

人血清幽门螺杆菌 SodB 抗体检测 与胃癌发生的相关性研究*

田文静¹, 刘电力¹, 刘惠敏², 范清³, 谢文珍¹, 东英子¹ (1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学第四附属医院神经内科, 哈尔滨 150001; 3. 哈尔滨市香坊区疾病预防控制中心, 哈尔滨 150046)

摘要:目的 探讨由幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)基因组编码产生铁辅因子超氧化物歧化酶(SodB)人群血清抗体水平与胃癌发生的关系。方法 收集114例病例和104例对照的血清样本。用间接ELISA检测病例组和对照组的人群血清SodB抗体水平。应用条件Logistic回归方法分析SodB血清抗体水平与胃癌的关系。应用受试者工作特征曲线(ROC曲线)分析并评价SodB在胃癌血清学筛查中的价值。结果 在研究人群中,血清SodB抗体水平与胃癌发生有关($P < 0.05$)(OR=2.287, 95%CI:1.191~4.391)。应用ROC曲线确定SodB筛查胃癌的最佳临界值为0.028 0。研究人群ROC曲线下面积为0.575(95%CI:0.501~0.649)。结论 血清*H. pylori* SodB抗体水平与胃癌发生有关,单独应用SodB对胃癌进行筛查的效果不理想,与其他胃癌生物标志物联合应用或许可进一步提高胃癌筛查价值。

关键词:胃癌;幽门螺杆菌;铁辅因子超氧化物歧化酶;血清抗体;病例对照研究

中图分类号:R735.2;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)01-022-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.006

Correlative Study between Detection of Human Serum *Helicobacter Pylori* SodB Antibody and the Occurrence of Gastric Cancer

TIAN Wen-jing¹, LIU Dian-li¹, LIU Hui-min², FAN Qing³, XIE Wen-zhen¹, DONG Ying-zi¹

(1. College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150081, China; 2. Department of Neurology, the Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China;

3. Xiangfang Center for Disease Control and Prevention in Harbin, Harbin 150046, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the level of serum iron-cofactored superoxide dismutase (SodB) antibody encoded by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) genome in infected populations of *H. pylori* and the occurrence of gastric cancer. **Methods** Serum samples from 114 cases and 104 control were collected. Indirect ELISA was used to detect serum SodB antibody level in case group and control group. The relationship between serum SodB antibody level and GC risk was analyzed by conditional logistic regression. The value of SodB in serological screening of gastric cancer was analyzed and evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** The level of serum SodB antibody was correlated with the occurrence of gastric cancer in subjects with OR=2.287 (95%CI:1.191~4.391) ($P < 0.05$). The optimal cutoff value of SodB for screening gastric cancer was determined by using receiver operating characteristic (ROC) curve, and it was 0.028 0. The area under the ROC curve for subjects was 0.575 (95%CI:0.501~0.649). **Conclusion** The level of serum *H. pylori* SodB antibody was associated with the occurrence of gastric cancer. SodB alone was not effective in screening gastric cancer. It might be used in combination with other biomarkers of gastric cancer to improve further screening of gastric cancer.

Keywords: gastric cancer; *Helicobacter pylori*; SodB; serum antibody; case-control study

世界卫生组织在2012年公布的调查报告中显示,胃癌是一种多发于东亚地区的常见恶性肿瘤^[1]。在中国,虽然胃癌发病率和死亡率近年来均呈下降趋势^[2],但在2017年发布的中国恶性肿瘤报告中显示,2013年我国胃癌发病率在255种登记癌症中居第二位,是男性第二及女性第四常见的恶性肿瘤,是男性第三位及女性第二位癌症死亡原因。且在低、中、高度城市化地区胃癌的发病率和

死亡率均较高^[3]。由于其预后较差,因此选取一种简便、无痛苦、尽可能准确的方式进行早期筛查,是十分必要的。

由*H. pylori*基因组编码产生的铁辅因子超氧化物歧化酶(iron-cofactored superoxide dismutase, SodB)在幽门螺杆菌定植宿主胃黏膜的过程中起到重要作用,是影响幽门螺杆菌定植宿主胃部能力的毒力因子,利于氧化应激条件下幽门螺杆

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目面上项目(项目编号:12541288)。

作者简介:田文静(1973—),女,博士,哈尔滨医科大学公共卫生学院教授,研究方向:恶性肿瘤流行病学, E-mail:twj8267@sina.com。

通讯作者:东英子(1990—),女,硕士,研究方向:恶性肿瘤流行病学, E-mail:donglele1990@sina.com。

菌的生长和存活^[4]。在本研究中,我们通过对幽门螺杆菌 SodB 血清抗体水平和是否患胃癌之间的关系进行分析,来评价 SodB 作为胃癌血清学筛查的生物标志物的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2010年3~7月间从黑龙江省肿瘤医院住院处获得经临床诊断确诊的胃癌病例114例。对照包括2011年3~5月间来自哈尔滨市香坊区疾病预防控制中心的54例健康体检人群以及来自哈尔滨医科大学第四附属医院神经内科的50例非胃癌患者。所有研究对象知情同意后采集外周静脉血5 ml。

对研究对象采用问卷进行调查,调查问卷内容包括:一般人口学指标、疾病相关的主要暴露因素、胃癌患者的临床相关资料。

1.2 试剂和仪器 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物公司。山羊血清封闭液购自武汉 Boster 生物公司。辣根酶标记山羊抗人 IgG 购自北京中杉金桥生物公司。TMB 购自北京天根生化公司。其他试剂均为国产分析纯。重组质粒 sodB-pET32a 及其诱导表达的目的蛋白为本实验室制作并保存。

1.3 方法 将 SodB 纯化蛋白浓度稀释至 2,0.5, 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 每孔 100 μl 加至 96 孔板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗板 3 次, 每次 3 min, 每孔加入 200 μl 封闭液(1 mg/dl BSA), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h。用血清稀释液(0.1 ml/dl BSA + PBS)将目标血清按照 400, 1 600, 3 200, 3 600 倍稀释, 空白孔为 0.1 ml/dl BSA 和 PBS, 每孔 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。每孔加入 100 μl 用 PBS 稀释的辣根酶标记羊抗人 IgG(1:5 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。每孔加入 100 μl 显色液(TMB), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 15 min。加入等体积 1 mol/L 硫酸溶液终止反应, 450 nm 下读取吸光度 A 值。

1.4 统计学分析 采用 t 检验和 χ^2 检验来比较病例组和对照组之间的定量变量和定性变量分布差异情况。SodB 抗体的 A 值 \leq 最佳临界值则被定义为阳性, 反之则定义为阴性。应用条件 logistic 回归方法计算比值比(ORs)及其 95% 置信区间(95% CIs)来分析 SodB 抗体与胃癌之间的关系。通过计算 ROC 曲线下面积(area under the ROC curves, AUCs)来分析、评价 SodB 抗体在胃癌筛查中的价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本情况 本研究采用病例对照研究的方法, 通过年龄、性别进行 1:1 配对, 共纳入胃癌病例和对照各 114 例。

病例组和对照组年龄分别为 53.86 ± 8.15 岁和 53.05 ± 7.65 岁, 病例组与对照组间年龄分布均衡, 差异无统计学意义($t = 0.771$, $P = 0.441$)。病例组和对照组各包括男性 82 人(71.9%), 女性 32 人(28.1%)。受教育程度和 BMI 体重指数在病例组及对照组间差异有统计学意义($\chi^2 = 9.185$, $P = 0.027$; $\chi^2 = 16.121$, $P = 0.003$)。病例组和对照组吸烟人数分别为 66 人(57.89%)和 54 人(47.37%), 经检验两组吸烟情况存在统计学差异($\chi^2 = 9.376$, $P = 0.009$)。两组饮酒情况差异也具有统计学意义($\chi^2 = 9.783$, $P = 0.008$)。病例组中具有胃癌家族史人数为 11 人(9.65%), 而对照组中均无胃癌家族史, 经检验两组间差异具有统计学意义($\chi^2 = 23.892$, $P < 0.001$)。另外, 两组间 *H. pylori* 感染情况差异无统计学意义($\chi^2 = 1.559$, $P = 0.459$)。综上, 受教育程度、BMI 体重指数、吸烟情况、饮酒情况及胃癌家族史应作为多因素分析时的调整因素。

根据收集的临床资料按照 TNM 分期标准对胃癌患者进行临床分期, 其中 7.84%(8/102)为 I 期, 10.78%(11/102)为 II 期, 73.53%(75/102)为 III 期, 7.84%(8/102)为 IV 期, 缺失数据为 12 例。

2.2 人血清 SodB 抗体与胃癌发病风险的关系 见表 1。在本研究人群中, 选取 SodB 抗体 A 值 0.028(最佳临界值)作为筛查胃癌的临界值, 发现在病例和对照中 *H. pylori* SodB 抗体阳性率分别为 52.6%和 36.8%。logistic 回归结果显示, SodB 抗体与胃癌发病风险关联的 A 值(95% CI)为 2.287(1.191~4.391)。

表 1 人血清 SodB 抗体水平与胃癌发病风险之间的关系[n(%)]

SodB 感染情况	病例数	对照数	OR(95% CI)*	P
阴性	54(47.4)	72(63.2)	1.0	0.013
阳性	60(52.6)	42(36.8)	2.287(1.191~4.391)	

注: * 通过调整年龄、性别、BMI 体重指数、教育、吸烟、饮酒、肿瘤家族史后, 应用多因素 logistic 回归分析获得。

2.3 人血清 SodB 抗体 ROC 曲线下面积 见图 1。

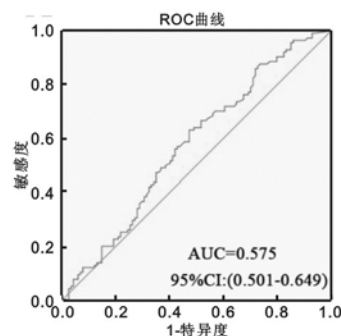


图 1 SodB 抗体滴度测定 ROC 曲线

3 讨论 幽门螺杆菌是已经被证实的上消化道疾病最重要的危险因素之一。流行病学调查显示其感染可使胃癌发生风险大幅度增加。研究显示,根除 *H. pylori* 可使胃癌发病风险减少。但因世界范围内有数目庞大的感染人群,使得根除全部感染人群体内的 *H. pylori* 无法实现。因此,迫切需要寻找用于筛查胃癌的可靠生物标志物。

大多数 *H. pylori* 感染者并无临床表现,癌症发生并确诊时往往已经到达癌症的中晚期,因此预防胃癌发生及改善其预后需要提早发现和诊断的时间。研究显示只有少数 *H. pylori* 感染者罹患胃癌^[5],说明个体对 *H. pylori* 毒力的免疫能力是不同的。目前研究多集中于 *H. pylori* 的几个明星毒力因子,如 CagA(细胞毒素相关基因蛋白)和 VacA(空泡毒素),对其他潜在毒力因子的研究较少。在本研究中,使用 *H. pylori* 毒力因子 SodB 作为免疫抗原,利用病例对照研究的方法研究其血清抗体与胃癌发生的关系,探讨 *H. pylori* SodB 能否作为有效的新胃癌筛查生物标志物。

本实验室使用 SodB 蛋白作为免疫抗原进行酶联免疫吸附测定,结果显示,在本研究人群,血清 SodB 抗体阳性可使胃癌发生风险显著升高,但二者间并不存在剂量反应关系(数据未列出)。使用 ROC 曲线验证 SodB 能否作为胃癌筛查的标志物,结果发现在本研究人群中,AUC 为 0.575(95% CI:0.501~0.649)。一般来说,AUC 在 0.5~0.7 被认为是准确度较低,0.7~0.9 为较好,高于 0.9 为高准确度^[6]。说明虽然 SodB 抗体阳性率与胃癌发生有关,但独立作为胃癌血清学筛查生物标志物的价值不高。近年有学者开始研究胃癌相关血清生物标志物的联合检测的作用,有学者发现了 PGI,PGI/PGII,TSGF,TK1 和 CEA 的联合检测

分析可能更有助于对胃癌的诊断^[7]。所以在接下来的研究中,可以考虑与其他血清生物标志物联合,以提高诊断水平。

综上所述,本研究发现 *H. pylori* SodB 血清抗体水平与胃癌发生有关,但其不宜独立作为胃癌血清学筛查的生物标志物。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1): 52-58.
Zuo TT, Zheng RS, Zeng HM, et al. Epidemiology of stomach cancer in China[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2017, 44(1): 52-58.
- [3] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Cancer incidence and mortality in China in 2013: an analysis based on urbanization level[J]. Chin J Cancer Res, 2017, 29(1): 1-10.
- [4] Tsugawa H, Mori H, Matsuzaki J, et al. Nordinhydroguaiaretic acid disrupts the antioxidant ability of *Helicobacter pylori* through the repression of SodB activity in vitro[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015(12): 734548.
- [5] Conteduca V, Sansonno D, Lauletta G, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: state of the art (review)[J]. Int J Oncol, 2013, 42(1): 5-18.
- [6] Zheng J, Ding X, Tian X, et al. Assessment of different biomarkers provides valuable diagnostic standards in the evaluation of the risk of acute rejection[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(9): 730-736.
- [7] 黄道桂, 任传路, 虞红艳, 等. 血清 PGI, PGII, TK1, TSGF, CEA 与 CA724 联合检测在胃癌诊断中的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(1): 101-104.
Huang DG, Ren CL, Yu HY, et al. Application value of combined detection of PGI, PGII, TK1, TSGF, CEA and CA724 in diagnostic gastric cancer[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(1): 101-104.

收稿日期: 2017-11-20

修回日期: 2017-12-13

(上接 21 页) J Mod Lab Med, 2013, 28(3): 61-64, 67.

- [2] 苍金荣, 任健康, 苏保凤, 等. 临床分离类细菌样变异念珠菌的实验室诊断[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(1): 59-61.
Cang JR, Ren JK, Su BF, et al. J Mod Lab Med, 2009, 24(1): 59-61.
- [3] 苍金荣, 王 华, 任健康, 等. 变异念珠菌常见菌落和菌体形态[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(2): 12-14, 18.
Cang JR, Wang H, Ren JK, et al. Variable candida albicans common morphology of colonies and mycelium[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(2): 12-14, 18.
- [4] 王 华, 苍金荣, 任健康, 等. 类细菌样念珠菌变异株真菌保守基因检测[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(3): 39-40, 43.
Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Detection of conserved gene in bacteria-like candida albicans variants[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(3): 39-40, 43.
- [5] 王 华, 苍金荣, 任健康, 等. 类细菌样念珠菌变异株

对普通抗细菌药物敏感性观察[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 45-47.

- Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Observation of the sensitivity of bacteria-like candida to normal antibiotics[J]. J Mod Lab Med, 2011, 26(4): 45-47.
- [6] Karst SM, Dueholm MS, McIlroy SJ, et al. Retrieval of a million high-quality, full-length microbial 16S and 18S rRNA gene sequences without primer bias[J]. Nat Biotechnol, 2018, 1(1). doi: 10.1038/nbt.4045. [Epub ahead of print]
- [7] 王 华, 苍金荣, 任健康, 等. 类细菌样念珠菌变异株生物学形状及遗传学特征研究[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 47-49, 52.
Wang H, Cang JR, Ren JK, et al. Study on biological characters and genetic characteristics of oidiomycetes mutant strains like bacterial morphology[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(4): 47-49, 52.

收稿日期: 2017-09-05

修回日期: 2017-10-23