

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201804005

幽门螺杆菌感染胃组织基因芯片生物信息学分析

付伟, 谢东, 班春梅, 邓亚婕, 代芳, 王松, 曹洁

(解放军联勤保障部队第925医院消化血液科, 贵阳 550009)

摘要:为探讨幽门螺杆菌感染胃组织后差异基因变化,深入分析参与疾病发生、发展的分子机制。从 GEO(Gene Expression Omnibus)数据库下载幽门螺杆菌感染胃组织基因芯片数据(GSE5081),根据胃粘膜组织是否受损分组,分别比较幽门螺杆菌感染者与阴性对照组,获得差异基因并进行功能分析包括 GO 分析、信号通路分析,基因相互作用及基因共表达,得到重要核心基因,并通过实时定量 PCR 方法进行验证。结果表明:得到参与幽门螺杆菌感染后上调的 44 个主要基因,主要涉及的 GO 分析及信号通路包括免疫反应、炎症反应、抗原提呈、细胞因子通路、因子受体关联,细胞粘附分子等。研究发现核心基因 *CXCR4*, *CCL20*, *JAK3*, *TNFAIP2*, *PLEK*, *HLA-DMA*, *PTPRC*, *CXCL13*, *BCL2A1*, 并通过实时定量 PCR 的方法进行部分验证, *CXCR4*, *CXCL5*, *CXCL2* 在幽门螺杆菌感染后的胃黏膜组织表达高于对照组。幽门螺杆菌感染后胃黏膜组织引起免疫反应,炎症反应,抗原提呈,因子受体关联,细胞粘附分子通路的激活。同时发现一些主要的趋化因子相关基因 *CXCR4*, *CXCL5*, *CXCL2*, *CCL20*, *CXCL1* 等,涉及增殖,炎症,免疫,凋亡基因 *JAK3*, *TNFAIP2*, *PLEK*, *HLA-DMA*, *PTPRC*, *BCL2A1* 等的表达上调,并实时定量 PCR 验证部分相关基因的表达。这些结果为从分子网络机制层面上认识幽门螺杆菌感染提供分析思路及基础。

关键词:幽门螺杆菌;基因芯片;生物信息学分析;胃黏膜组织

中图分类号:R573.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2019)01-045-08

Bioinformatics analysis of Helicobacter pylori infected gastric tissue microarray

FU Wei, XIE Dong, BAN Chunmei, DENG Yajie, DAI Fang, WANG Song, CAO Jie

(Department of Hematology, the 44th Hospital of PLA, Guiyang 550009, China)

Abstract:To analyze the differential gene changes after Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection in gastric tissue, and to further analyze the molecular mechanism involved in the occurrence and development of disease, the *H. pylori* infected gastric tissue microarray data (GSE5081) were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. In addition, according to whether the gastric mucosal tissue was damaged or not, the data were divided into the *H. pylori* infected group and the negative control group. Comparison was made between the two groups to obtain differential genes, and functional analyses including GO analysis, analysis of signal pathways, gene interactions, and gene co-expression were carried out, which obtained important core genes and were validated by real-time quantitative PCR. Results show that 44 major genes were involved in the upregulation of *H. pylori* infection. The mainly involved GO analyses and signal pathways included immune response, inflammatory response, antigen presentation, cytokine pathway, factor receptor association, cell adhesion molecules, and so on. The core genes were *CXCR4*, *CCL20*, *JAK3*, *TNFAIP2*, *PLEK*, *HLA-DMA*, *PTPRC*, *CXCL13*, and *BCL2A1*, and were partially verified by real-time quantitative PCR methods. The gene expressions of gastric mucosa with *CXCR4*, *CXCL5*, and *CXCL2* after *H. pylori* infections were higher than the control group. The gastric mucosal tissue infected by *H. pylori* induced immune response, inflammatory response, antigen presentation, factor receptor association, and cell adhesion molecule pathway activation. Meanwhile, some major chemokine-related genes *CXCR4*, *CXCL5*, *CXCL2*, *CCL20*, and *CXCL1* were associated with the upregulation of proliferation, inflammation, immunity, apoptosis genes such as *JAK3*, *TNFAIP2*, *PLEK*, *HLA-DMA*, *PTPRC*, and *BCL2A1*.

收稿日期:2018-04-19;修回日期:2018-07-09.

基金项目:解放军联勤保障部队第925医院院内课题(No.YNKT2016-01).

作者简介:付伟,男,博士,研究方向:生物信息学,肿瘤.E-mail:Fmmufw@Foxmail.com.

Real-time quantitative PCR was used to verify the expression of some related genes. The research results provide an analytical idea and basis for understanding the *H. pylori* infection from the perspective of molecular network mechanism.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Gene microarray; Bioinformatics analysis; Gastric mucosa

目前幽门螺杆菌感染 (*Helicobacter pylori*, HP) 已经非常常见, 平均大约 50% 的人群有感染^[1], 特别是在贫困地区, 因为自然环境、饮食卫生条件、及民俗习惯等感染率会更高。HP 感染者可能会导致慢性活动性胃炎, 糜烂性胃炎, 以及消化道溃疡等消化道疾病, 甚至造成食管腺癌, 胃萎缩, 胃癌和结直肠癌的潜在治病因素^[2]。目前对于 HP 感染已经有多种根治治疗方案, 但由于耐药菌的增多, 部分患者效果较差^[3]。同时一部分感染者并不是都会出现炎症改变或者癌变, 为了认识 HP 感染对于胃粘膜组织损伤的分子机制, 设计了对于 HP 相关芯片的生物信息学分析。

1 材料和方法

1.1 芯片数据来源

从 GEO 网站下载相关的基因芯片数据 (GSE5081)^[4]。该芯片使用微阵列比较了 HP 阳性和 HP 阴性胃糜烂和正常相邻粘膜的全基因组基因表达谱, 对 HP 感染后 mRNA 表达模式进行分析。从 8 例 HP 阴性糜烂性胃窦炎患者和 8 例 HP 阳性糜烂性胃窦炎患者的冷冻活检标本中提取总 RNA。同时, 从所有 16 名患者的邻近 (距离侵蚀至少 3 cm) 肉眼可见的正常窦腔样品取样。其中本研究涉及 HP 阴性患者包括三名男性患者和五名女性患者, 年龄为 50~88 岁 (中位数 67.5 岁)。组织学炎症程度轻度 6 例, 中度 2 例。其中两人患有肠化生。本研究涉 HP 阳性感染者年龄为 32~75 岁 (中位数 58.5 岁), 5 名男性和 3 名女性患者。组织学炎症程度轻度 3 例, 中度 1 例, 严重 4 例。其中两人有中度萎缩, 一人有局灶性肠化生。在内镜检查时, 没有患者接受质子泵抑制剂或抗生素治疗。所有患者属于高加索人种族。他们都没有吸烟, 还有其他已知的疾病。

1.2 芯片数据生物信息分析

首先芯片的质量评估^[5], 通过分组差异基因的筛选^[6], 并功能分析、注释。把组织样本分为 4 组, A) ER(+)HP(+), B) ER(+)HP(-), C) ER(-)HP(+), D) ER(-)HP(-), 其中 HP 为幽门螺杆菌, 而 ER 为损伤粘膜组织。分别分析受损组织, 健康组织组内的 HP 感染与否的差异基因变化, 最后

合并分析。具体是 A、B 组进行了差异分析得到分析结果差异分析 1。C、D 组进行了差异分析得到分析结果差异分析 2 (Q 值 < 0.05 , $Fold\ change \geq 1.2$, 阈值设定为分析软件推荐值)。将两组获得的差异基因取并集, 随后进行 GO 分析、通路分析, 以及基因共表达网络分析, 基因相互作用网络分析。

1.3 实时定量 PCR 验证

收集 2016 年 1 月至 2016 年 6 月, 在解放军联勤保障部队第 925 医院 C14 尿素氮呼气试验阳性者 ($CPM > 100$) 为感染者, 检测阴性者为健康对照各 10 例, 考虑诊断为慢性糜烂性胃炎, 并且在内镜检查时, 没有接受质子泵抑制剂或抗生素治疗, 排除其他疾病。感染者与对照组一般临床特征无统计学差异, 均取受损黏膜组织, 在获取胃黏膜组织后, 使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提取总 RNA, 然后进行反转录。cDNA 被适当稀释并用于 PCR。使用 SYBR Premix EX Taq (TAKARA) 和 ABI PRISM 7300 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) 以 β -actin 作为参考对照, 一式三份进行实时 PCR。引物由上海生工公司合成, CXCR4 引物上游: 5'-CCTATGCAAGGCAGTCCATGT-3', 下游: 5'-CCTATGCAAGGCAGTCCATGT 3', 内参基因 β -actin 引物: 上游: 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA -3', 下游: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。CXCL2 上游引物: CGCAGCAGGAGCGCC 下游引物: TGGATGTTCTTGAGGTGAATTC CXCL5 上游引物: GGAAGGAAATTTGTCTTGATCC 下游引物: TTTCTTGTTCACCGTC。参与本研究的所有 HP 感染患者和正常人均已签署知情同意书, 并通过医院伦理委员会批准。

1.4 统计方法

差异基因筛选主要利用文献的常用方法 (Significance Analysis of Microarray, SAM)。两组间计量资料采用使用 T 检验 (平均数 \pm SD), 计数采用卡方检验, $p < 0.05$, 有统计学差异。统计及分析软件使用 spss23, 以及 GCBI 在线实验室分析软件。

2 结果分析

2.1 芯片质量分析

总样本数量共 31 个。对获得的样本, 首先进行

质量分析, 每张芯片的 RLE (Relative Log Expression) 计算了芯片信号值估计在整体芯片中的相对变化率, 进而反映了所检测基因的变化特征。

本芯片 RLE 一致性较高, 芯片本身质量无问题(见图 1)。质量较高的芯片, 才有必要进行下一步的研究分析, 否则需要舍去不合格的样本。

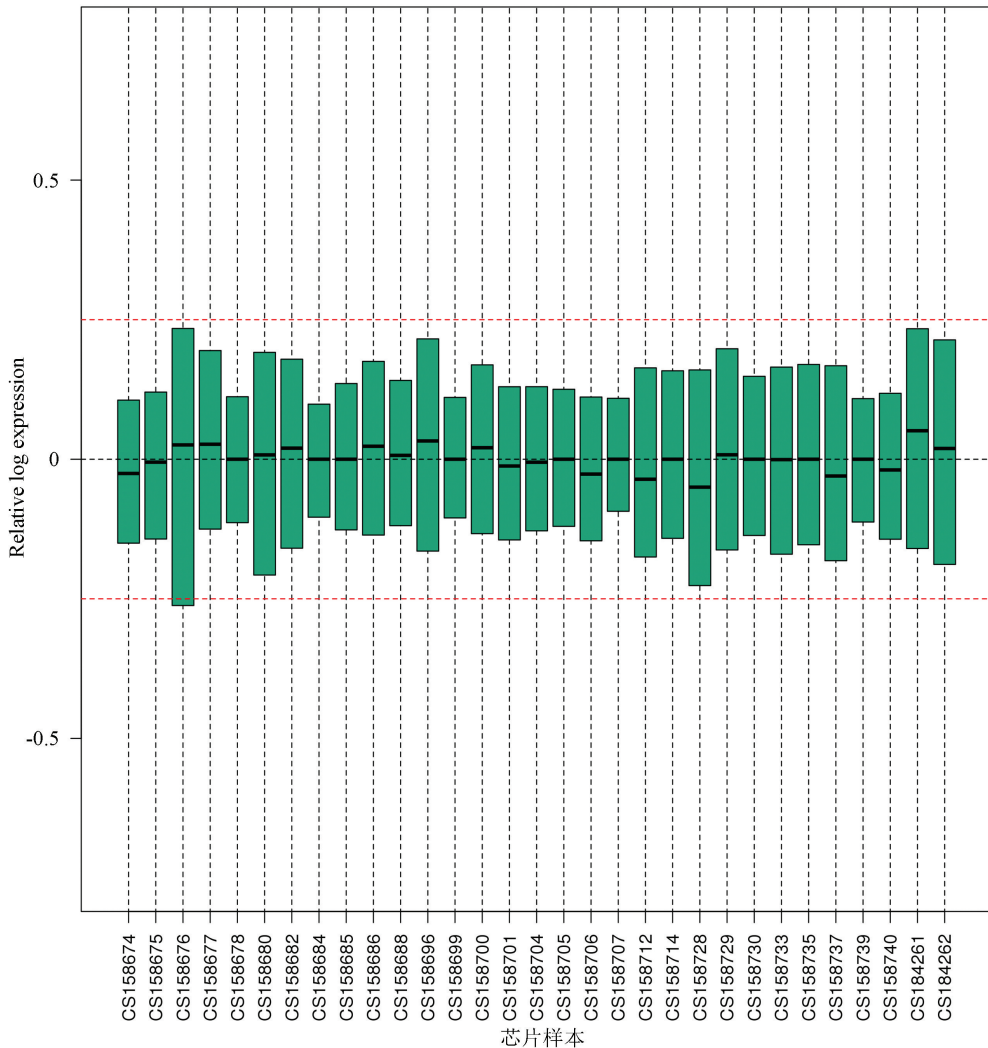


图 1 基因芯片质量分析箱形图

Fig.1 Quality analysis box chart

2.2 差异基因筛选

应用 SAM 法^[7] 分析在预先设定的分组下筛选具有显著性差异的基因。通过分析 A, B 组, 得到在受损的胃粘膜组织, HP (+) vs HP (-) 的差异基因 1, 共 28 个(见图 2)。

通过分析 C, D 组, 我们得到在健康的胃粘膜组织, HP (+) vs HP (-) 的差异基因(见图 3), 共 27 个。同时两个差异基因集取交集获得上调差异基因 44 个。提示在 HP 感染后, 这些基因的高表达与疾病的发生发展有关。

2.3 功能分析

基因功能注释的目的是发现这些差异基因在生物学功能, 代谢途径中的地位和意义, 研究基因表达调控网络, 及其功能机制。Go 分析^[8] 发现这些差异

基因主要涉及免疫反应, 炎症反应, 抗原提呈, 细胞间信号通路等, 而 KEGG 信号通路分析^[9], 主要包括: 细胞因子信号通路, 因子受体相互作用, 细胞粘附等通路。

2.4 核心节点基因网络分析

基因相互作用(Gene signal network) 分析解构了 KEGG 数据库, 突破限制获得单一信号通路中基因之间的相互作用。因此, 可以获得一些基因的上下游分子关系。通过分析发现差异基因的相互作用: *CXCR4*, *CCL20*, *CXCL13*, *CXCL3*, *CXCL5*, *CXCL2*, *HLA-DMA*, *HLA-DQA1*, *HLA-DPA1*, *HLA-DOA*, *HLA-DQB1* 存在有网络作用, 其中核心分子为 *CXCR4*(见图 4)。

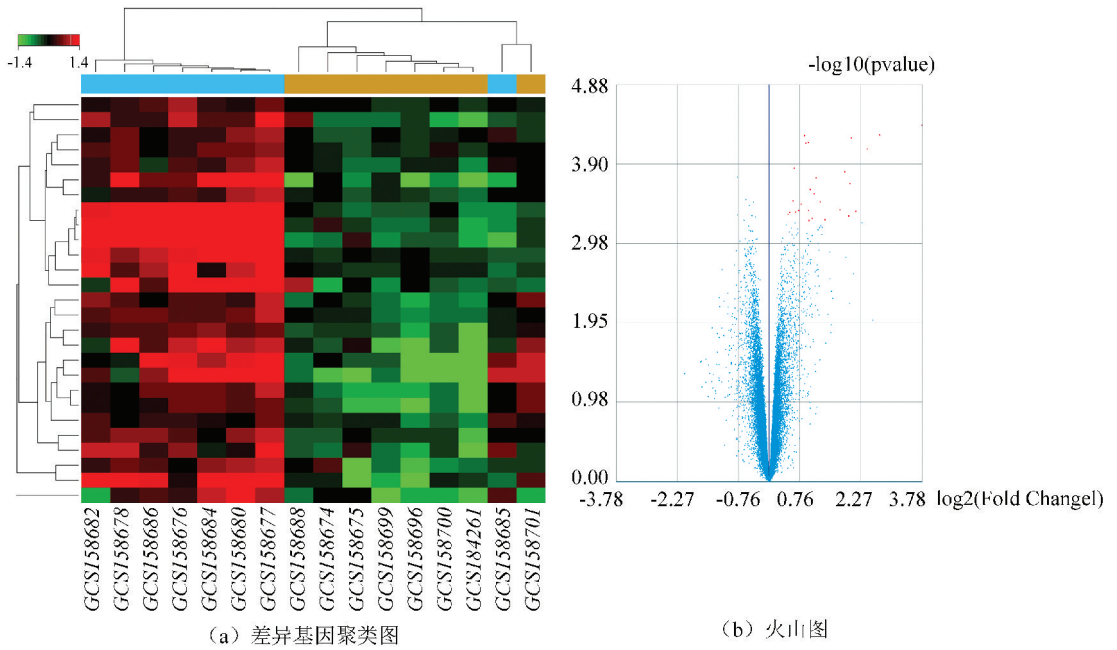


图 2 A、B 组差异分析 1 聚类分析和火山图

Fig.2 Cluster analysis chart of Group A and B, volcano map in DEG1

注:(a)中红色代表上调基因,绿色代表下调基因(颜色详见电子版 <http://swxxx.alljournals.cn/ch/login.aspx>.(2019 年第 1 期));(b)中横坐标代表差异倍数,纵坐标代表 P 值均取 log

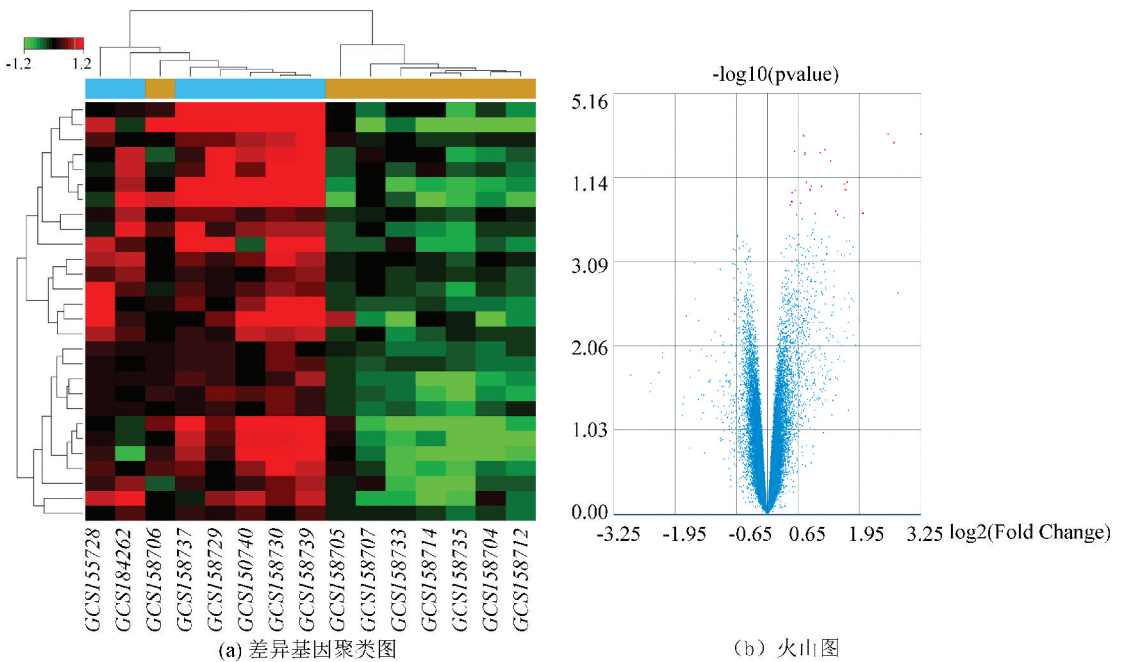


图 3 C、D 组差异分析 2 聚类分析和火山图

Fig.3 Cluster analysis chart of Group C and D volcano map in DEG2

共表达网络清楚的揭示了两基因之间的关系,并找到调控网络的关键基因。这是通过基因间相关系数来拟合基因无标度网络关系实现的。分析基因共表达得到 *CCL20*, *PLEK*, *HLA-DMA*, *JAK3*, *BCL2A1*, *TNFAIP2*, *CXCL13*, *PTPRC*, *CXCL3*, *FGR*, *FAM65B*, *C3*, *CXCL5*, *MMP9*, *VNN2*, *ADAMDEC1*, *GZMK*, *TLR10* 之间共表达关系,其中重要的节点分

子为 *CCL20*, *JAK3*, *TNFAIP2*, *PLEK*, *HLA-DMA*, *PTPRC*, *CXCL13*, *BCL2A1* (见图 5)。

2.5 实时定量 PCR 验证相关基因表达

通过实施定量 PCR 方法,验证在感染后的胃黏膜组织部分相关基因的表达情况。研究发现 *CXCR4*, *CXCL5*, *CXCL2* 在 HP 阳性的胃黏膜组织表达高于 HP 阴性对照组,且具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 6)。

表 1 主要涉及 GO 基因分类(前 10)

Table 1 Top 10 GO mainly involved gene classification

Rank	GO Name	Enrichment Score	Gene Symbols
1	immune response	49.411 846 55	C3 CCL20 CXCL10 ADAMDEC1 TLR10 CXCL13 HLA-DOA HLA-DMA CXCL5 FCGR1B HLA-DPA1 CXCL2 CCL18 CXCL3 HLA-DQB1 MS4A1 HLA-DQA1
2	inflammatory response	38.041 702 8	C3 CCL18 CXCL3 TLR10 CCL3 CCL20 CXCL10 CXCL2 PLA2G2D CHST2 CXCR4
3	antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	510.104 651 2	HLA-DQA1 HLA-DPA1 HLA-DOA HLA-DQB1 HLA-DMA
4	chemotaxis	52.769 446 67	CXCL5 CCL18 CCL20 CXCL10 CCL3 CXCL2
5	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II	55.446 157 74	HLA-DQA1 HLA-DQB1 HLA-DPA1 HLA-DOA HLA-DMA
6	cell-cell signaling	25.294 445 51	CXCL10 CCL20 CXCL13 CXCL5 CCL18 CCL3
7	interferon-gamma-mediated signaling pathway	62.782 110 91	HLA-DPA1 FCGR1B HLA-DQA1 HLA-DQB1
8	T cell receptor signaling pathway	47.451 595 46	HLA-DQA1 HLA-DQB1 PTPRC HLA-DPA1
9	positive regulation of integrin activation	510.104 651 2	CXCL13 PLEK
10	positive thymic T cell selection	226.713 178 3	HLA-DMA PTPRC

表 2 主要涉及的信号通路(前 10)

Table 2 Top 10 mainly involved signaling pathway

Rank	Pathway Name	Enrichment Score	Gene Symbols
1	Chemokine signaling pathway	58.449 491 28	JAK3 CXCL5 CXCL2 CXCL3 CXCL13 CCL20 FGR CCL3 CXCL10 CXCR4 CCL18
2	Rheumatoid arthritis	86.826 323 6	CXCL5 HLA-DMA CCL20 HLA-DQB1 CCL3 HLA-DPA1 HLA-DQA1 HLA-DOA
3	Cytokine-cytokine receptor interaction	34.389 077 61	CXCL3 CXCL2 CXCR4 CXCL5 CCL18 CXCL10 CCL3 CXCL13 CCL20
4	Intestinal immune network for IgA production	120.024 623 8	HLA-DPA1 CXCR4 HLA-DQA1 HLA-DMA HLA-DOA HLA-DQB1
5	Staphylococcus aureus infection	103.750 098 5	HLA-DMA HLA-DQA1 HLA-DQB1 HLA-DOA C3 HLA-DPA1
6	Cell adhesion molecules (CAMs)	48.914 144 63	SELL HLA-DQA1 HLA-DMA HLA-DQB1 PTPRC HLA-DPA1 HLA-DOA
7	Leishmaniasis	80.542 839 66	HLA-DOA HLA-DMA C3 HLA-DQB1 HLA-DPA1 HLA-DQA1
8	Asthma	150.030 779 8	HLA-DPA1 HLA-DMA HLA-DQB1 HLA-DOA HLA-DQA1
9	Allograft rejection	124.415 768 6	HLA-DMA HLA-DQA1 HLA-DQB1 HLA-DPA1 HLA-DOA
10	Graft-versus-host disease	113.356 6	HLA-DPA1 HLA-DMA HLA-DQA1 HLA-DQB1 HLA-DOA

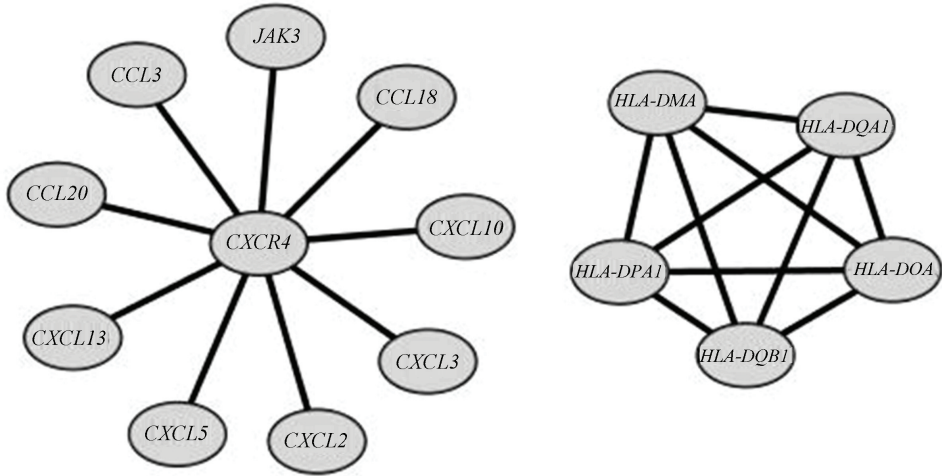


图 4 基因相互作用网络图

Fig.4 Gene interaction network diagram

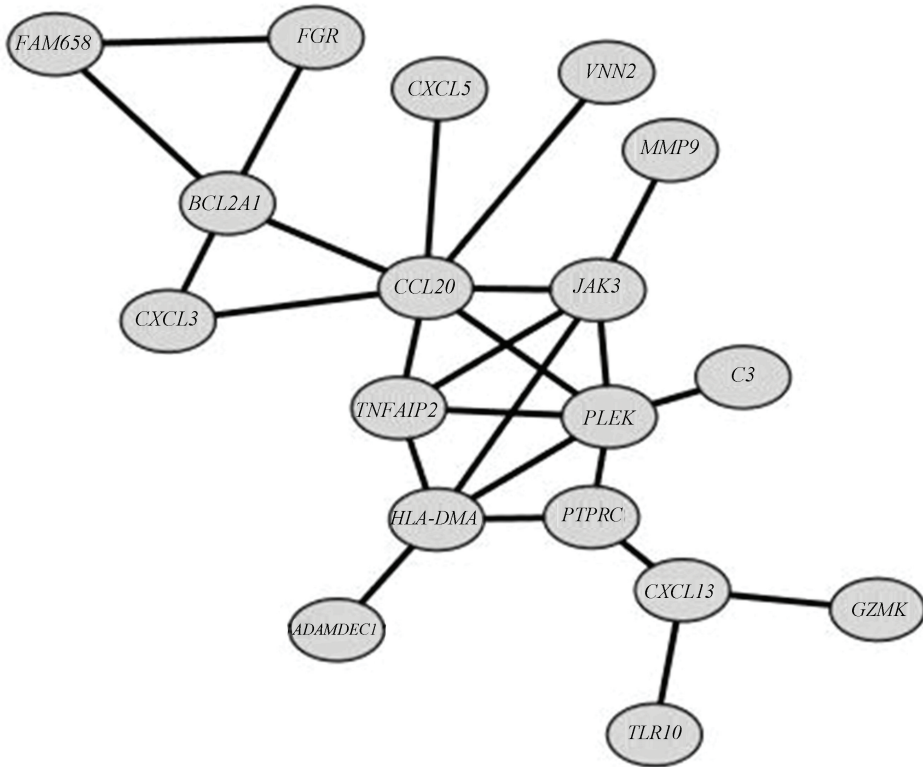


图 5 基因共表达分析网络图

Fig. 5 Gene co-expression network diagram

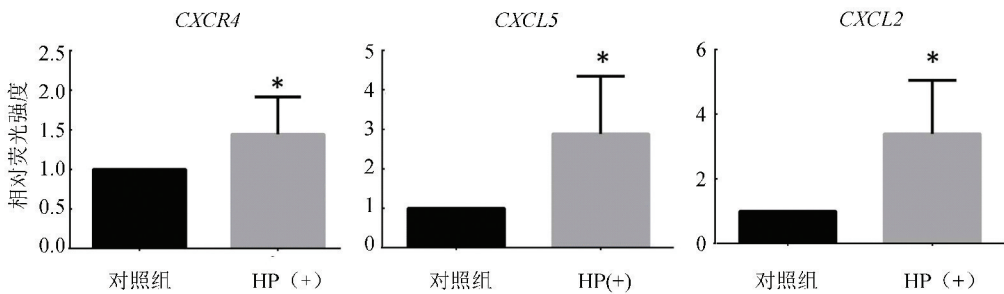


图 6 实时定量 PCR 检测 CXCR4, CXCL5, CXCL2 在胃黏膜组织中的表达 (* 提示 P<0.05)

Fig. 6 Real-time quantitative PCR detection of CXCR4, CXCL5, and CXCL2 expression in gastric mucosa

3 讨论

幽门螺旋杆菌是一种革兰氏阴性细菌,最初是由 Warren 和 Marshall 于 1983 在胃上皮的管腔表面发现,并分离出来,从第一次发现幽门螺杆菌,研究其与临床消化道疾病关系以来,已经经历三十多年^[10]。绝大多数 HP 感染患者不会有任何临床意义上的表现,仅仅在部分患者当作引起消化道疾病治病因素,其中毒力因子空泡毒素 (VacA)^[11],细胞毒素相关基因 A (CagA)^[12] 被认为是重要的治病因素。为了认识该细菌,以及了解其致病机制,做了许多研究,包括体内以及体外研究。

目前发现幽门螺杆菌与消化道疾病关系紧密,但同时与心血管疾病,贫血,脑梗,糖尿病等疾病均有关联^[13-16]。为了进一步认识幽门螺杆菌对胃粘膜组织的分子层面影响,分析幽门螺杆菌相关芯片。Go 分析:主要涉及免疫反应,炎症反应,抗原提呈,细胞信号通路等。Pathways 通路分析:提示主要涉及的信号通路包括:细胞因子通路,因子受体关联,细胞粘附分子等。

基因相互作用分析中发现重要的 *CXCR4* 基因,与趋化因子的互相作用,在人类发育、免疫应答、癌转移均起到了重要的作用。已经有临床研究证明 *CXCR4* 在 HP 患者当中高表达^[17],部分的 HP 感染患者可能会引起消化道肿瘤,*CXCR4* 与消化道肿瘤的高表达有关系^[18],这是否和 *CXCR4* 的过度激活有关? 同时在已有研究中发现胃淋巴瘤观察到 *CXCR4* 和 *Ki-67* 表达之间的相关性,并提示 *CXCR4* 可作为诊断和治疗 MALT 型胃淋巴瘤潜在靶点^[19]。不仅如此,近年来研究表明在慢性幽门螺杆菌感染过程中,骨髓间充质干细胞迁移到胃组织,也可能是胃腺癌的起源^[20]。

基因共表达分析中重要的节点分子为趋化因子 *CCL20*^[21], *CXCL13*^[22], *CXCL5*^[23], *CXCL2*^[24] 以及其他包括增殖,炎症,免疫,凋亡相关重要分子 *JAK3*, *TNFAIP2*, *PLEK*, *HLA-DMA*, *PTPRC*, *BCL2A1* 的激活,而这些基因与胃癌的发生发展有密切关系^[25-28]。有研究证实幽门螺杆菌诱导的 *STAT3* 激活直接上调 *JAK3*,可能有助于胃癌的发生和发展^[25]。为了进一步验证分析相关分子的表达情况,进行了实时定量 PCR 实验验证, *CXCR4*, *CXCL5*, *CXCL2* 在幽门螺杆菌感染后的胃黏膜组织均高于对照组,更多的机制探讨需要进一步实验验证。

4 结论

幽门螺杆菌感染后,存在多个信号通路的激活,包括炎症,免疫反应,细胞凋亡信号,而后出现组织细胞修复、增殖活化等。而这些在组织细胞间异常表达的基因,提示我们是否可能通过相关信号通路药物,从而避免幽门螺杆菌感染所造成的严重后果,同时也给我们提供了进一步研究的方向。

参考文献 (References)

- [1] MOCANU V, DANG J T, SWITZER N, et al. The effect of helicobacter pylori on postoperative outcomes in patients undergoing bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis [J]. *Obesity Surgery*, 2017, 28 (5): 1-7. DOI: 10.1007/s11695-017-3024-8.
- [2] KOUNTOURAS J, POLYZOS S A, DOULBERIS M, et al. Potential impact of helicobacter pylori-related metabolic syndrome on upper and lower gastrointestinal tract oncogenesis [J]. *Metabolism Clinical & Experimental*, 2018, 87 (10): 18-24. DOI: 10.1016/j.metabol.2018.06.008.
- [3] ZAGARI R M, RABITTI S, EUSEBI L H, et al. Treatment of helicobacter pylori infection: a clinical practice update [J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2017, 48 (1): e12857. DOI: 10.1111/eci.12857.
- [4] BARRETT T, WILHITE S E, LEDOUX P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 39 (Database issue): 1005-1010. DOI: 10.1093/nar/gks1193.
- [5] KAPUR K, XING Y, OUYANG Z, et al. Exon arrays provide accurate assessments of gene expression [J]. *Genome Biology*, 2007, 8 (5): R82. DOI: 10.1186/gb-2007-8-5-r82.
- [6] GRACE C, NACHEVA E P. Significance analysis of microarrays (sam) offers clues to differences between the genomes of adult philadelphia positive all and the lymphoid blast transformation of cml [J]. *Cancer Informatics*, 2012, 11 (11): 173-183. DOI: 10.4137/CIN.S9258.
- [7] LARSSON O, WAHLESTEDT C, TIMMONS J A. Considerations when using the significance analysis of microarrays (SAM) algorithm [J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6 (1): 129. DOI: 10.1186/1471-2105-6-129.
- [8] The Gene Ontology consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 45 (D1): D331-D338. DOI: 10.1093/nar/gkw1108.
- [9] DU J, LI M, YUAN Z, et al. A decision analysis model for KEGG pathway analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2016, 17 (1): 407. DOI: 10.1186/s12859-016-1285-1.

- [10] SALAMA N R, HARTUNG M L, MULLER A. Life in the human stomach; persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(6): 385–399. DOI: 10.1038/nrmicro3016.
- [11] NEJATI S, KARKHAH A, DARVISH H, et al. Influence of helicobacter pylori virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 117: 43–48. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.016.
- [12] PARK J Y, FORMAN D, WASKITO L A, et al. Epidemiology of helicobacter pylori and CagA-Positive infections and global variations in gastric cancer [J]. *Toxins (basel)*, 2018, 10(4): 163. DOI: 10.3390/toxins10040163.
- [13] FERRARA M, CAPOZZI L, RUSSO R. Influence of helicobacter pylori infection associated with iron deficiency anaemia on growth in pre-adolescent children [J]. *Hematology*, 2009, 14(3): 173–176. DOI: 10.1179/102453309X402287.
- [14] HUGHES W S. An hypothesis; the dramatic decline in heart attacks in the United States is temporally related to the decline in duodenal ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection [J]. *Helicobacter*, 2014, 19(3): 239–241. DOI: 10.1111/hel.12123.
- [15] OSMAN S M, MUBARAK S M, OMER I M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the onset of type 1 diabetes mellitus in Sudanese children [J]. *Sudanese Journal of Paediatrics*, 2016, 16(2): 59.
- [16] LI J Z, LI J Y, WU T F, et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with type 2 diabetes, not type 1 diabetes; an updated meta-analysis [J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2017, 2017(5): 5715403. DOI: 10.1155/2017/5715403.
- [17] ZHAO C, LU X, BU X, et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori* [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 419. DOI: 10.1186/1471-2407-10-419.
- [18] YU S, WU T, CHENG C, et al. Combined evaluation of expression of *cxcr4* and *nrf2* as prognostic factor for patients with gastric carcinoma [J]. *Anticancer Agents In Medicinal Chemistry*, 2018, 18(3): 388–393. DOI: 10.2174/1871520617666171103112019.
- [19] STOLLBERG S, KÄMMERER D, NEUBAUER E, et al. Erratum to: differential somatostatin and CXCR4 chemokine receptor expression in MALT-type lymphoma of gastric and extragastric origin [J]. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 2016, 142(11): 2239–2247. DOI: 10.1007/s00432-016-2312-3.
- [20] FAKHARI S, KALANTAR E, NIKZABAN M, et al. Effect of helicobacter pylori infection on stromal-derived factor-1/CXCR4 axis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Advanced Biomedical Research*, 2014, (3): 19. DOI: 10.4103/2277-9175.124650.
- [21] CHEN J P, WU M S, KUO S H, et al. IL-22 negatively regulates *Helicobacter pylori*-induced CCL20 expression in gastric epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97350. DOI: 10.1371/journal.pone.0097350.
- [22] NAKASHIMA Y, ISOMOTO H, MATSUSHIMA K, et al. Enhanced expression of CXCL13 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis [J]. *Digestive Diseases & Sciences*, 2011, 56(10): 2887–2894. DOI: 10.1007/s10620-011-1717-8.
- [23] RAJA U M, GOPAL G, SHIRLEY S, et al. Immunohistochemical expression and localization of cytokines/chemokines/growth factors in gastric cancer [J]. *Cytokine*, 2017, 89: 82–90. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.08.032.
- [24] WU D, CAO M, PENG J, et al. The effect of trimethylamine N-oxide on *Helicobacter pylori*-induced changes of immunoinflammatory genes expression in gastric epithelial cells [J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 43: 172–178. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.11.032.
- [25] ZHAO J, DONG Y, KANG W, et al. *Helicobacter pylori*-induced STAT3 activation and signalling network in gastric cancer [J]. *Oncoscience*, 2014, 1(6): 468–475.
- [26] WEST A C, TANG K, TYE H, et al. Identification of a TLR2-regulated gene signature associated with tumor cell growth in gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(36): 5134–5144. DOI: 10.1038/onc.2017.121.
- [27] ZHANG L, LIU Y, WANG X, et al. The extent of inflammatory infiltration in primary cancer tissues is associated with lymphomagenesis in immunodeficient mice [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9447. DOI: 10.1038/srep09447.
- [28] XU Y, MA H, YU H, et al. The miR-184 binding-site rs8126 T>C polymorphism in TNFAIP2 is associated with risk of gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64973. DOI: 10.1371/journal.pone.0064973.