成分和厚朴酚对 *H. pylori* 的抑制作用及对其空泡毒素 A 表达和活性的影响,以反映其对 *H. pylori* 具有的潜在去除毒性的作用。【方法】使用平皿稀释固体法和脑心浸液液体法测定和厚朴酚对 *H. pylori* 的最低抑菌浓度,进一步通过中性红摄入法评价经无抑菌效果的低浓度和厚朴酚干预后, *H. pylori* 培养上清中空泡毒素 A (Vacuolating cytotoxin A, VacA)的毒性作用;并通过 RT-PCR 和 Western blot 方法检测经低浓度和厚朴酚处理后, *H. pylori* 菌体及分泌上清中 VacA mRNA 和蛋白的表达水平。【结果】发现高浓度(0.75 g/L)和厚朴酚对 *H. pylori* 具有抑制作用;而在远低于最低抑菌浓度时,和厚朴酚可有效抑制 *H. pylori* VacA 的形成和分泌。【结论】和厚朴酚具有下调 *H. pylori* 毒性的潜在作用,这为基于“致病性 *H. pylori* 的非致病性转变”这一机理的干预性治疗提供了有希望的研究前景。

关键词: 幽门螺杆菌, 空泡毒素, 和厚朴酚

基金项目: 上海市教育委员会科研项目(No. 07cz05); 上海市教育重点学科建设项目(No. J50301)

*通讯作者: Tel: 86-21-51322148; 信箱: wy1955@smmail.cn

收稿日期: 2012-11-23; 接受日期: 2013-02-05

Effect of honokiol on *Helicobacter pylori* growth and the expression and activity of vacuolating cytotoxin A

LIU Dan LIAO Shun-Hua WANG Li-Xin WANG Yi*

(Department of Immunology and Pathogen Biology, Shanghai University of TCM, Shanghai, 201203, China)

Abstract: [Objective] *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) was not only the pathogen of gastritis and peptic ulcer, but a potential normal flora. We detected the effect of honokiol (HK), a kind of Chinese herbal active ingredient from *Magnolia officinalis* commonly used in clinical treatment, on *H. pylori* growth and the expression and activity of VacA to demonstrate the potential effect of HK on down-regulating the toxicity of *H. pylori*. [Methods] We detected the minimum inhibitory concentration (MIC) of HK and further identified the toxic effect of VacA secreted from *H. pylori* by neutral red uptake test, and the mRNA and protein levels of VacA in *H. pylori* and its supernatants by RT-PCR and Western blot, after treated with a low concentration HK (0.09 g/L) without bacteriostatic effects. [Results] The results showed that the high concentration HK (0.75 g/L) can inhibit the growth of *H. pylori*, and HK could also inhibit the expression and activity of VacA effectively in the concentration far below the MIC. [Conclusion] HK could down-regulate the toxic effect of *H. pylori* potentially, and which provided a hopeful research prospect for intervention treatment based on transforming the pathogenic *H. pylori* to the non-pathogenic.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Vacuolating cytotoxin A (VacA), Honokiol (HK)

作为引起慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤等消化道疾病的病原体,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)已成为临床治疗的主要目标,并建立了有效的根治措施^[1]。但是,仍存在使临床医生感到棘手的问题:1)正在逐渐上升的 *H. pylori* 耐药性;2)根除率明显降低;3)患者对治疗方法的依从性^[2]。对 *H. pylori* 的基础研究显示,并非全部的 *H. pylori* 都具有致病性,有部分 *H. pylori* 因不产生相应的毒力因子,如空泡毒素 A (Vacuolating cytotoxin, VacA)、细胞毒素相关蛋白 A (Cytotoxin associated gene A, CagA)等,而不具

有致病性^[3]。流行病学资料结果显示,经抗生素治疗的 *H. pylori* 感染人群,其食管癌发病率增高(源于返流性食管炎的增加)^[4-5]。

因此,本文期望能够寻找到对 *H. pylori* 形成毒力因子具有抑制作用的物质,以便其可作为 *H. pylori* 感染的另一种治疗手段。而中医治疗慢性胃炎的临床实践恰恰提供了这样的线索。临床许多中药方剂在有效改善症状时,其 *H. pylori* 的转阴率并无显著改善。这说明在无显著杀菌疗效的前提下,中药可能潜在地抑制 *H. pylori* 毒力因子的形成与分泌。本研究即依据此假说进行了相应实验,现将部分结果发表如下。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株及中药

H. pylori 国际标准菌株 NCTC11637 购自于上海消化疾病研究所。胃癌细胞株 BGC-823 由上海中医药大学中药学院赠送。中药活性成分和厚朴酚购自上海同田生物技术有限公司。

1.2 培养基

混合抗生素: 多粘菌素 B (Polymyxin B Sulfate, Amerisco) 2.5×10^7 U/L, 两性霉素 B (Amphotericin B, Amerisco) 5 g/L, 万古霉素 (Vancomycin, Amerisco) 10 g/L, 磺胺增效剂(上海日初) 5 g/L。混合抗生素添加于培养基中, 用于抑制其它杂菌的污染, 同时可为 *H. pylori* 生长提供所需的胸腺嘧啶脱氧核苷^[6]。

哥伦比亚固体培养基: 哥伦比亚琼脂 (Columbia agar base, CAB)(上海日初) 39 g/L, 1‰ (V/V) 混合抗生素, 10% (V/V) 脱纤维羊血(上海青阳)。

脑心浸液液体培养基: 脑心浸液培养基(上海日初) 39 g/L, 1‰ (V/V) 混合抗生素。

1.3 *H. pylori* 的培养和鉴定

H. pylori 菌株的固体培养: 将菌株接种于含 10% 脱纤维羊血及混合抗生素的哥伦比亚琼脂固体培养基上, L 型棒均匀涂布, 透明胶带固定后放于充气罐内充入混合气体 (85% N_2 、10% CO_2 、5% O_2), 37 °C 恒温培养, 每天一次更换气体, 3–5 d 后进行菌种鉴定。取对数期细菌, 经无菌 PBS 洗涤后, 测其 OD_{600} 值, 1 OD 细菌浓度相当于 1×10^{11} CFU/L, 调细菌浓度为 1×10^9 CFU/L, 用于后续实验。

H. pylori 菌株的液体培养: 刮取已培养 48 h 的 *H. pylori* 菌苔, 混悬于 1 mL 无菌生理盐水, 吸取 200 μ L 接种于 4 mL 含混合抗生素的脑心浸液液体培养基中, 置入厌氧罐, 充入混合气体,

37 °C、100 r/min 振荡培养, 更换气体 1 次/d, 待液体混浊后进行鉴定。通过形态学和生理生化特征加以鉴定, 将具有典型菌落特征者进行涂片和革兰氏染色, 油镜观察其典型形态特征, 并进行快速尿素酶试验、过氧化氢试验、氧化酶试验等一系列生理生化鉴定。

1.4 中药活性成分对 *H. pylori* 最低抑菌浓度 (MIC) 的测定^[7]

固体法: 将 30 g/L 和厚朴酚倍比稀释成不同的浓度梯度, 每浓度取 1 mL 于无菌培养皿中, 再加入 9 mL 含 10% 脱纤维羊血以及混合抗生素的哥伦比亚琼脂, 使和厚朴酚的终浓度为 3.00、1.50、0.75、0.38、0.19、0.10、0.05 g/L。取 50 μ L 上述对数期的 *H. pylori* 菌液接种于制备好的含药固体培养基上, 培养 3–5 d 后观察细菌的生长情况, 每个浓度做 3 复板, 无细菌生长的最小药物浓度为 MIC。

液体法: 使用含混合抗生素的脑心浸液液体培养基对和厚朴酚进行倍比稀释, 使药液终浓度与固体法一致, 每个浓度做 3 复管, 加入对数期菌液 100 μ L, 培养 3–4 d 后, 每管各取 50 μ L 接种于不含中药活性成分的哥伦比亚琼脂固体培养基上, 无细菌生长的最小浓度为 MIC。

1.5 含 VacA 蛋白培养上清的制备

将对数期细菌分别培养于含有 0.09 g/L 和厚朴酚液体培养基中, 并设立不加药物处理的对照组, 每组 3 复管, 培养至液体浑浊 ($OD_{600}=0.8$) 后, 收集菌液, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, -20 °C 保存备用, 即为粗制 VacA 蛋白。

1.6 VacA 活性检测

胃癌细胞 BGC-823 作为 *H. pylori* 分泌的 VacA 毒性作用的靶细胞, 在本研究中用来评价 VacA 的细胞毒性效应。BGC-823 细胞培养于含 10% 新生牛血清 (Gibco) 的 RPMI1640 (Gibco) 培养液中,

置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养,待细胞生长至接近融合时传代。对数期BGC-823细胞接种至24孔细胞板,1×10⁵/孔,继续培养24 h,至细胞贴壁并铺满大部分板底后更换培养液,分别按照1:1滴度加入上述未经药物处理的含VacA蛋白培养上清、经和厚朴酚处理后的含VacA蛋白培养上清,终体积1 mL,细胞对照组加入无VacA蛋白的细胞培养液1 mL,24 h后吸弃上清,每孔加入0.05%中性红PBS溶液200 μL,置室温孵育8 min,500 μL PBS洗3次,加入200 μL 75%酸化乙醇,酶标仪测定570 nm吸光值(A_{570})^[8]。

1.7 半定量 RT-PCR 检测

使用革兰氏阴性细菌 RNA 提取试剂盒(OMEGA)进行细菌 RNA 提取,测定各样本的 OD_{260} 和 OD_{280} 以定量RNA浓度, $OD_{260}/OD_{280}>1.8$ 可用于实验。用10 μg RNA样本,使用RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)进行逆转录,反应体系和条件按照试剂盒说明书操作。用5 μL cDNA作为模板,以gyrB为内参,按照PCR Master Mix 试剂(Fermentas)使用说明,分别用VacA和gyrB引物,进行PCR检测,以分析VacA的mRNA表达水平。VacA引物为F: 5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3'; R: 5'-GCGTCTAAATAATTCCAAGG-3';产物长度570 bp。gyrB引物为F: 5'-CGCTAAAGAAAGTGGCACGAC-3'; R: 5'-TGCGCGTTTCTTCATCCAT-3';产物长度265 bp。反应条件为:94 °C 5 min;94 °C 15 s,55 °C 30 s (gyrB)/52 °C 30 s (vacA),72 °C 1 min,共35个循环(gyrB)/40个循环(vacA);72 °C 7 min。5 μL PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,80 V 恒压电泳30 min。用GBOX CHEMI 图像分析系统采集图像,并使用Smartview 软件读取密度值。结果用目的基因/gyrB 密度值之比表示。

1.8 细菌菌体和分泌蛋白样本的制备

菌体蛋白制备:收集含药物固体培养基上的

细菌,PBS洗3次,沉淀加入1 mL细菌裂解液(8 mol/L 脲素、4% CHAPS、1% Pharmalyte (pH 3-10)、1%蛋白酶抑制剂混合物,用前加1% DTT)悬浮。采用300 W超声粉碎细菌(工作10 s,间隔10 s)直至上清变清澈。4 °C、12 000 r/min离心40 min,取上清。用考马斯亮兰蛋白定量试剂盒(南京建成)定量蛋白浓度,-80 °C保存备用。

分泌蛋白制备:收集在含药物液体培养基中生长的细菌,将其高速离心,0.22 μm 滤膜过滤,上清加入10% 1 mol/L 三氯乙酸,4 °C 放置3 h以上,直至看到沉淀。4 °C、80 000 r/min 离心20 min,弃上清,沉淀加入1 mL 丙酮洗涤3次,空气中自然干燥。沉淀蛋白加入细菌裂解液溶解,定量蛋白浓度,-80 °C 保存备用。

1.9 Western blot 检测

取50 μg总蛋白进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,10%分离胶20 mA 15 min,3%堆积胶10 mA 1 h,200 mA 50 min 转膜,TTBS [100 mmol/L Tris-HCl,0.9% (W/V) NaCl,0.1% (V/V) Tween 20,pH 7.5] 5 min 洗3次,以5%脱脂奶粉TTBS封闭,常温振荡1 h。分别加入1:250 VacA 单抗(Santa Cruz)或1:500 GAPDH 单抗(Santa Cruz),4 °C 孵育过夜,TTBS洗3次,加入1:5 000 稀释的HRP 标记二抗(上海联科),常温振荡1 h,TTBS 5 min 洗3次,去除未结合二抗。取等量ECL 发光剂(A液、B液各1 mL)混匀,浸膜3-5 min,曝光后显影5-60 s,定影2 min。用GBOX CHEMI 图像分析系统采集图像,并使用Smartview 软件读取密度值。菌体蛋白中空泡毒素的表达以GAPDH 为内参,结果用目的蛋白/GAPDH 密度值之比表示,上清中空泡毒素的表达直接以目的蛋白密度值表示。

1.10 统计分析

使用SPSS 13.0 专业统计软件进行数据分析。实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各试验组

与对照组间差异性采用 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 细菌鉴定

肉眼可见直径约为 0.2 mm–1.0 mm 的圆形、半透明或透明的灰白色或无色的针尖样细小菌落, 典型菌落经革兰氏染色后, 油镜下可见 *H. pylori* 呈革兰阴性、弧形、S 形或海鸥展翅状的典型形态。进一步生理生化鉴定显示, 快速尿素酶试验、氧化氢试验、氧化酶试验均阳性者可确认为 *H. pylori* 菌株^[9–10]。

2.2 和厚朴酚对 *H. pylori* 生长作用的影响

本研究首先使用平皿稀释固体法和脑心浸液液体法测定和厚朴酚对 *H. pylori* 的最低抑菌浓度 (MIC), 以反映药物对 *H. pylori* 的抑制作用。结果显示和厚朴酚可在体外抑制 *H. pylori* 的生长, 其 MIC 为: 固体法为 0.75 g/L, 液体法为 0.33 g/L。

2.3 和厚朴酚对 *H. pylori* 分泌的 VacA 活性的影响

使用低于相应 MIC, 且无细胞毒性的和厚朴酚 (0.09 g/L) 药物浓度干预处理的 *H. pylori* 培养上

清, 作用于 BGC-823 细胞, 24 h 后通过中性红摄入法, 检测 VacA 的细胞毒性, 并以未经药物处理的 *H. pylori* 培养上清为 VacA 毒性对照组, 和未加入 VacA 蛋白的细胞为细胞对照组。使用抑制率表示药物对 VacA 活性的抑制能力。抑制率 = $[1 - (\text{处理组 OD} - \text{细胞对照组 OD}) / (\text{VacA 毒性对照组 OD} - \text{细胞对照组 OD})] \times 100\%$ 。结果显示, 与细胞对照组相比较, 未经药物处理的 VacA 蛋白对 BGC-823 细胞具有显著的毒性作用 ($P < 0.01$), 且和厚朴酚可显著抑制 VacA 的活性, $P < 0.01$ (图 1A), 抑制率为 50% (图 1B)。

2.4 和厚朴酚对 VacA mRNA 和蛋白表达水平的影响

进一步使用不抑制 *H. pylori* 生长的和厚朴酚 (0.09 g/L) 药物浓度干预细菌 24 h, 收集细菌培养上清, 检测细菌中 VacA mRNA、蛋白表达水平, 同时检测上清中 VacA 的蛋白水平, 以药物未干预细菌为对照。结果显示: 与对照组相比, 和厚朴酚可显著抑制菌体内空泡毒素 mRNA ($P < 0.05$) 和蛋白 ($P < 0.001$) 水平 (图 2A)。且可显著抑制 *H. pylori* 上清中 VacA 蛋白的表达 ($P < 0.01$, 图 2B)。

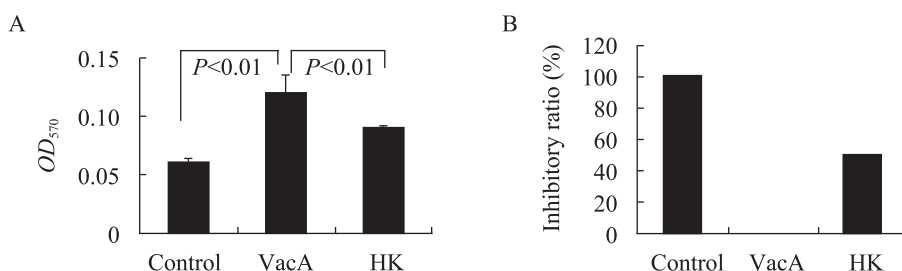


图 1 和厚朴酚对 *H. pylori* 分泌的 VacA 活性的体外影响

Fig. 1 Effects of HK on activities of VacA secreted by *H. pylori* in vitro

注: A: 中性红掺入后, 各组细胞的 OD₅₇₀ 值, 以反映 *H. pylori* 培养上清中 VacA 对 BGC-823 细胞的毒性作用; B: 各组的抑制率, 以反映药物对 VacA 活性的抑制能力. Control: 未经 VacA 干预的细胞对照; VacA: 未经药物处理的 VacA 对照; HK: 和厚朴酚处理组。

Note: A: To identify the toxic effect of VacA secreted from *H. pylori* on BGC-823 cell, OD₅₇₀ of each group was identified by neutral red uptake test; B: The inhibitory ratio of each group showed the inhibitory effect of HK on the VacA activity. Contrl: Cells without VacA treatment; VacA: Cytotoxicities of VacA secreted by *H. pylori* without medicine interference; HK: Cytotoxicities of VacA secreted by *H. pylori* with HK interference.

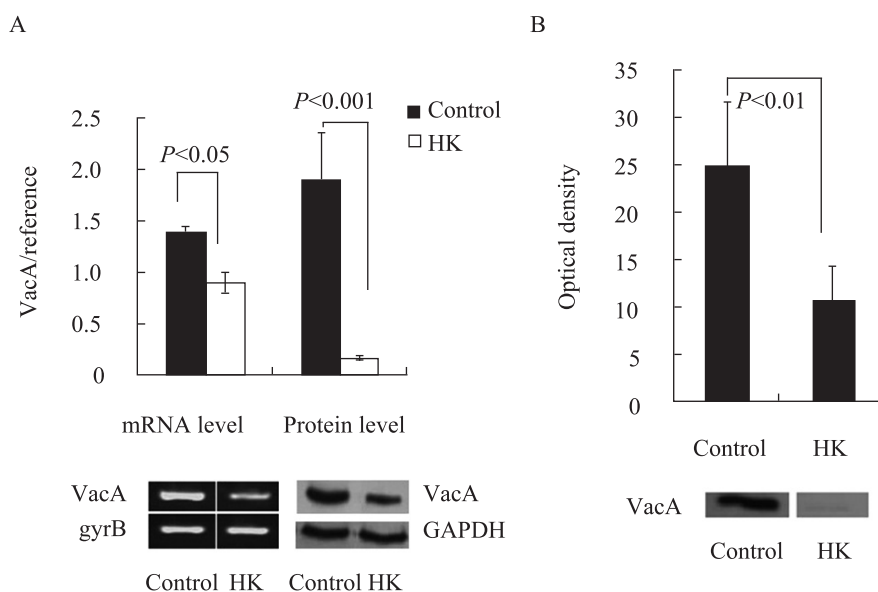


图2 和厚朴酚对 *H. pylori* 中 VacA mRNA 和蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of HK on the mRNA and protein level of VacA expressed by *H. pylori*

注: A: *H. pylori* 菌体中 VacA mRNA 和蛋白水平; B: *H. pylori* 培养上清中 VacA 的蛋白水平; Control: 药物未处理对照组; HK: 和厚朴酚处理组。

Note: A: The mRNA and protein level of VacA in *H. pylori*; B: The protein level of VacA in the *H. pylori* culture supernatant. Control: Cell group untreated with HK; HK: HK treated group.

3 讨论

虽然因 *H. pylori* 的发现, 胃炎和消化性溃疡的发生机制得到了很好的解释, 而且针对 *H. pylori* 的根除疗法也取得了可观的临床疗效。但因耐药性、复发率高等问题的困扰, 由 *H. pylori* 引起的消化道感染依然是目前一种危害民众的常见疾病^[11]。而类似耐药性、复发率升高等问题也使临床根除疗法的依从性大打折扣。基于此, 部分学者改从临床治疗胃十二指肠疾病的中药中寻找更合适的治疗手段。王绪霖等^[12]曾经从200种中药中筛选出黄芩、黄连、黄柏、厚朴、枳实、槟榔等38种具有抑制 *H. pylori* 作用的中药。但其药物作用浓度普遍高于临床实际应用浓度。

目前认为, *H. pylori* 致病性与其分泌的多种毒力因子有关, 包括尿素酶(Ure)、鞭毛蛋白(Fla)、细胞毒素相关蛋白A (CagA)和空泡毒素A (VacA)

等。尤以VacA的毒性作用倍受关注^[13]。本研究选取VacA作为中药成分和厚朴酚等抗 *H. pylori* 毒性作用的研究对象, 在对 *H. pylori* 生长无抑制作用且无细胞毒性作用的浓度下, 发现了其对VacA的合成与分泌的影响作用, 可较好地解释“黄连泻心汤”等临床治疗胃炎及溃疡的有效方药的可能药理作用机制。同时也为应对目前根除疗法所遇之耐药性、复发率高等问题提供了新的思路。有研究表明丧失CagA和VacA蛋白表达的 *H. pylori* 菌株一般不具有致病性, 所以这些无致病因子表达的 *H. pylori* 在人体中的存在, 可能不仅无害, 抑或有益, 而成为潜在的正常菌群^[5]。以此而论, 本项研究发现就有可能成为对 *H. pylori* 化害为利的滥觞。因为有报道, *H. pylori* 的存在有助于降低食道癌和儿童腹泻的发病率^[5,14]。

作为毒性蛋白, VacA 可引起靶细胞发生空泡化、凋亡、骨架重排等病理改变, 最终导致宿主

细胞死亡。并可促进 *bcl-2*、*bax*、*C-myc*、*caspase3* 等凋亡相关基因水平上调^[15-16]; 也可干扰表皮生长因子(EGF)信号转导, 抑制胃粘膜损伤修复, 从而抑制细胞增殖和溃疡愈合^[17]; 还可以通过增加上皮细胞通透性, 利于营养物质和尿素的运输, 从而促进 *H. pylori* 生存和定殖^[18]。故针对 VacA 的研究可以成为对致病性 *H. pylori* 的非致病性改造的重要前提, 而本研究之发现即为这一前提提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 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]. Internal Medicine, 2012, 51(22): 3103–3108.
- [2] Seck A, Burucoa C, Dia D, et al. Primary antibiotic resistance and associated mechanisms in *Helicobacter pylori* isolates from Senegalese patients[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2013, 12(1): 3–7.
- [3] Kim SH, Park M, Woo H, et al. Inhibitory effects of anthocyanins on secretion of *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins[J]. International Journal of Medical Sciences, 2012, 9(10): 838–842.
- [4] Ashktorab H, Entezari O, Nouraie M, et al. *Helicobacter pylori* protection against reflux esophagitis[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2012, 57(11): 2924–2928.
- [5] Blaser MJ. An endangered species in the stomach[J]. Scientific American, 2005, 292(2): 38–45.
- [6] 梁昌盛, 黄锦桃, 王玲, 等. 幽门螺杆菌体外培养条件的研究[J]. 临床医学工程, 2012, 19(8): 1259–1260.
- [7] 许华玉, 林海祥. 药物抗菌作用测定方法[A]//马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版, 2001, 2: 210–213.
- [8] 杜奕奇, 李兆申. 幽门螺杆菌空泡毒素活性的体外观察[J]. 上海医学, 2005, 28(10): 858–861.
- [9] Wang F, Luo LD, Pan JH, et al. Comparative genomic study of gastric epithelial cells co-cultured with *Helicobacter pylori*[J]. World Journal of Gastroenterology, 2012, 18(48): 7212–7224.
- [10] 刘琳娜, 丁士刚, 张静, 等. 几种培养幽门螺杆菌方法的比较[J]. 胃肠病学, 2012, 17(4): 240–241.
- [11] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration[J]. Lancet, 1984, 323(8390): 1311–1315.
- [12] 王绪霖, 缴稳玲, 吕宗舜, 等. 抑制幽门螺旋菌中药的初步筛选[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 1(9): 534–536.
- [13] Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the Vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(15): 10570–10575.
- [14] Bode G, Brenner H, Adler G, et al. Recurrent abdominal pain in children: evidence from a population-based study that social and familial factors play a major role but not *Helicobacter pylori* infection[J]. Journal of Psychosomatic Research, 2003, 54(5): 417–421.
- [15] Fujikawa A, Shiradaka D, Yamamoto S, et al. Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*[J]. Nature Genetics, 2003, 33(3): 375–381.
- [16] Yuan JP, Li T, Shi XD, et al. Deletion of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis[J]. World Journal of gastroenterology, 2003, 9(10): 2251–2257.
- [17] Pai R, Wyle FA, Cover TL, et al. *Helicobacter pylori* culture supernatant interferes with epidermal growth factor activated signal transduction in human gastric KATOIII cell[J]. The American Journal of Pathology, 1998, 152(6): 1617–1624.
- [18] Papini E, Satin B, Norais N, et al. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin[J]. The Journal Clinical Investigation, 1998, 102(4): 813–820.