

幽门螺杆菌感染致胃黏膜及尿中 RNA 损伤水平测定

刘 晓 刘亚巍 罗庆峰 张 帆 刘 倩 陈 哲 蔡剑平

摘 要 **目的** 检测幽门螺杆菌(Hp)感染患者胃窦部黏膜及尿液中 8-氧化脱氧鸟苷及 8-氧化鸟苷水平,探讨 Hp 感染与 DNA 及 RNA 氧化损伤的相关性,并比较不同取材部位水平的差异。**方法** Hp 阳性组 85 例, Hp 阴性组 31 例。分别留取尿液标本以层析分析法,同时两组中各 30 例取胃窦部黏膜以免疫组化法检测 8-氧化脱氧鸟苷及 8-氧化鸟苷。**结果** 胃窦部黏膜检测结果显示 Hp 阳性组 8 氧化鸟苷高于 Hp 阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$), 8-氧化脱氧鸟苷高于 Hp 阴性组,差异无统计学意义($P > 0.05$);尿液检测, Hp 阳性组 8-氧化鸟苷及 8-氧化脱氧鸟苷水平均高于 Hp 阴性组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 尿液检测与胃黏膜组织检测结果趋势一致, Hp 感染后 DNA 及 RNA 氧化损伤水平高于 Hp 阴性对照组,且尿液检测更敏感。RNA 氧化产物 8-氧化鸟苷可能是 Hp 感染致病的一个较敏感的指标。

关键词 8-氧化鸟苷 8-氧化脱氧鸟苷 幽门螺杆菌 尿液 胃黏膜

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.024

Determination of the Level of RNA Damage in Gastric Mucosa and Urine in Patients with Helicobacter Pylori Infection. Liu Xiao, Liu Ya-wei, Luo Qingfeng, et al. Gastroenterology Department, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Abstract **Objective** To explore the correlation and difference of damage to DNA and RNA with helicobacter pylori by detecting the level of 8-oxodGsn and 8-oxoGsn of urine and gastric mucosa in patients infected by helicobacter pylori. **Methods** A total of 85 patients were involved in Hp positive group and 31 patients in Hp negative group. 8-oxoGsn and 8-oxodGsn were detected in urine sample by chromatographic analysis, and gastric sinus mucosa by immunohistochemical method. **Results** The consequence of gastric sinus mucosa detection presented that 8-oxoGsn was higher in Hp positive group than that in HP negative group and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). 8-oxodGsn was higher in Hp positive group than that in Hp negative group, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). Urine tests showed that both 8-oxoGsn and 8-oxodGsn were higher in Hp positive group than that in Hp negative group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The detection results of urine were similar with that of gastric mucosa and urine tests seemed to be more sensitive. The oxidative damage of DNA and RNA was higher in patients with Hp infection. 8-oxoGsn as one of the RNA oxidative damage products may be a sensitive indicator of Hp infection.

Key words 8-oxoGsn; 8-oxodGsn; Helicobacter pylori; Urine; Gastric mucosa

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)人群感染率高,其定植于胃黏膜上皮,引发多种消化系统疾病,其中 15%~20% 发生消化性溃疡,5%~10% 发生 Hp 相关消化不良,约 1% 发生胃恶性肿瘤,包括胃癌、胃 MALT 淋巴瘤,几乎所有 Hp 感染者都存在慢性活动性胃炎^[1-4]。

细胞在正常生理活动中会产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), ROS 可导致 DNA 及 RNA 损伤,但正常机体可通过抗氧化酶及非酶抗氧化防御机制清除 ROS,使人体的氧化及抗氧化能力处于动态平

衡之中。如有电离辐射或慢性炎症等原因可使机体自由基产生过多,造成细胞损伤。当 8-氧化鸟嘌呤脱氧核苷酸掺入 DNA,或者 DNA 链上的鸟嘌呤经氧化修饰生成 8-氧化脱氧鸟苷(8-oxodGsn),造成 DNA 氧化损伤时均可在 DNA 子链上引起点突变。当 8-氧化鸟嘌呤核苷酸掺入 RNA 时可造成 RNA 氧化损伤,导致变异蛋白的产生,进而影响机体正常生理功能^[5]。

Hp 感染可致多核细胞聚集于胃黏膜并诱发炎症反应,增加活性氧自由基产生^[6]。已有研究证实 Hp 感染增加 DNA 损伤标志物 8-oxodGsn 的生成^[7]。但少有研究关于 Hp 感染与 RNA 损伤的关系。本研究的目的即通过检测不同部位 8 氧化脱氧鸟苷及 8 氧化鸟苷水平,探讨 Hp 感染与 DNA 及 RNA 氧化损伤的相关性,并比较不同取材部位水平的差异。

作者单位:100730 北京医院消化科(刘晓、罗庆峰、张帆); 100031 中共中央办公厅警卫局保健处(刘亚巍);100730 北京医院检验科(刘倩);100730 北京医院老年医学研究所(陈哲、蔡剑平)

通讯作者:罗庆峰,电子信箱:luoqf2000@126.com;蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com

对象与方法

1. 患者入选标准: ①因消化不良等症状行胃镜检查, 确诊慢性胃炎, 胃镜下快速尿素酶法检测 Hp 阳性, C¹³呼气试验阳性; ②除外胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌、胃 MALT 淋巴瘤、冠心病、糖尿病、肾功能不全等疾病; ③以胃镜下诊断慢性胃炎, 快速尿素酶检测 Hp 阴性, C¹³呼气试验阴性者作为对照; ④所有患者均签署知情同意。

2. 取材部位及方法: ①胃镜下取胃窦部胃黏膜组织, 制作蜡块, 切片, 15A3 抗体染色观察 RNA 氧化水平, N45.1 抗体染色观察 DNA 氧化水平, 在研究级显微镜下观察采集图像, 用 Image-Pro Plus (IPP) 软件进行定量分析, 背景校正后, 计算平均吸光度 (A), 该值与染色深度呈正比, 因此可通过 A 值进行相对定量。为保证客观性, 各样本经 3 人独立定量计算后取平均值, 作为最终 A 值。所有用于定量的图像均在相同亮度及曝光条件下采集获取; ②胃镜检查结束后留取患者尿液标本, 置于 -80℃ 冰箱保存备用。常温解冻标本后, 生化分析仪酶法检测尿液中肌酐水平; 放射性核素稀释液相层析分析法检测尿液中 8-氧化

脱氧鸟苷 (8-oxodGsn) 及 8-氧化鸟苷 (8-oxoGsn) 水平, 将检测到的尿液中 8-oxodGsn 及 8-oxoGsn 含量用肌酐进行校正。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 24.0 统计学软件对数据进行统计分析, 数值变量用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 独立样本 t 检验分析两组均数差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 患者基本情况: 116 例患者入组, 其中 Hp 阳性组 85 例, Hp 阴性组 31 例。Hp 阳性组及阴性组分别有 30 例取得胃窦部黏膜组织, 进行免疫组化检测。两组患者均留取尿液标本进行尿液 8-oxodGsn 及 8-oxoGsn 检测。

2. 胃黏膜免疫组化法检测 DNA 及 RNA 氧化损伤产物结果: Hp 阳性组及 Hp 阴性组各 30 例, 其中, Hp 阳性组男性 16 例, 女性 14 例, 患者平均年龄 43.3 ± 5.6 岁, Hp 阴性组男性 13 例, 女性 17 例, 患者平均年龄 45.7 ± 3.8 岁, 两组患者年龄比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 Hp 阳性组与 Hp 阴性组一般情况比较

组别	n	男性/女性 (n)	年龄	WBC	ALT
Hp 阳性组	30	16/14	43.3 ± 5.6	6012.03 ± 1012.08	40.31 ± 10.92
Hp 阴性组	30	13/17	45.7 ± 3.8	6045.23 ± 1012.23	38.21 ± 5.90

P 均 > 0.05

15A3 抗体 (鼠抗 8-oxoGsn 单克隆抗体) 染色结果显示, Hp 阳性组胃黏膜出现较深染色, Hp 阴性组染色较淡, 经 IPP 软件定量分析, A 值分别为 0.12 ± 0.02 与 0.07 ± 0.01 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

N45.1 抗体 (鼠抗 8-oxodGsn 单克隆抗体) 染色结果显示, Hp 阳性组与 Hp 阴性组的染色深浅程度相当, 经 IPP 定量分析, A 值分别为 0.22 ± 0.02 与 0.21 ± 0.03 , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1、图 2)。

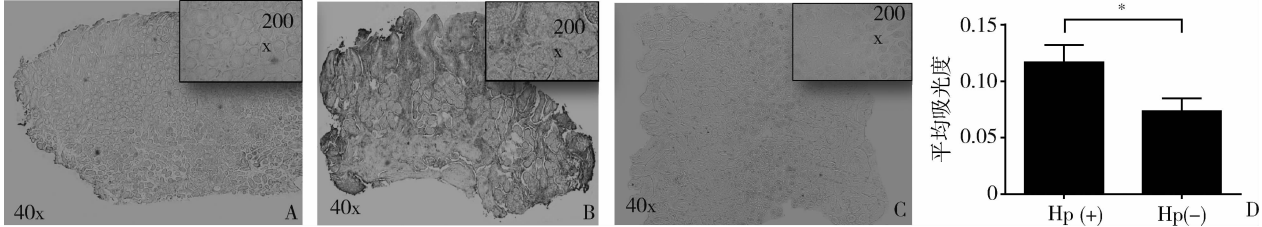


图 1 胃黏膜 RNA 氧化水平变化图

A. Hp(-) 胃黏膜组织; B. Hp(+) 胃黏膜组织; C. 不加 15A3 抗体的空白对照; D. 免疫组化 IPP 软件定量分析

3. 尿液色谱分析法肌酐校正检测 DNA 及 RNA 氧化损伤产物结果: Hp 阳性组 85 例 (其中男性 37 例, 女性 48 例), Hp 阴性组 31 例 (其中男性 14 例, 女性 17 例), 比较两组年龄、性别、白细胞 (WBC, 单位/mm³)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT, 单位 U/L) 差异均无统计学意义

(表 2)。Hp 阳性组尿液 8-oxoGsn 值 3.55 ± 1.17 (单位: $\mu\text{mol/mol}$), 8-oxodGsn 值 1.96 ± 0.80 (单位: $\mu\text{mol/mol}$), Hp 阴性组尿液 8-oxoGsn 值 2.35 ± 0.57 (单位: $\mu\text{mol/mol}$), 8-oxodGsn 值 1.46 ± 0.39 (单位: $\mu\text{mol/mol}$)。与对照组比较, 差异均有统计学意义 (图 3)。

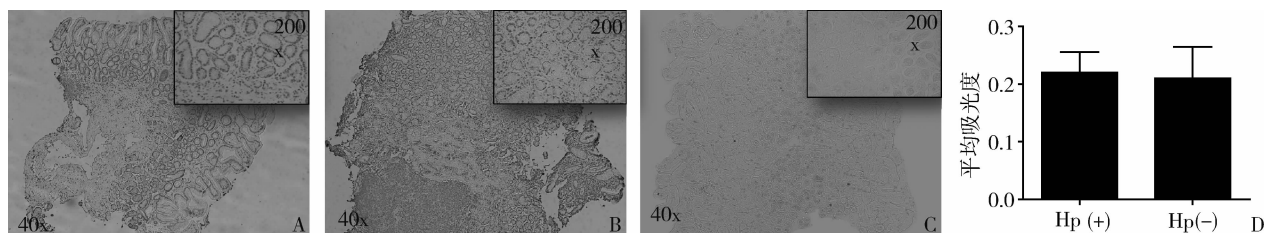


图2 胃黏膜DNA氧化水平变化图

A. Hp(-)胃黏膜组织;B. Hp(+)胃黏膜组织;C. 不加N45.1抗体的空白对照;D. 免疫组化IPP软件定量分析

表2 Hp阳性组与Hp阴性组一般情况比较

组别	n	男性/女性(n)	年龄(岁)	WBC(/mm ³)	ALT(U/L)
Hp 阳性组	85	37/48	46.08 ± 11.09	6044.47 ± 1169.21	41.6 ± 11.70
Hp 阴性组	31	14/17	46.55 ± 8.97	6080.65 ± 1075.38	38.13 ± 6.02

P 均 > 0.05

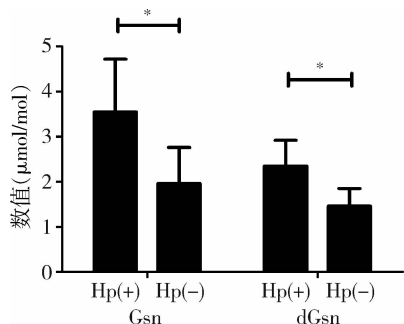


图3 Hp阳性组与Hp阴性组尿液8-oxodGsn与8-oxoGsn比较

讨 论

幽门螺杆菌(Hp)是革兰阴性微需氧,选择性定植于胃内的细菌^[8]。因其与胃癌发病的相关性,世界卫生组织已将Hp列为I类致癌物。Hp导致胃癌发生的危险因素包括细菌因素,如CagA(+)菌株、感染株的起源以及宿主因素,包括编码IL-1β、IL-8、IL-10、TNF-α及IFN-γ的基因多肽性^[9-11]。Hp感染后,导致机体持续存在炎症反应,而慢性炎症将导致组织损伤、氧化应激及DNA损伤^[12-14]。与未感染Hp的胃黏膜组织比较,感染Hp的胃黏膜组织凋亡细胞增加,根除Hp治疗后,凋亡细胞明显减少^[15]。

8氧化脱氧鸟嘌呤(8-oxodGsn)是DNA氧化损伤的标志物,在Hp感染的胃黏膜组织、血浆中均会增高。已有研究证实,以8-oxodGsn为标志物,测得DNA损伤水平与Hp感染程度及部位相关^[16,17]。也有研究证实严重胃炎及胃癌患者组织8-oxodGsn水平增高^[18]。但目前关于Hp感染与RNA损伤的研究较少。RNA为单链结构,缺乏蛋白和氢键保护,更靠

近线粒体的位置,因此较DNA更易受到氧化应激的影响。而8氧化鸟嘌呤即是目前唯一在RNA中有特征性的氧化碱基^[19]。有研究发现8-oxoGsn在癌旁组织中含量低,而在胃癌组织中含量明显增高,提示RNA氧化损伤可能在胃癌的发生、发展中发挥作用^[20]。

本研究收集了Hp感染患者的胃黏膜组织及尿液样本,分别进行了8-oxodGsn及8-oxoGsn的检测,发现无论在胃黏膜组织还是尿液标本中,8-oxodGsn及8-oxoGsn水平均高于Hp阴性对照组,说明Hp感染后氧化应激水平增加,DNA及RNA氧化损伤均有一定程度的提高,且在胃黏膜局部组织进行二者水平检测,分别与对照组相比,RNA氧化损伤程度高于DNA氧化损伤程度。尿液标本中,8-oxoGsn亦高于8-oxodGsn,说明RNA氧化损伤较DNA氧化损伤在Hp感染患者中可能更敏感。在检测标本的选择上,考虑到血浆中8-oxodGsn及8-oxoGsn含量极少,且血浆是内环境的一部分,代谢物可不断由肾小球滤过排出体外,而尿液作为代谢废物的最终通路,两种氧化鸟苷均富集于此,含量较血浆明显增高,反应的是全身氧化应激的水平,且尿液标本更易取得,因此从生理角度和检测角度两方面考虑,是比较合适的检测标本。本研究选择了两种检测标本,即胃黏膜局部组织及尿液,均发现Hp感染后DNA及RNA氧化损伤水平高于Hp阴性对照组,且8-oxoGsn值增高更明显,因此尿液中8-oxoGsn是一种敏感的可用于评估Hp感染引起的氧化应激指标的标志物。

当然,本研究也存在一定的局限,首先,未除外饮食情况等混杂因素。其次,本研究未选择血液标本同时检测8-oxodGsn及8-oxoGsn。再者,研究样本数

量偏少,尚未进一步研究根除治疗后两者的变化。但本试验研究给临床工作提出了一个很好的方向。8-oxodGsn 研究已很多,作为一个普遍存在的 DNA 氧化损伤标志物,其与癌症的发生有紧密的联系,且 8-oxodGsn 的高表达与很多肿瘤的预后不佳相关。本研究发现 RNA 氧化水平改变较 DNA 氧化水平改变在 Hp 感染的慢性胃炎患者中更敏感、更明显,且尿液标本更易取得,因此尿液中的 RNA 氧化产物 8-oxoGsn 可能是 Hp 感染致病的一个比较敏感的指标,其是否能在未来预示胃癌转归方面起到临床提示意义是一个值得研究的方向。

参考文献

- 1 Sipponen P. Natural history of gastritis and its relationship to peptic ulcer disease[J]. *Digestion*, 1992,51(Suppl 1): 70-75
- 2 Moayyedi P, Forman D, Braunholtz D, *et al.* The proportion of upper gastrointestinal symptoms in the community associated with *Helicobacter pylori*, lifestyle factors, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Leeds HELP Study Group[J]. *Am J Gastroenterol*, 2000,95(6):1448-1455
- 3 Sugano K. Screening of gastric cancer in Asia[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2015,29(6):895-905
- 4 Tanaka M, Chock PB, Stadtman ER. Oxidized messenger RNA induces translation errors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(1): 66-71
- 5 Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens[J]. *Gastroenterology*, 2010,139(6):1894-1901
- 6 Noorgaard A, Andersen LP, Nielsen H. Neutrophil degranulation by *Helicobacter pylori* proteins[J]. *Gut*, 1995, 36,(3):354-357
- 7 Khodaii Z, Ghaderian SM, Akbarzadeh Najar R, *et al.* *cagA* and *vacA* status and influence of *Helicobacter pylori* infection on serum oxidative DNA damage in Iranian patients with peptic ulcer disease[J]. *Ir J Med Sci*, 2011,180(1):155-61
- 8 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii[J]. *N Engl J Med*, 1991,325,(16):1132-1136

- 9 De Sablet T, Piazuolo MB, Shaffer CL, *et al.* Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk[J]. *Gut*, 2011,60(9):1189-1195
- 10 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, *et al.* Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach[J]. *Cancer Res*, 1995,55(10):2111-2115
- 11 Zamboni CF, Basso D, Navaglia F, *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome[J]. *Cytokine*, 2005,29(4):141-152
- 12 Augusto AC, Miguel F, Mendonça S, *et al.* Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases[J]. *Clin Biochem*, 2007,40(9-10):615-622
- 13 Chaturvedi R, de Sablet T, Coburn LA, *et al.* Arginine and polyamines in *Helicobacter pylori*-induced immune dysregulation and gastric carcinogenesis[J]. *Amino Acids*, 2012,42(2-3):627-640
- 14 Ramarao N, Gray-Owen SD, Meyer TF. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 38(1):103-113
- 15 Jang TJ, Kim JR. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*[J]. *J Gastroenterol*, 2000,35(4):265-271
- 16 Everett SM, White KL, Drake IM, *et al.* The effect of *Helicobacter pylori* infection on levels of DNA damage in gastric epithelial cells[J]. *Helicobacter*, 2002,7(5):271-280
- 17 Ladeira MS, Rodrigues MA, Salvadori DM, *et al.* DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004,13(4):631-637
- 18 Raza Y, Khan A, Farooqui A, *et al.* Oxidative DNA damage as a potential early biomarker of *Helicobacter pylori* associated carcinogenesis[J]. *Pathol Oncol Res*, 2014,20(4):839-846
- 19 Fleming AM, Alshykhly OR, Zhu J, *et al.* Rates of chemical cleavage of DNA and RNA oligomers containing guanine oxidation products[J]. *Chem Res Toxicol*, 2015,28(6):1292-1300
- 20 林宪慧,余俊华,林海鸿,等. 人胃癌及癌旁组织 RNA 氧化损伤水平的比较及临床意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2015,31(1):172-176

(收稿日期:2017-07-28)

(修回日期:2017-09-22)

(上接第 77 页)

- 11 Park MS, Her IS, Cho HM, *et al.* Internal fixation of femoral head fractures (Pipkin I) using hip arthroscopy[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2014,22(4):898-901
- 12 李豪,吴震宇,王大麟. DAA 入路治疗 PIPKIN II 型股骨头骨折[J]. *中国骨科临床与基础研究杂志*, 2016,8(5):269-275
- 13 Massè A, Aprato A, Alluto C, *et al.* Surgical hip dislocation is a reliable approach for treatment of femoral head fractures[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015,473(12):3744-3751
- 14 Park KS, Lee KB, Na BR, *et al.* Clinical and radiographic outcomes of femoral head fractures: excision vs. fixation of fragment in Pipkin type I: what is the optimal choice for femoral head fracture? [J]. *J Orthop Sci*, 2015,20(4):702-707
- 15 陈明初. Herbert 螺钉治疗 Pipkin I、II 型股骨头骨折[J]. *临床骨科杂志*, 2016,19(2):196-196
- 16 龚景海,顾国明,鲍欣彪,等. 髋关节外科脱位入路手术治疗股骨

头骨折的应用体会[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2015,30(6):622-623

- 17 Gavaskar AS, Tummala NC. Ganz surgical dislocation of the hip is a safe technique for operative treatment of pipkin fractures[J]. *J Orthop Trauma*, 2015,29(12):544-548
- 18 Anthonissen J, Rommens PM, Hofmann A. Mosaicplasty for the treatment of a large traumatic osteochondral femoral head lesion: a case report with 2 year follow-up and review of the literature[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2016,136(1):41-46
- 19 马利杰,吴昊天,侯志勇,等. 改良 Allis 法治疗合并 Pipkin I、II 型骨折的髋关节后脱位[J]. *中华医学杂志*, 2014,94(7):533-535
- 20 Zelken JA. First-person long-term follow-up using autologous mosaicplasty for osteochondral lesion accompanying femoral head fracture[J]. *J Orthop Trauma*, 2016,30(2):70-74

(收稿日期:2017-06-20)

(修回日期:2017-09-12)